

UNIVERSITE KASDI MERBAH – OUARGLA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES



Mémoire En vue de l'obtention du diplôme de
MASTER ACADEMIQUE

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté par : ZERGOUNE Khouloud Eldjazair

Thème :

***Evaluation d'une substance antimicrobienne produite
par les bactéries lactiques isolées à partir d'un produit
laitier traditionnel***

Soutenu publiquement

Le : 04/07/2019

Devant le jury :

<i>M^{me} OULD EL HADJ KHELIL Aminata</i>	Professeur	Présidente	UKM OUARGLA
<i>M^r BOURICHA M'hamed</i>	M.A.A	Encadreur	UKM OUARGLA
<i>M^{elle} DAOUADJI-DJELOUL Soumia</i>	M.A.A	Examinatrice	UKM OUARGLA

Année universitaire: 2018 /2019

Remerciements

Avant tout je remercie tout d'abord Allah de m'avoir donné le courage, la force, la santé et la patience pour pouvoir accomplir ce travail.

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements et mes profondes gratitude à mon encadreur Mr BOURICHA M'hamed, Maître-assistant A à l'université KASDI MERBAH d'Ouargla, pour son encadrement, pour ces précieux conseils, son suivi et son disponibilité, la confiance qu'il m'a toujours témoigné et la sollicitude dont il m'a entouré au long de cette période.

J'adresse mes sincères remerciements à M^{me} OULD EL HADJ KHELIL Aminata, Professeur à l'université KASDI MERBAH d'Ouargla, d'avoir acceptée la présidence du jury de mon travail,

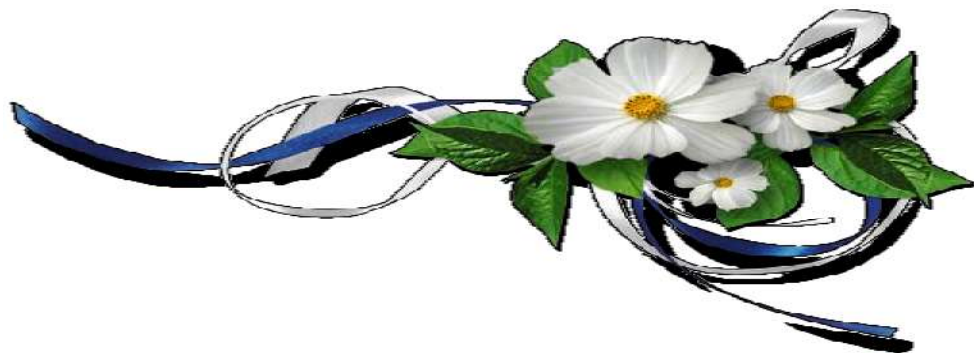
Je tiens à remercier vivement M^{lle} DAOUADJI-DJELOUL Soumia, Maître de assistant A à l'université KASDI MERBAH d'Ouargla, pour ses aides, ses conseils et sa disponibilité toute au long de cette période de travail et d'avoir accepté d'examiner ce travail pour leur précieux temps accordé à l'étude de cette mémoire.

*C'est également un grand honneur pour moi d'être jugé par vous
«Soyez profondément remercié».*

J'adresse aussi mes remerciements à tous les ingénieurs du laboratoire de département de science de la nature et de la vie pour leurs aides.

Je tiens plus à exprimer mes reconnaissances à toutes les personnes qui m'a apporté leurs soutiens et qui ont contribués de près ou de loin à la réalisation de Ce travail.

Merci





Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à tous ceux que j'aime :

*À ceux qui sont dans mon cœur, qui ont veillés pour
notre confort et sacrifié beaucoup pour notre réussite,*

Ma chère mère (que dieu me la garde)

*À celui qui m'a toujours appris comment réfléchir
avant d'agir, à celui qui m'a soutenu tout au long de
ma vie scolaire, à celui qui n'a jamais épargné un
effort pour mon bien, Mon cher père (Que dieu me le
garde)*

À mes très chers frères

À mes belles sœurs

À toute ma famille

À tous mes cher(e)s ami(e)s

Liste des abréviations

°C: Degré Celsius

µl : micro litre

Ac : acide

ADH : Arginine dihydrolase

ATCC: American Type of culture collection

BL/LAB : Bactéries Lactiques/Lactic Acid Bacteria

BN : Bouillon nutritif

CO₂: dioxyde de carbone

Do : Densité optique

g : gramme

GN: gélose nutritive

GRAS: Generally recognized as safe

h: heure

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

KDa: kilo dalton

mg : milli gramme

MH : Muller-Hinton

Min : minutes

ml : milli litre

NaCl: chlorure de sodium

NAD : nicotinamide-adénine-dinucléotide

NaOH : hydroxyde de sodium

pH: potentiel Hydrogène

SA : Sulfate d'ammonium

sp: espèce

ssp/ subsp : sous-espèce

T°: Température

µg : micro gramme

Zi : Zone d'inhibition

Liste des figures

Titre	Page
Figure 01 : Séquence et structure de lantibiotiques de type A (Nisine), B (Mersacidine) et d'un lantibiotique « two-peptides » (Lacticine 3147 A1 et A2) — <i>Sequence and structure of a type A lantibiotic (Nisin), a type B lantibiotic (Mersacidin) and a « two-peptides » lantibiotic (Lacticin 3147 A1 and A2)</i> (NIGUTOVA <i>et al.</i> , 2007)	15
Figure 02 : Mode d'action utilisé par les bactériocines de classe IIa et par les lactococcines A et B (classe IIb) d'après (DIEP <i>et al.</i> , 2007).	19
Figure 03 : Formation de pores membranaires par le complexe nisine-lipide II (CHATTERJEE <i>et al.</i> , 2005).	20
Figure 04 : Différents mécanismes de résistance aux antibiotiques (GUARDABASSI et COURVALIN ,2006).	30
Figure 05 : Méthode des spots (FLEMING <i>et al.</i> , 1975)	34
Figure 06 : Méthode des puits (BAREFOOT et KLAENHAMMER, 1983)	36
Figure 07 : Cinétique de croissance de <i>Salmonella typhi</i> en fonction du temps, en présence et en absence de surnageant (SS : sans l'ajout de surnageant, 86 : en présence de surnageant de la souche lactique S86, 14 : en présence de surnageant de la souche lactique S14).	51
Figure 08 : Cinétique de croissance de <i>Bacillus subtilis</i> en fonction du temps, en présence et en absence de surnageant (SS : sans l'ajout de surnageant, 86 : en présence de surnageant de la souche lactique S86, 14 : en présence de surnageant de la souche lactique S14).	51
Figure 09 : Cinétique de croissance de <i>Enterococcus faecalis</i> en fonction du temps, en présence et en absence de surnageant (SS : sans l'ajout de surnageant, 86 : en présence de surnageant de la souche lactique S86, 14 : en présence de surnageant de la souche lactique S14).	52
Figure 10 : Cinétique de croissance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en fonction du temps, en présence et en absence de surnageant (SS : sans l'ajout de surnageant, 86 : en présence de surnageant de la souche lactique S86, 14 : en présence de surnageant de la souche lactique S14).	52

<p>Figure 11 : Cinétique de croissance de <i>Staphylococcus aureus</i> en fonction du temps, en présence et en absence de surnagent (SS : sans l'ajout de surnageant, 86 : en présence de surnageant de la souche lactique S86, 14 : en présence de surnageant de la souche lactique S14).</p>	53
<p>Figure 12 : Cinétique de croissance de <i>Streptococcus sp</i> en fonction du temps, en présence et en absence de surnagent (SS : sans l'ajout de surnageant, 86 : en présence de surnageant de la souche lactique S86, 14 : en présence de surnageant de la souche lactique S14).</p>	53
<p>Figure 13 : Cinétique de croissance de <i>Klebsiella sp</i> en fonction du temps, en présence et en absence de surnagent (SS : sans l'ajout de surnageant, 86 : en présence de surnageant de la souche lactique S86, 14 : en présence de surnageant de la souche lactique S14).</p>	54

Liste des photos

Titre	Page
Photo 01 : Aspect des bactéries lactiques sur milieu MRS liquide et solide	38
Photo 02 : Aspect de quelques bactéries pathogènes sur le milieu liquide BN et chacune sur son milieu solide approprié (A, B, C, D, E et F)	38
Photo 03 : Test de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques à l'égard d' <i>E.coli</i> , Méthode de spot (FLEMING et al., 1975)	39
Photo 04 : Test de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques à l'égard d' <i>Enterococcus faecalis</i> , Méthode de spot (FLEMING et al., 1975)	40
Photo 05 : Test de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques à l'égard de <i>S.aureus</i> , Méthode de spot (FLEMING et al., 1975)	40
Photo 06 : Activité antibactérienne de <i>Leuconostoc cremoris</i> vis-à-vis <i>E.coli</i> , Par méthode de diffusion (puits)	42
Photo 07 : Activité antibactérienne de <i>Lactococcus raffinolactis</i> vis-à-vis <i>E d'Enterococcus faecalis</i> , Par méthode de diffusion (puits)	42
Photo 08 : Activité antibactérienne de <i>Lactococcus raffinolactis</i> vis-à-vis <i>Bacillus subtilitus</i> , Par méthode de diffusion (puits)	43
Photo 09 : Activité antibactérienne de bactéries lactiques vis-à-vis <i>Bacillus subtilitus</i> , Par la méthode de précipitation	47
Photo 10 : Activité antibactérienne de bactéries lactiques vis-à-vis <i>E.coli</i> , Par la méthode de précipitation	47
Photo 11 : Activité antibactérienne de bactéries lactiques vis-à-vis <i>S.aureus</i> , Par la méthode de précipitation	48
Photo 12 : Activité antibactérienne de bactéries lactiques vis-à-vis <i>Pseudomonas aeroginosa</i> , Par la méthode de précipitation	48
Photo 13 : Activité antibactérienne de bactéries lactiques vis-à-vis <i>Salmonella typhi</i> , Par la méthode de précipitation	49
Photo 14 : Activité antibactérienne de bactéries lactiques vis-à-vis <i>Streptococcus sp421</i> , Par la méthode de précipitation	49

Liste des tableaux

Titre	Page
Tableau 01 : Principaux genres de bactéries lactiques. (Schleifer <i>et al.</i> , 1995) ; (Collins <i>et al.</i> , 1987), (Collins <i>et al.</i> , 1990) ; (Dicks <i>et al.</i> , 1995).	04
Tableau 02 : Les quartes Bactériocines de classe III produites par des bactéries lactiques. (Nilsen <i>et al.</i> , 2003 ; Papagianni, 2003 ; Nigutova <i>et al.</i> , 2007).	16
Tableau 03 : Exemples d'applications des bactériocines comme conservateurs alimentaires d'après Gálvez, A. <i>et al.</i> (Gálvez <i>et al.</i> , 2011).	21
Tableau 04 : Les espèces des bactéries lactiques utilisées comme des souches tests	31
Tableau 05 : Les bactéries pathogènes (BMR) utilisées comme souches indicatrices	32
Tableau 06 : Diamètres des zones d'inhibition (mm) des bactéries lactiques à activité antimicrobienne	41
Tableau 07 : Résultat de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques vis-à-vis <i>E.coli</i> , <i>E.faecalis</i> , <i>Bacillus Sublitus</i>	45

Table de matières

Remerciements

Dédicace

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des photos

Liste des tableaux

Introduction 01

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Les bactéries lactiques

I.1. Définition	03
I.1.1. Caractéristiques générales des bactéries lactiques.....	03
I.2. Principaux genres des bactéries lactiques	04
I.2.1. Genre <i>Lactobacillus</i>	04
I.2.2. Genres <i>Leuconostocs</i> , <i>Oenococcus</i> et <i>Weissella</i>	05
I.2.3. Genre <i>Lactococcus</i>	05
I.2.4. Genres <i>Pediococcus</i> et <i>Tetragenococcus</i>	06
I.2.5. Genre <i>Streptococcus</i>	06
I.2.6. Genre <i>Carnobacterium</i>	07
I.2.7. Genre <i>Bifidobacterium</i>	08
I.2.8. Genres <i>Enterococcus</i> et <i>Vagococcus</i>	08
I.2.9. Genre <i>Aerococcus</i>	09
I.2.10. Genre <i>Alloiococcus</i>	09
I.3. Le rôle des bactéries lactiques	09

Chapitre II : Les substances antimicrobiennes

II.1. Acides organiques	10
II.2. Acides gras	11
II.3. Peroxyde d'hydrogène	11
II.5. Acétaldéhyde	12

II.4. Dioxyde de carbone (CO ₂)	12
II.6. Di acétyle (2,3- butanédione)	12
II.7. Reutérine (ou 3-hydroxypropionaldehyde).....	12
II.8. Reutéricycline	13
II.9. 2-pyrrolidone-5-carboxylic Acide	13
II.10. Bactériocines	13
II.10.1. Définition de la bactériocines	14
II.10.2. Classification	14
II.10.2.1. Classe I. Les lantibiotiques	14
II.10.2.2. Classe II. Bactériocines non modifiées	15
II.10.2.3. Classe III. Les bactériocines à haute poids moléculaire	16
II.10.2.4. Classe IV	16
II.10.3. Production et le conditionnement des bactériocines	16
II.10.4. Mode d'action	17
II.10.4.1. Les lantibiotiques	17
II.10.4.2. La classe II	18
II.10.4.3. Les bactériocines de Class III	20
II.10.5. Application biotechnologique des bactériocines des bactéries lactiques	21
II.10.5.1. Applications des bactériocines dans l'industrie alimentaire..	21
II.10.5.2. Applications des bactériocines dans le secteur médical	21

Chapitre III : Bactéries multirésistantes

III.1. Définition d'une bactérie multirésistante (BMR).....	23
III.2. Principaux BMR	23
III.2.1. <i>Staphylocoques</i>	23
III.2.2. <i>Entérocoques</i>	24
III.2.3. <i>Entérobactéries</i>	24
III.2.3.1. <i>Escherichia coli</i>	25
III.2.3.2. <i>Salmonelle</i>	26
III.2.3.3. <i>Klebsiella</i>	26
III.2.4. <i>Pseudomonas</i>	26
III.2.5. <i>Bacillus</i>	27

III.2.6. <i>Streptocoque</i>	28
III.3. Types de résistances bactériennes.....	28
III.3.1. Résistance bactérienne naturelle	28
III.3.2. Résistance bactérienne acquise	28
III.4. Mécanismes de la résistance bactérienne aux antibiotiques	29
III.4.1. Diminution de la perméabilité	29
III.4.2. Efflux actif	29
III.4.3. Inactivation de l'antibiotique.....	29
III.4.4. Modification de la cible de l'antibiotique	29

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

I. Matériel et méthodes	31
I.1. Matériels biologiques	31
I.1. Revivification des bactéries lactiques	32
I.2. Revivification des bactéries pathogènes	32
I.3. Détermination de la substance antimicrobienne produite par les bactéries lactiques	33
I.3.1. Méthode directe de double couche (méthode de Fleming <i>et al.</i> , 1975)	33
I.3.2. Méthode de détection indirecte / Méthode des puits (Barefoot et Klaenhammer, 1983)	34
I.3.2.1. Précipitation des protéines	35
I.3.2.1.A. Précipitation avec le sulfate d'ammonium	35
I.3.2.1.B. Précipitation par l'éthanol	36
I.4. Cinétique de croissance en présence et en absence de surnageant	37

Résultats et discussion

II. Résultats et discussion	38
II.1. Revivification des bactéries lactiques	38
II.2. Revivification des bactéries pathogènes	38
II.3. Détermination de la substance antimicrobienne produite par les bactéries lactiques	39
II.3.1. Méthode directe de double couche (méthode de Fleming <i>et al.</i> , 1975)	39

II.3.2. Méthode de détection indirecte / Méthode des puits (Barefoot et Klaenhammer, 1983)	41
II.3.2.1. Précipitation des protéines	45
II.3.2.1.A. Précipitation avec le sulfate d'ammonium	46
II.3.2.1.B. Précipitation par l'éthanol	46
II.4. Cinétique de croissance en présence et en absence de surnageant	50
Conclusion et perspective	55
Références bibliographiques	
Annexe	

Introduction

Les bactéries lactiques sont généralement connues étant saines, de statut "GRAS" (Generally Recognized As Safe) (**Vescovo *et al.*, 1996**). Se sont des micro-organismes de catégorie alimentaire qui jouent un rôle essentiel dans la fermentation des matières premières animales et végétales. Elles occupent des niches écologiques extrêmement variées. Leur capacité à fermenter les hydrates de carbone et, à un moindre degré, de dégrader les protéines et les lipides mène à la synthèse d'une large gamme de composés, tels que les acides organiques, les peptides, les composés antimicrobiens et aromatiques et les exopolysaccharides. Ces métabolites peuvent contribuer aux caractéristiques organoleptiques, technologiques et nutritionnelles des aliments fermentés (**MOZZI *et al.*, 2010**).

Les bactéries lactiques assurent non seulement des caractéristiques particulières d'arômes et de texture mais aussi une bonne sécurité sanitaire alimentaire. Elles sont connues pour leur capacité à produire lors de leur croissance des composés actifs (substances inhibitrices) à savoir les acides organiques qui acidifient le milieu, des dérivés du métabolisme de l'oxygène (H₂O₂) et des substances naturelles de nature protéique douées d'une activité antagoniste à l'encontre d'un grand nombre de germes d'altération (**KLAENHAMMER, 1988 ; JACK *et al.*, 1995 ; Matilla-Sandholm *et al.*, 1999**)

Parmi ces substances synthétisées, des peptides dénommés bactériocines, sont produits puis excrétés à l'extérieur des cellules productrices. Ils présentent une activité bactéricide ou bactériostatique. Leur spectre d'activité peut être plus ou moins large, quelquefois limité aux espèces proches phylogénétiquement des bactéries productrices (**JACK *et al.*, 1995 ; Chen et Hoover, 2003**)

De nombreuses possibilités d'utilisation ont été envisagées, pour répondre aux besoins de l'industrie alimentaire, cosmétique et de la médecine. Ces nouvelles substances naturelles produites par des souches bactériennes universellement reconnues d'usage alimentaire dirigées contre des germes pathogènes pourraient être utilisées comme agent de conservation sous forme d'additif, soit d'inoculum bactérien producteur de bactériocines au cours du processus de fabrication, permettant ainsi de diminuer le nombre d'intoxications alimentaires et d'augmenter la durée de conservation et de commercialisation. (**Diop, 2007**)

L'utilisation quotidiennement des antibiotiques (antibiothérapie) contre les maladies d'origine bactérienne entraîne des problèmes graves tels que l'apparition des bactéries multi-résistantes. Cependant une bactéries résistante à un antibiotique d'une familles rend généralement les autres antibiotiques inefficaces (**Vescovo *et al.*, 2006**).

L'émergence de cette résistance bactérienne à l'antibiothérapie a orienté l'industrie pharmaceutique vers la découverte de nouvelles molécules antimicrobiennes. Grâce à leur mode d'action différent des antibiotiques conventionnels, les bactériocine comme la mersacidine ou la lacticine 3147, pourraient être considérées comme une alternative au contrôle de la prolifération et à l'inhibition des souches bactériennes pathogènes devenues résistantes aux traitements usuels. De nombreuses bactériocines sont actuellement à l'étude pour être utilisées comme traitement médical (**Dicks *et al.*, 2011**). Contrairement aux applications alimentaires des bactériocines, aucune de bactériocine n'est à ce jour commercialisée comme médicament.

L'objectif de ce travail consiste à étudier l'activité antibactérienne de certaines souches de bactéries lactiques isolées à partir d'un produit laitier traditionnel à l'égard de quelques bactéries pathogènes. Pour se faire, on a articulé ce travail autour de quatre parties. La première consacrée à un rappelle sur les bactéries lactiques et leurs principaux caractéristiques. Dans la seconde partie, un rappelle sur les substances antimicrobiennes produites par les bactéries lactiques. La résistance bactérienne et les principales bactéries multirésistantes font l'objet de troisième partie, suivie à une partie expérimental par l'utilisation de protocoles simples et réalisables afin de pouvoir obtenir des résultats nécessaires pour cette étude.

Synthèse
bibliographique

Chapitre I-
Les bactéries
lactiques

I. Les bactéries lactiques

I.1. Définition

Le groupe des bactéries lactiques, a été défini pour la première fois par Orla-Jensen (1919), il réunit plusieurs genres de bactéries à Gram positif possédant des caractéristiques physiologiques et métaboliques communes, mais avec parfois peu d'homologie de leurs acides nucléiques (SUTRA *et al.*, 1998).

Elles sont des cellules procaryotes organotrophes formant un groupe hétérogène (Badis *et al.*, 2005). Elles peuvent avoir différentes formes: sphériques (*Streptococcus* et *Lactococcus...*), en bâtonnets (*Lactobacillus*) ou encore ovoïdes (*Leuconostoc*). (LUQUETF *et* CORRIEU, 2005 ; GALVEZ *et al.*, 2011).

I.1.1. Caractéristiques générales des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques (LAB) sont des micro-organismes, procaryotes, Gram positives, catalase négative, oxydase négative, anaérobies facultatives, micro aérophiles, hétérotrophes et chimio-organotrophes. Elles sont le plus souvent immobiles, asporulées, (TAILLIEZ, 2001).

Les bactéries lactiques produisent de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme en fermentant les sucres (glucose, fructose, mannose, galactose, saccharose et lactose) chez les bactéries homofermentaires, en plus de l'éthanol et CO₂ chez les bactéries hétérofermentaires. (KANDLER & WEISS, 1986)

Le principal atout que représentent les bactéries lactiques pour l'industrie alimentaire, réside dans l'amélioration de la qualité des produits fermentés en y développant certaines caractéristiques organoleptiques et en augmentant leur durée de conservation (STILES, 1996). Elles participent à l'inhibition de certains microorganismes pathogènes, en produisant plusieurs métabolites ayant une activité antimicrobienne (DORTU & THONART, 2009; MORAES *et al.*, 2010).

Elles sont généralement mésophiles, certaines sont psychrotolérantes ou thermotolérantes. Elles se développent majoritairement à pH 5,5-6,5 et certaines sont encore actives à pH 9,6 ou pH 3,2. Elles ont des tolérances très variables vis-à-vis du sel (CAPLICE *et* FITZGERALD, 1999).

Les LAB ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (DELLAGLIO *et al.*, 1994 ; HOGG, 2005).

I.2. Principaux genres des bactéries lactiques

Les groupes des bactéries lactiques renferment un ensemble d'espèces hétérogènes dont la fonction commune est la production d'acide lactique.

Selon la dernière édition de Bergey's manual of systematic bacteriology (2009), les bactéries lactiques sont classées dans le phylum des *Firmicutes*, la Classe des *Bacilli* et l'ordre des *Lactobacillales* renfermant trente cinq genres répartis sur six familles. Parmi ces genres, seulement treize sont utilisés dans la biotechnologie alimentaire, il s'agit de : *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus*, *Weissella* (DRIDER et PRIVOST, 2009) et *Bifidobacterium* (LEVEAU et BOUIX, 1993).

Le tableau 01 présente les principaux genres de bactéries lactiques et les caractéristiques physiologiques qui forment la base de la classification et de l'identification. (SCHLEIFER *et al.*, 1995) ; (COLLINS *et al.*, 1987), (COLLINS *et al.*, 1990) ; (DICKS *et al.*, 1995).

Genre	Forme de la cellule	Type de fermentation	Configuration de l'acide lactique	Espèce type
<i>Aerococcus</i>	Coques	Homofermentaire		<i>Ac. viridans</i>
<i>Carnobacterium</i>	Bacilles	Hétérofermentaire	L(+)	<i>Cb. divergens</i>
<i>Enterococcus</i>	Coques	Homofermentaire	L(+)	<i>Ec. faecalis</i>
<i>Lactobacillus</i>	Bacilles	Homo ou hétéro-fermentaire	D(-), L(+) ou D/L	<i>Lb. delbrueckii</i>
<i>Lactococcus</i>	Coques	Homofermentaire	L(+)	<i>Lc. lactis</i>
<i>Leuconostoc</i>	Coques	Hétérofermentaire	D(-)	<i>Ln. mesenteroides</i>
<i>Oenococcus</i>	Coques	Hétérofermentaire	D(-)	<i>Oe. oeni</i>
<i>Pediococcus</i>	Coques	Homofermentaire	D/L ou L(+)	<i>Pc. damnosus</i>
<i>Streptococcus</i>	Coques	Homofermentaire	L(+)	<i>Sc. salivarius</i>
<i>Tetragenococcus</i>	Coques	Homofermentaire	L(+)	<i>Tc. halophilus</i>
<i>Vagococcus</i>	Coques ovoïdes	Homofermentaire	L(+)	<i>Vc. fluvialis</i>
<i>Weissella</i>	Petits bacilles	Hétérofermentaire	D/L ou D(-)	<i>We. viridescens</i>

Tableau 01 : Principaux genres de bactéries lactiques. (SCHLEIFER *et al.*, 1995) ; (COLLINS *et al.*, 1987), (COLLINS *et al.*, 1990) ; (DICKS *et al.*, 1995).

I.2.1. Genre *lactobacillus*

Les *lactobacilles* sont des bactéries lactiques ubiquitaires qui colonisent beaucoup d'habitats. Ce sont des bactéries Gram+ asporulées, immobiles, en forme bacille isolé ou groupées en paires ou en chaînette. Elles forment des colonies de petites tailles, lisses, brillantes non pigmentées et souvent opaques. Ce sont des anaérobies facultatifs ayant un pH optimum de croissance de 5,5 avec une température optimale de croissance comprise entre 30 et 40°C (HAMMES *et al.*, 2009). Les lactobacilles ont un métabolisme

énergétique saccharolytique où le lactate est l'acide organique majoritaire (DE VUYST L *et al.*, 1994). Les *Lactobacillus* sont très exigeantes en matière nutritive (Euze'by, 1997).

Les bactéries appartenant au genre *Lactobacillus* se distinguent des autres bactéries à Gram positif par le fait qu'elles sont anaérobies ou microaérophiles, immobiles, dépourvus de catalase et d'oxydase. Très polymorphes, leur morphologie microscopique varie d'une espèce à l'autre, de coccobacilles aux bacilles fins et allongés. Leur métabolisme énergétique est fermentaire. Le principal produit final de la dégradation des sucres est l'acide lactique auquel peut s'ajouter l'acide acétique, l'éthanol et le CO₂ pour les espèces hétéro- fermentaires (FRENEY *et al.*, 2000).

I.2.2. Genres *Leuconostocs*, *Oenococcus* et *Weissella*

Appartient à la famille des *leuconostocaceae*, Gram positif, ont une forme cocci mais elles peuvent être allongés, associé en paire ou en chaînes, non sporulées (BERGEY *et al.*, 2009). Ils rassemblent les coques lenticulaires en paires en chainettes, mésophiles, qui possèdent un caractère hétérofermentaire marqué, avec production d'acide lactique, de CO₂ et d'éthanol. Certaines espèces sont capables de fermenter le citrate ce qui leur confère une activité aromatique importante. D'autres synthétisent des dextrans en présence de saccharose. Ce genre comporte 6 espèces présentes majoritairement dans les produits végétaux, mais elles sont également isolées dans les produits laitiers. Ils participent à la fermentation des produits végétaux. (FEDRIGHI., 2005)

Le développement des *leuconostoc* entraîne souvent l'apparition d'une viscosité dans le milieu grâce à la production des exopolysaccharides. Les *leuconostoc* principalement *Ln. mesenteroides ssp. cremoris* et *Ln. lactis* sont utilisés en association avec les *lactocoques* dans l'industrie laitière pour produire en plus de l'acide lactique et le CO₂, des substances aromatiques telles que le diacétyl et l'acétoïne à partir des citrates du lait (HASSAN et FRANK, 2001 ; GUIRAUD, 2003 ; OGIER *et al.*, 2008).

I.2.3. Genre *Lactococcus*

Les études de Schleifer *et al.*(1985) basées sur des critères moléculaires, ont montré qu'il était justifié de séparer les streptocoques lactiques mésophiles du genre *Streptococcus* et de créer le genre *Lactococcus*. (MOFREDJ *et al.*, 2007 ; CASTALA et MONTEL, 2008).

Se sont des coques présentent en chainette, thermosensibles, homofermentaires produisant que de l'acide lacique L(+) (DELLAGLIO *et al.*, 1994). Elles se caractérisent

par la production de diacétyle à partir du citrate (citrate+), certaines espèces utilisent l'arginine (ARG+) (GUIRAUD, 2003)

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

1.2.4. Genres *Pediococcus* et *Tetragenococcus*

Des bactéries lactiques, de forme de coque, catalase négatif, aérobie facultative. Fermentent le glucose en acide lactique sans production de gaz. Elles croissent dans un pH 5 (BERGEY *et al.*, 2009).

Les *Pediococcus* sont des coques homofermentaires dont la particularité est le groupement en tétrade. Ils sont mésophiles, et le plus souvent incapables d'utiliser le lactose. Par contre, certaines espèces se distinguent par leur capacité à se développer à des teneurs en sel très élevées, comme *P.halophilus*, renommé *Tetragenococcus halophilus* qui tolère jusqu'à 18% de NaCl. Ils sont souvent présents dans la bière, le vin, les produits végétaux et saumures (anchois salés) et participent à la fermentation des saucissons. (FEDRIGHI., 2005)

1.2.5. Genre *Streptococcus*

Se sont des Gram positif, cocci non mobiles, appartenant à la famille des *Streptococcaceae*, anaérobies ou aérotolescentes sporulées, quelques espèces sont capsulées. Elles sont chimio-organotrophes à métabolisme fermentatif produisant de lactate mais sans gaz, catalase négative, et la température de leur croissance se situe entre 25-45°C avec une température optimale de 37°C (BERGEY *et al.*, 2009).

Le genre *Streptococcus* comprend essentiellement des espèces d'origine humaine ou animale dont certaines sont pathogènes comme *S.pyogenes* et *S.agalactiae* ; d'autres sont impliquées dans la formation de la plaque dentaire (*S. mutans*) ; ces espèces étant rarement rencontrées dans les aliments. L'espèce thermophile *Streptococcus thermophilus* se différencie par son habitat (lait et produits laitiers), et son caractère non pathogène. Du fait de sa propriété technologique seule cette espèce est considérée comme appartenant aux bactéries lactiques (FEDRIGHI., 2005)

La seule espèce de *streptocoques* qui soit utilisée en technologie alimentaire est *Streptococcus thermophilus* (STILES et HOLZAPFEL, 1997).

Streptococcus thermophilus étant connue comme une espèce type, une bactérie alimentaire (DELORME *et al.*, 2010). Les *Streptococcus thermophilus* sont des bactéries

lactiques à grande importance dans les industries laitières précisément dans la fabrication de yaourt et du fromage en collaboration avec d'autres espèces des bactéries lactiques : *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (HOLS *et al.*, 2005).

1.2.6. Genre *Carnobacterium*

Leur cellules se forme de courts bâtonnets, isolés ou en paire, parfois en courtes chaînes, mobiles ou non. Ces bactéries sont catalase, oxydase et nitrate réductase négatives. La température optimale de croissance des *Carnobacterium* varie de 23 à 30°C, elles peuvent se multiplier à des températures proches de 0°C et sont inhibées à partir de 45°C. Ce sont donc des bactéries psychrotrophes. Leur pH optimum de croissance varie selon les espèces de 6,0 à 7,4 (COLLINS *et al.*, 1987). Elles sont anaérobie aéro-tolérant. La plupart des espèces sont inhibées à partir de 7% de NaCl. En présence de sucre, leur métabolisme n'est que très faiblement hétérofermentaire, avec une large production d'acide lactique L(+). Contrairement aux *Lactobacillus*, les *Carnobacterium* sont peu acidifiants (COLLINS *et al.*, 1987).

Des études menées sur les produits carnés ont conduit à isoler des bactéries lactiques décrites comme des *Lactobacillus* atypiques, peu acidifiants. Une étude taxonomique de ces différentes souches a permis de les regrouper après hybridation ADN-ADN, dans un nouveau genre, *Carnobacterium*. Morphologiquement proche des *Lactobacillus*, ils s'en différencient par leur tendance psychrotrophe et leur production majoritaire de l'isomère L de l'acide lactique. De même leur peptidoglycane est constitué d'acide meso-diaminopimelique alors qu'il est caractérisé par le peptide Lyse-Asp chez la plupart des *Lactobacillus*. Les *carnobactéries* sont phylogénétiquement plus proche du genre *Enterococcus*. Ce genre comprend 4 espèces fréquemment associées aux aliments *C.pisciola* (ou *maltaromicus*), *C.mobile* et *C.gallinarum* (FEDRIGHI., 2005)

Ils sont isolés de produits carnés le plus souvent conditionnés sous atmosphère modifiée, ou de produits de la mer, saumon fumé notamment mais également du contenu intestinal ou du tissu rénal de salmonidés. Certains ont également été isolés de fromages. Les *Carnobacterium* n'interviennent pas dans les fermentations alimentaires, ils tolèrent difficilement un pH inférieure à 5, en revanche, ils sont souvent producteurs de substances inhibitrices. Deux espèces non associées aux aliments, isolées de l'eau d'un lac d'Antarctique, *C.funditum* et *C.alterfunditum* ont été récemment décrites. (FEDRIGHI., 2005)

I.2.7. Genre *Bifidobacterium*

Le genre *Bifidobacterium* est considéré comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques grâce à la similarité de ses propriétés physiologiques et biochimiques et à sa présence dans le même habitat écologique, tel que le tube gastro intestinal. (PILET *et al.*, 2005).

C'est le genre le plus connu et le mieux étudié dans l'ordre des bifidobactériales. Les *Bifidobacterium* se sont des bâtonnets, Gram positives, asporulées, immobiles, ont des formes variées (incurvées, rarement ramifiées) celles de formes bâtonnets peuvent généralement être isolées ou en amas et en paires ou en forme de V (LANSING *et al.*, 2003). Les *Bifidobacterium* sont anaérobies (LANSING *et al.* 2003), saccharolytiques (SCARDOVI, V., 1986), fermentent les glucides en donnant de l'acide acétique et l'acide lactique sans production de dioxyde de carbone (LANSING *et al.* 2003). Pas de production d'ammoniaque ou de H₂S à partir des acides aminés et elles ne réduisent pas les nitrites nitrates.

Le métabolisme des hydrates de carbone par des *bifidobactéries* est différente de bactéries homofermentaires et hétérofermentaires. En effet, le fructose-6-phosphocétolase, une enzyme typique du genre *Bifidobacterium*, est responsable de la dégradation du glucose. La détermination de cette enzyme est un test crucial pour l'identification de ces micro-organismes (SHAH, 2000).

I.2.8. Genres *Enterococcus* et *Vagococcus*

Le genre *Enterococcus* rassemble la plupart des espèces du groupe sérologique D et comprend notamment les espèces anciennement désignées sous le terme (*Streptocoques fécaux*), comme *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*. Ce sont également des coques homofermentaires qui se caractérisent par leur développement à 10 et 45°C, leur aptitude croître en présence de 6,5% de NaCl, et à pH 9.6, et leur grande résistance aux facteurs de l'environnement, en particulier la température (30 min à 60°C). Leur habitat est très varié : intestin de l'homme et des animaux, produits végétaux, sol, produits laitiers. Au sien des bactéries lactiques, les bactéries du genre *Enterococcus* ont une position particulière : parfois utilisés comme indicateur de contamination fécale dans les aliments, ils peuvent aussi être associés à la fermentation de certains fromages italiens. Certaines espèces de *Streptococcus* et *Lactococcus* isolées de poisson et d'eau douce et qui possèdent la particularité d'être mobiles, ont été répertoriées dans le nouveau genre *Vagococcus* mais ne concernent pas les aliments (FEDRIGHI., 2005)

I.2.9. Genre *Aerococcus*

Des bactéries à Gram positif, des coques isolées ou en paires ou arrangées en amas, microaérophile mais généralement anaérobies facultatives, catalase négative, asporulées, pH de croissance 9, la tolérance en NaCl 18%. (**RUOFF, 2007**).

I.2.10. Genre *Alloiococcus*

Des cellules ovoïdes, Gram positif, non-mobiles, asporulées, vivent en paire ou en tétrade. Se croissent en ralentis à un NaCl 6,5% mais pas 10%. Et ne préfèrent pas la T° 10°C ni 45°C. Sont aérobies, catalase - /+, oxydase négative, ne produisent de gaz, l'acide n'est pas produit à partir de la fermentation de glucose (**COLLINS *et al.*, 1987**).

I.3. Le rôle des bactéries lactiques

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.

Les bactéries lactiques sont fréquemment associées de manière positive à l'alimentation humaine, à travers la fermentation d'une grande variété de produits (**ROSS *et al.*, 2002**). Elles sont présentes en temps que flore technologique dans les produits laitiers (yaourts, fromages), les produits carnés (charcuteries), les produits végétaux (choucroute, pickles, olives fermentées), les levains de panification et les boissons alcoolisées (vins, bières blanches, saké) (**LEROY & DE VUYST, 2004**).

Donc la plupart des aliments fermentés font intervenir des bactéries lactiques soit en tant qu'agent principal de la fermentation, soit en tant qu'agent secondaire de la production de substances antimicrobiennes. Dans ces produits, le rôle principal des bactéries lactiques est l'acidification qui participe à la flaveur et à la texture des produits mais elles exercent au travers de leur métabolisme d'autres rôles sur les caractéristiques organoleptiques et technologiques des aliments fermentés ou non. (**FEDRIGHI., 2005**)

Ces bactéries lactiques participent à la conservation et la biopréservation des aliments. Elles ont la capacité de produire des substances antimicrobiennes comme les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène ou encore les bactériocines qui inhibent la croissance de plusieurs bactéries pathogènes.

Chapitre II-
Les substances
antimicrobiennes

II. substances antimicrobiennes produites par les bactéries lactiques

L'une des principales caractéristiques des produits fermentés est leur stabilité par rapport à la matière première dont ils sont issus. Ce rôle sur la conservation des produits est lié à la présence quantitative des bactéries lactiques dans les produits fermentés ou elles dépassent généralement 10^6 bactéries/g d'aliment, exerçant ainsi un phénomène de compétition vis-à-vis des autres flores. A ce mécanisme, s'ajoutent les propriétés spécifiques d'inhibition des bactéries lactiques qui s'exercent de différentes manières. **(FEDRIGHI., 2005)**

Les bactéries lactiques produisent divers composés tels que les acides organiques, le diacétyle, le peroxyde d'hydrogène, le CO₂ et/ou les bactériocine pendant les fermentations lactiques **(ANDERSSEN *et al.*, 1998; OYETAYO *et al.*, 2003 et DEEGAN *et al.*, 2006).**

Les composés antimicrobiens produits par les BL peuvent empêcher la croissance des bactéries pathogènes; contaminants possibles des produits fermentés **(ANDERSSON, 1986 ; GILL et HALLEY, 2003 et GUESSAS *et al.*, 2006).**

II.1. Acides organiques

Qu'elles soient homofermentaires ou hétérofermentaires, les bactéries lactiques produisent différents types d'acides organiques. Donc cette fermentation est caractérisée par l'accumulation d'acides organiques qui s'accompagne d'une réduction du pH **(GOULD, 1991 et PODOLAK *et al.*, 1996).**

L'acide lactique est le métabolite principal des BL causant la réduction du pH qui inhibe largement de microorganismes **(EKLUND, 1989 et SCHNÜRER et MAGNUSSON, 2005).** La forme non dissociée et plus hydrophobe de l'acide se répand au-dessus de la membrane des cellules et se dissocie à l'intérieur de la cellule, libérant les ions H⁺ qui acidifient le cytoplasme **(PIARD et DESMAZEAUD, 1991).** En plus de l'effet du pH, l'acide non dissocié fait chuter le gradient électrochimique de proton, entraînant la bactériolyse et finalement la mort des bactéries sensibles **(EKLUND, 1989).**

Les BL hétéro fermentaires produisent en plus, de l'acide acétique qui possède un plus haut pKa que l'acide lactique, ont donc une proportion plus élevée d'acide non dissocié à un certain pH semblable avec l'acide lactique. Les acides acétiques et propioniques agissent l'un sur l'autre sur les membranes de cellules pour neutraliser le gradient électrochimique de proton, mais l'effet de l'acide acétique et propioniques dépend souvent

de la diminution du pH provoqué par l'acide lactique (EKLUND, 1989). L'acide propionique et acétique empêchent également l'assimilation d'acide aminé (FREESE *et al.*, 1973 et EKLUND, 1989).

II.2. Acides gras

Dans certaines conditions, quelques *lactobacilles* et *lactocoques* possédant des activités lipolytiques peuvent produire des quantités significatives d'acides gras, par exemple dans la fermentation du lait fermenté (RAO *et al.*, 1984).

L'activité antimicrobienne des acides gras a été identifiée pendant plusieurs années. Les acides gras insaturés présentent une activité contre les bactéries à Gram+, et l'activité antifongique des acides gras dépend de la composition, de la concentration, et du pH du milieu (GOULD, 1991).

II.3. Peroxyde d'hydrogène

La catalase, enzyme nécessaire à la dégradation du peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau, est absente chez les bactéries lactiques. Il en résulte une accumulation de ce composé qui peut être inhibiteur de différents micro-organismes (ZALAN *et al.*, 2005).

En général, les bactéries lactiques sont capables de transformer l'oxygène moléculaire (O_2) en super oxyde excité (O_2^-), en peroxyde (H_2O_2) ou en eau (H_2O). Ces réactions sont catalysées par des enzymes spécifiques généralement en présence d'un substrat à oxyder. Ces enzymes ont été trouvées chez des souches de *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* (CONDON, 1987). Ce composé bloque le fonctionnement de certaines enzymes-clés intervenant dans la glycolyse résultant l'inhibition de la croissance des microorganismes (DESMAZEAUD, 1996) ainsi la peroxydation des lipides de membrane; de ce fait provoque l'accroissement de la perméabilité membranaire (KONG et DAVISON, 1980).

H_2O_2 peut également agir comme précurseur pour la production de radicaux libres bactéricides tels que le superoxyde (O_2^-) et radicaux d'hydroxyle (OH) qui peuvent endommager l'ADN (BYCZKOWSKI et GESSNER, 1988).

II.4. Dioxyde de carbone (CO₂)

Le CO₂ est principalement produit par les BL hétérofermentaires, qui peut jouer un rôle antimicrobien en créant un environnement anaérobique, qui empêche les décarboxylations enzymatiques (EKLUND, 1984), et l'accumulation de CO₂ dans la bicouche lipidique peut provoquer un dysfonctionnement de la perméabilité membranaire. (DORTU *et* THONART, 2009).

II.5. Acétaldéhyde

Chez *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus*, l'action d'une thréonine aldolase, clive la thréonine en acétaldéhyde et en glycine. L'acétaldéhyde à une concentration de 10 à 100 ppm empêche la croissance de *Staphylococcus aureus*, de *Salmonella typhimurium* et d'*E. Coli* dans les produits laitiers (PIARD *et* DESMAZEAUD, 1991). Les quantités d'acétaldéhyde produites par les *lactocoques* oscillent entre 2,60 et 6,50 mg/ml (BOTTAZZI *et* DELLAGLIO, 1967). La contribution de l'acétaldéhyde à la biopréservation est mineure puisque le seuil de saveur est beaucoup inférieur aux niveaux qui sont considérés nécessaires à l'inhibition des microorganismes (KULSHRESTHA *et* MARTH, 1974).

II.6. Di acétyle (2,3- butanédione)

Le diacétyle est produit suite à la dégradation du citrate, il est synthétisé par différentes espèces de bactéries lactiques appartenant à plusieurs genres comme *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* *et* *Pediococcus*. Il présente des propriétés antimicrobiennes contre les levures, les bactéries Gram négatif et les bactéries Gram positif non lactiques. La concentration nécessaire à l'obtention d'une inhibition dépend essentiellement du microorganisme cible (DORTU *et* THONART, 2009).

II.7. Reutéline (ou 3-hydroxypropionaldehyde)

La reutéline est produite par *Lactobacilles reuteri*, une espèce hétérofermentaire dont la niche écologique est l'appareil gastro-intestinal des humains et des animaux (AXELSSON *et al.*, 1989).

La reutéline est un métabolite intermédiaire qui possède un effet antimicrobien. Il est produit lors de la fermentation anaérobique du glycérol par certaines espèces de *Lactobacillus* ainsi que par d'autres genres bactériens non lactiques (EL-ZINEY *et al.*,

1998). La reutérine possède un large spectre d'activité et a des applications aussi bien dans le domaine médical que dans le domaine alimentaire (VOLLENWEIDER, 2004).

La reutérine montre un large spectre d'activité antimicrobienne contre certaines bactéries à Gram+ et à Gram-. Les organismes de détérioration sensibles à la reutérine comprennent *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Candida*, et *Trypanosoma* (AXELSSON *et al.*, 1989).

II.8. Reutéricycline

Certaines souches de *Lactobacillus reuteri* secrètent d'autres substances antimicrobiennes, reutericycline. On a remarqué que la concentration d'inhibition minimale de cette molécule est de 0.05-1 mg/L pour les bactéries à gram positives. Tandis qu'on n'a pas trouvé aucune sensibilité des bactéries à gram négative et les champignons à la reutéricycline (OUWEHAND *et al.*, 1996).

II.9. 2-pyrrolidone-5-carboxylic Acide

Ou PCA cette molécule est surtout produite par *Lactobacillus casei ssp.casei*, *L.casei ssp. Pseudopantarum* et *Streptococcus bovis*. Elle est présente aussi dans les fruits, les légumes. Elle inhibe les *Bcillus subtilis*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas putida* et *Pseudomonas fluorescens*. Elle est stable à la grande température (121°C/20min) mais elle perd son activité inhibitrice quand le pH est de 2,5. PCA est reconnu comme un fort agent antimicrobien comme l'acide lactique. Et son mécanisme d'action est le même que les acides organiques (OUWEHAND *et al.*,1996).

II.10. Bactériocines

La première découverte des bactériocines a été signalée il y a presque un siècle, lorsque GRATIA (1925) a démontré l'inhibition de souches d'*Escherichia coli* S par une substance thermostable provenant d'une culture d'*E. coli* V. Ces substances inhibitrices ont été appelées colicines en références à l'espèce productrice (FREDERIQ, 1946). L'inhibition de la croissance de différentes bactéries lactiques par un métabolite produit par *S. lactis*, aujourd'hui classifié comme *L. lactis* (MCAULIFFE *et al.*, 2001), est à la base de la découverte de la première bactériocine produite par une bactérie lactique, et ceci en 1928 (ROGERS, 1928). Celle-ci a été décrite par Whitehead cinq ans plus tard et en 1947, elle a été nommée nisine (MATTICK & HIRSCH, 1947). En 1951, d'autres travaux ont prouvé qu'au cours de l'affinage d'un fromage, les clostridies étaient inhibées par la nisine (HIRSCH *et al.*, 1951). C'est à partir de cette date que l'usage des

bactériocines a été recommandé dans la lutte contre les contaminations alimentaires. Selon **KLAENHAMMER (1988)** et **MARGARET & JOHN (2002)**, 99% des espèces bactériennes peuvent produire au moins une bactériocine.

II.10.1. Définition de la bactériocines

Différentes définitions des bactériocines ont été données au cours du temps. Cependant, la définition qui reste la plus largement acceptée est celle de **KLAENHAMMER (1988)** qui définit les bactériocines comme des peptides ou des complexes de peptides (généralement 30 à 60 acides aminés) synthétisés au niveau des ribosomes et qui ont un effet bactéricide ou bactériostatique sur d'autres espèces souvent taxonomiquement proches (**KLAENHAMMER, 1988 ; GARNEAU *et al.*, 2002**). Dans tous les cas, la cellule productrice est immunisée vis-à-vis de l'action de sa propre bactériocine. Les bactériocines représentent une large classe de substances antagonistes qui varient considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leur spectre d'action et de leur mode d'action (**KLAENHAMMER, 1988**). Toutes les bactériocines produites par des bactéries lactiques décrites jusqu'à présent ont une activité dirigée contre les bactéries Gram+. Aucune bactériocine produite par des bactéries lactiques avec une activité contre des bactéries Gram- n'a été décrite, la membrane externe des bactéries Gram- ne permettant pas aux bactériocines d'atteindre la membrane interne, siège de leur activité (**SMULDERS *et al.*, 1986 et EARNSHAW, 1992**).

II.10.2. Classification

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques ont été classées par **KLAENHAMMER (1993)** en quatre classes sur la base de leur poids moléculaire, thermostabilité, sensibilité enzymatique, présence d'acides aminés post-traductionnellement modifiés et mode d'action.

II.10.2.1. Classe I. Les lantibiotiques

Peptides de taille inférieure à 5 kDa, stables à la chaleur et qui contiennent des acides aminés inhabituels soufrés formés post-traditionnellement, c'est-à-dire la lanthionine, la β -méthyl lanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine. Ils peuvent être divisés en deux types : la classe Ia qui comprend des peptides cationiques hydrophobes allongés contenant jusqu'à 34 acides aminés et la classe Ib qui comprend les peptides globulaires chargés négativement ou sans charge nette et contenant jusqu'à 19 acides aminés

(MCAULIFFE *et al.*, 2001 ; TWOMEY *et al.*, 2002). Les séquences et structures d'un antibiotique de chaque type se trouvent à la figure 01.

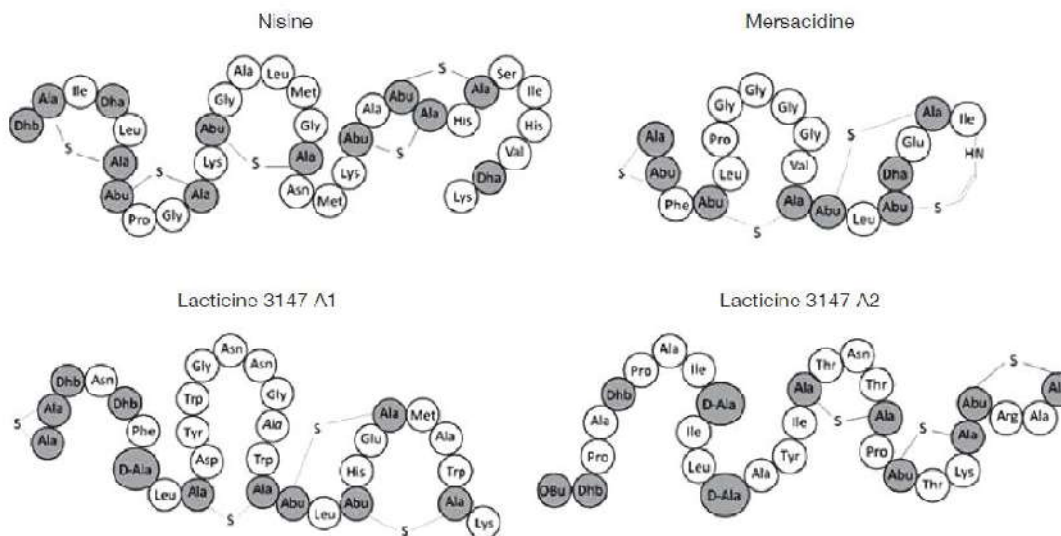


Figure 01 : Séquence et structure de antibiotiques de type A (Nisine), B (Mersacidine) et d'un antibiotique « two-peptides » (Lacticine 3147 A1 et A2) — *Sequence and structure of a type A antibiotic (Nisin), a type B antibiotic (Mersacidin) and a « two-peptides » antibiotic (Lacticin 3147 A1 and A2)* (NIGUTOVA *et al.*, 2007)

II.10.2.2. Classe II. Bactériocines non modifiées

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

- **Sous classe IIa** : Sont des peptides composés de 36 à 48 acides aminés (DRIDER *et al.*, 2009). Ont une partie N-terminal hydrophobe contenant la séquence consensus YGNGV ainsi qu'un pont disulfure et une partie C-terminale moins conservée, hydrophobe ou amphiphile qui détermine la spécificité d'action (FIMLAND *et al.*, 2000 ; RICHARD *et al.*, 2006). Les bactériocines de classe IIa sont actives contre les bactéries des genres *Listeria*, *Enterococcus*, *Lactococcus* (CALVEZ *et al.*, 2009).
- **Sous classe II b** : La sous classe II b représente les bactériocines à deux composants peptidiques qui y a un nombre d'acides aminés compris entre 30 et 40. Ces peptides, sont cationiques et portent des régions amphiphiles et ou hydrophobes (CALVEZ *et al.*, 2009). les deux types de bactériocines, type E (Enhancing) ou la fonction de l'un des deux peptides est d'augmenter l'activité de l'autre et le type S (Sunergy) ou les peptides sont complémentaires (CARINE *et al.*, 2009).

- **Sous classe IIc** : Contient les bactériocines activées par réduction du groupement thiols telle que la lactococine B. La classification actuelle définit les bactériocines de la sous classe II c comme étant les bactériocines n'ayant pas toutes les caractéristiques de sous-classes IIa et II b (CALVEZ *et al.*, 2009).

II.10.2.3. Classe III. Les bactériocines à haute poids moléculaire

Protéines de taille supérieure à 30 kDa et sensibles à la chaleur. La structure et le mode d'action de ces bactériocines diffèrent complètement des autres bactériocines produites par les bactéries lactiques. Cette classe ne contient que quatre bactériocines : l'helveticine J produite par *Lactobacillus helveticus* A, l'enterolysine A produite par *Enterococcus faecium*, la zoocine A produite par *Streptococcus zooepidemicus* et la millericine B produite par *Streptococcus milleri* (NILSEN *et al.*, 2003 ; PAPAGIANNI, 2003 ; NIGUTOVA *et al.*, 2007).

Tableau 02 : Les quarts Bactériocines de classe III produites par des bactéries lactiques. (NILSEN *et al.*, 2003 ; PAPAGIANNI, 2003 ; NIGUTOVA *et al.*, 2007).

Bactériocines	Espèce producteur
Helveticin	<i>Lactobacillus helveticus</i> A
Enterolysine A	<i>Enterococcus faecium</i>
Zoocin A	<i>Streptococcus zooepidemicus</i>
Millericin B	<i>Streptococcus milleri</i>

II.10.2.4. Classe IV

Peptides possèdent une partie carbohydratée ou lipidique pour avoir une activité. Aucune bactériocine de cette classe n'a été décrite (DORTU et THONART, 2009).

II.10.3. Production et le conditionnement des bactériocines

Les bactériocines sont généralement produites à la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire de croissance. Elles peuvent ensuite être dégradées par les protéases produites par la bactérie lactique productrice (SAVIJOKI *et al.*, 2006)

Les conditions de culture influencent fortement la production de bactériocines. En effet, l'optimisation de la croissance ne résulte pas nécessairement en l'optimisation de la production de bactériocines (PARENTE *et al.*, 1999). Il a même été suggéré que des conditions de croissance défavorables permettent de stimuler leur production (VERLUYTEN *et al.*, 2004).

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

II.10.4. Mode d'action

Le mode d'action de la nisine est sans doute le plus étudié en raison de sa découverte plus ancienne et de son utilisation dans le domaine agro-alimentaire. Les bactéries Gram + sont caractérisées par une forte teneur en lipide de la membrane anionique du caractère cationique des bactériocines. Le rôle des lipides anioniques dans la liaison membrane a été souligné. (**MOLL et al., 1999**). Bien que les bactériocines des bactéries lactiques puissent travailler via différents mécanismes pour exercer un effet antibactérien, l'enveloppe cellulaire est généralement la cible (**DEEGAN et al., 2006**).

II.10.4.1. Les lantibiotiques

Les lantibiotiques interagissent avec la membrane cellulaire par des interactions électroniques ou par liaison à des récepteurs spécifiques tels que le lipide II (undecaprenyl-pyrophosphoryl-Mur NAC-pentapeptides-GlcNAC) un précurseur de peptidoglycane. Suite à cette liaison, les lantibiotiques peuvent former des pores larges et non spécifiques dans la membrane cytoplasmique, ce qui va causer l'efflux rapide des petits composés cytoplasmiques tels que les ions, les acides aminés, l'ATP etc. (**CARINE et al., 2009 ; CALVEZ et al., 2009**). Cette augmentation de la perméabilité membranaire va conduire à la dissipation des deux composants de la force proton motrice, à la cessation rapide des

activités cellulaires et à la mort de la cellule. L'interaction avec le lipide permet d'augmenter la stabilité des pores formés et de la concentration du lantibiotique nécessaire à la formation des pores, mais également conduire à l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire. (PATTON *et al.*, 2005) Le groupe de lacticine 481 forment des pores dans la membrane le même mécanisme que ce de groupe de nisine avec dissipation de la force proton motrice et de la concentration d'ATP intracellulaire par contre le groupe de Mersacidine interagit d'une façon différente que la nisine puisque des travaux ont montré que l'action d'un de ces deux lantibiotiques n'empêchait pas l'action de l'autre. Ces deux bactériocines reconnaîtraient donc des sites différents au niveau du lipideII (CALVEZ *et al.*, 2009). Alors que les lantibiotiques du groupe cinnamycine interagissent avec d'autres lipides spécifiques les phosphatidiléthanolamines. Tandis que le groupe de lactocine vont interagit avec la membrane plasmique (DRIDER *et al.*., 2009). Le dernier groupe bactériocine à deux composants, ont une activité différente, le peptide A1 semble se lier au récepteur lipide II et inhiber ainsi la formation de peptidoglycane tandis que le peptide A2 permettrait la formation de pores et le relargage du potassium cellulaire. (MORISSET *et al.*, 2002).

II.10.4.2. La classe II

Se base sur l'interaction de la bactériocine avec la membrane ou un récepteur spécifique, la « mannose perméase », pour former un pore dans la membrane de la bactérie cible ce qui résulte une perméabilité de cette dernière et par la suite la mort de la cellule (HECHARD *et al.*, 2001 ; GRAVESEN *et al.*, 2002 ; AROUS *et al.*, 2004 ; BAUER *et al.*, 2005).

- **Sous classe IIa** : les bactériocines de classe IIa entraînent une perméabilisation des membranes cibles provoquant un déséquilibre de la balance ionique et une fuite de Pi (phosphate inorganique). Ceci a pour conséquence une dissipation de la force motrice des protons (PMF) une dissipation du gradient de pH et dissipation partielle du potentiel transmembranaire ainsi qu'un efflux de K⁺ et d'acides aminés. Tous ces événements fragilisent la cellule cible et entraînent la mort cellulaire (DRIDER *et al.*., 2009).ou bien une interaction de la bactériocine avec la membrane ou un récepteurs spécifique le mannose perméase, pour ensuite former un pore dans la membrane de la cellule, ce qui induit la perméabilisation de la membrane, la dissipation des deux composantes de la force proton motrice et la mort de la cellule.(CARINE *et al.*, 2009).

- **Sous classe IIb** : elles forment des pores et rendent la membrane perméable à différentes petites molécules des cations monovalents ou des anions, ce qui dissipe une ou les deux composantes de la force proton motrice (**OPPEGARD *et al.*, 2007**).
- **Sous classe IIc** : les études portant sur le mode d'action de ces bactériocines montrent qu'il existe plusieurs modes d'action en fonction de la bactériocine. Par exemple la lactococcine A provoque une dissipation du potentiel de membrane et la sortie d'acides aminés dans le milieu extracellulaire (**CALVEZ *et al.*, 2009**).

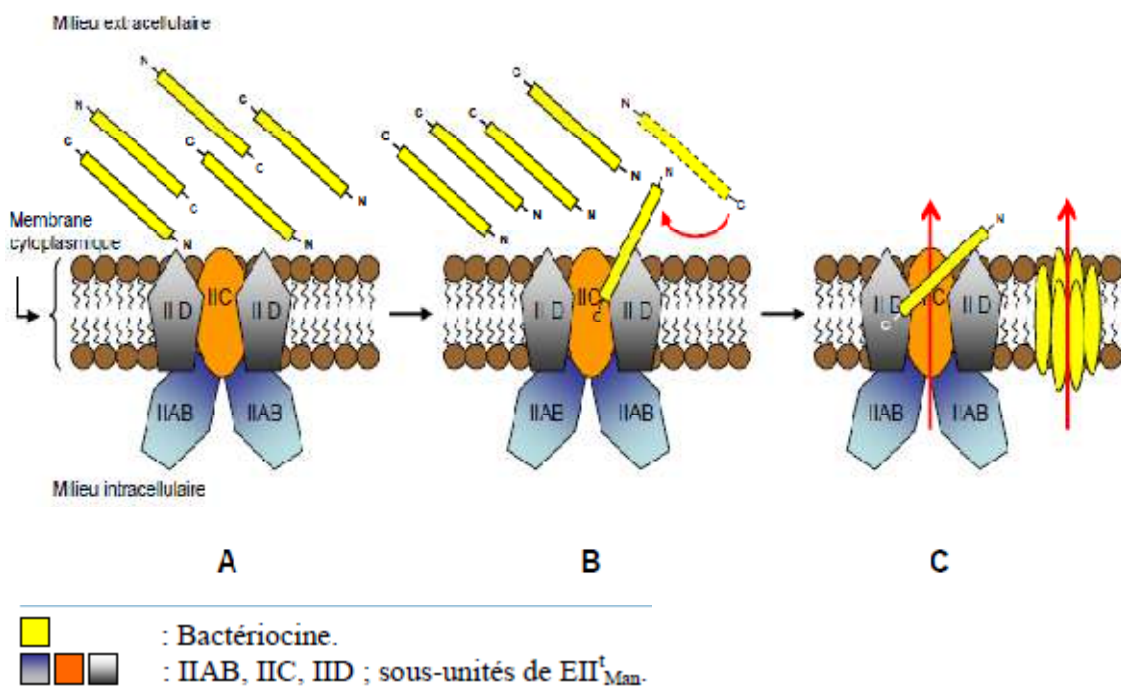


Figure 02 : Mode d'action utilisé par les bactériocines de classe IIa et par les lactococines A et B (classe IIc) d'après (**DIEP *et al.*, 2007**).

- **Formation des pores** : Différents modèles de formation des pores ont été proposés au cours des années. Pour la lantibiotique nisine, la formation de pore se produit à travers une série des étapes distinctes. Le modèle coin-interstitielle (wedge-like) de la nisine induite la formation des pores (**DRIESSEN *et al.*, 1995**) peuvent impliquée une force proton motrice motif conduit à une Co-insertion des lipides et des domaines nisine (Figure 2A). La charnière (s) dans la molécule de nisine peut permettre la flexion de la partie C-terminale et donc son insertion dans la membrane. Multiples molécules de la nisine inséré peut donner lieu à une perturbation locale importante de l'organisation de la bicouche lipidique entraînant la formation de pore lipide-protéine transitoires. Ces structures sont

intrinsèquement instables en raison des forces hydrophobes qui conduiront le réarrangement des lipides dans leur organisation originale. Lors de l'insertion membranaire, les bactériocines de classe II On pense qu'il ya formation d'un faisceau de peptides α -hélice beaucoup plus proche d'un tonneau de bois debout (barrel-stave) (figure 2B). (MOLL *et al.*, 1999)

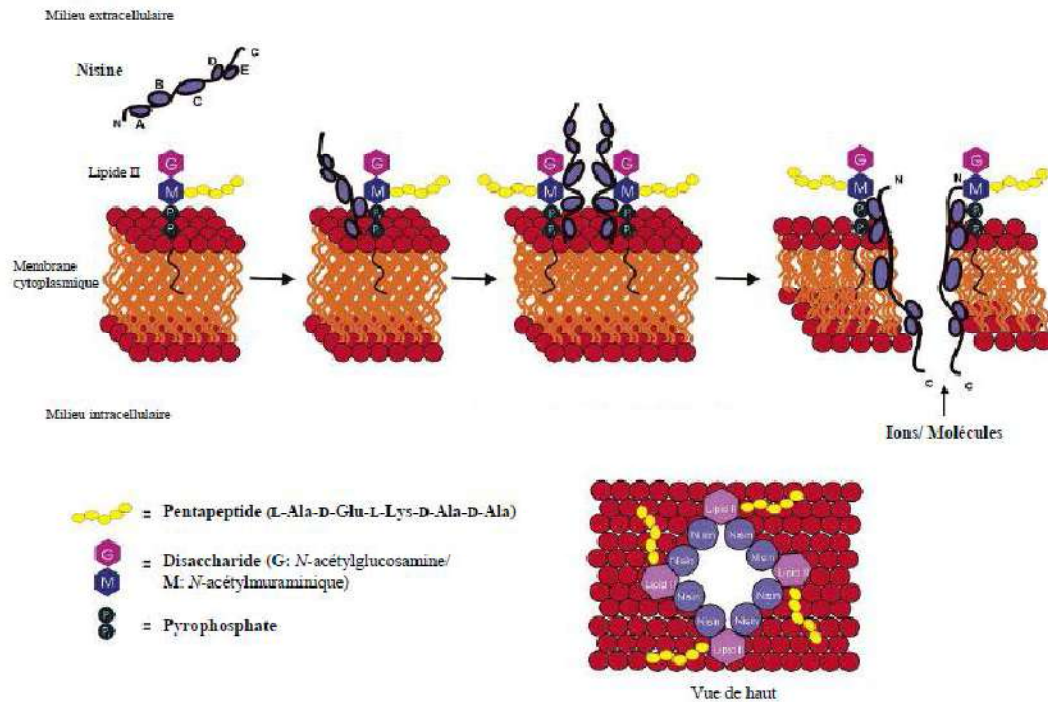


Figure 03: Formation de pores membranaires par le complexe nisine-lipide II (CHATTERJEE *et al.*, 2005).

II.10.4.3. Les bactériocines de Class III

Ils se diffèrent totalement des autres bactériocines. En effet, l'entérolysine A, la zoocine A et la milléricine B agissent par l'hydrolyse des liens peptidiques des peptidoglycanes des cellules sensibles (DORTU et THONART, 2009).

II.10.5. Application biotechnologique des bactériocines des bactéries lactiques

II.10.5.1. Applications des bactériocines dans l'industrie alimentaire

La bioconservation des aliments fait l'objet depuis 40 ans de nombreuses études. Elle consiste en une augmentation de la durée de vie et une amélioration de la sécurité sanitaire des produits alimentaires, en utilisant des microorganismes et/ ou leurs métabolites (ROSS *et al.*, 2002 ; STILES, 1996).

Les bactériocines sont habituellement reconnues comme sûres, sont sensibles aux

protéases digestives et ne sont pas toxiques pour les cellules eucaryotes (WIJAYA *et al.*, 2006). Elles ont une grande tolérance aux variations de pH et aux traitements thermiques. Leur spectre antimicrobien peut être larges ou étroit, elles peuvent donc cibler sélectivement des bactéries pathogènes ou altérantes sans inhiber les bactéries indispensables et ont un mode d'action bactéricide (GALVEZ *et al.*, 2007). Les bactériocines doivent cependant être considérées comme un moyen de préservation complémentaire à ceux déjà existant (DEEGAN *et al.*, 2006). Seule la nisine est autorisée à l'utilisation comme additif alimentaire (E234).

Applications	Bactériocines	Classe	Effets	Références
Dans les produits laitiers	Nisine	I	Prévenir la prolifération d'endospores par <i>Cl. botulinum</i> et la contamination par <i>Li. monocytogenes</i> dans le fromage	(Wirjantoro <i>et al.</i> , 2001)
	Lacticine 3147	I	Inhibition de <i>Li. monocytogenes</i> dans les yaourts naturels et le fromage écrémé	(Morgan <i>et al.</i> , 2001)
	Pédiocine PA-1/ AcH	IIa	Inhibition de <i>Li. monocytogenes</i> dans les fromages blancs, crèmes et sauces à base de fromage	(Rodriguez <i>et al.</i> , 2002)
	Entérocoque AS-48	IIc	Inhibition rapide de <i>Li. monocytogenes</i> et inhibition lente de <i>Sta. aureus</i> dans le lait écrémé	(Ananou <i>et al.</i> , 2010)
Dans les viandes et les volailles	Nisine	I	En combinaison avec des acides organiques, lysozyme, chélateurs	Décontamination des surfaces de préparations de viandes crues (Thomas <i>et al.</i> , 2000)
		I	Sous forme de film, activée par de l'EDTA	Inhibition des entérobactéries et des espèces appartenant à <i>Carnobacterium</i> dans les tranches de bœuf pendant la réfrigération (Ercolini <i>et al.</i> , 2010)
	Pédiocines	I	En combinaison avec HPH	Inhibition d' <i>E. coli</i> et des <i>Staphylococcus</i> sp. dans le jambon cuit (Garriga <i>et al.</i> , 2002)
Dans les poissons	Nisine	IIa	Inhibition de <i>Li. monocytogenes</i> dans les viandes crues	(Rodriguez <i>et al.</i> , 2002)
		I	Traitée à la chaleur (65°C)	Inhibition totale de <i>Li. innocua</i> dans le caviar d'esturgeon ou de saumon (ikura) (Al-Holy <i>et al.</i> , 2004)
		I	Immobilisée à des films plastiques	Inhibition de <i>Li. monocytogenes</i> dans le saumon fumé pendant la réfrigération (Neetoo <i>et al.</i> , 2008)

Tableau 03 : Exemples d'applications des bactériocines comme conservateurs alimentaires d'après Gálvez, A. *et al.* (GALVEZ *et al.*, 2011).

II.10.5.2. Applications des bactériocines dans le secteur médical

L'émergence de la résistance aux antibiotiques conventionnels ces dernières années a orienté la recherche vers l'étude de nouveaux agents antimicrobiens. Le mode d'action des bactériocines qui diffèrent de ceux des antibiotiques conventionnels et l'innocuité des

bactériocines permettraient leur utilisation comme alternative aux antibiotiques dans la prévention et/ ou le traitement des infections dues à des bactéries devenues résistantes aux traitements conventionnels (**DICKS *et al.*, 2011**). Contrairement aux applications alimentaires des bactériocines, aucune de bactériocine n'est à ce jour commercialisée comme médicament.

Cependant, quelques-unes d'entre elles sont en cours d'essais cliniques pour le traitement d'infections cutanées, respiratoires, systémiques et/ ou urogénitales ainsi qu'en tant qu'agents contraceptifs parmi elles la rBPI21 en phase clinique III pour le traitement de la méningite (**HANCOCK, 2000**).

Chapitre III-
Les bactéries
multi résistantes

III. Bactéries multirésistantes

III.1. Définition d'une bactérie multirésistante (BMR)

Une bactérie est considérée comme résistante à un antibiotique quand la concentration de cet antibiotique au site de l'infection n'est pas suffisamment élevée pour inhiber la multiplication de cette bactérie ou de la tuer (**POOLE, 2004**)

Les bactéries sont dites multirésistantes aux antibiotiques lorsque, du fait de l'accumulation des résistances naturelle et acquises elles ne sont sensibles au maximum qu'à un petit nombre qui se situent entre 0 et 3 de familles ou sous-familles d'antibiotiques utilisables en clinique avec une probabilité forte d'inefficacité thérapeutique. (**ANDREMONT, 1997 ; VINCENT .J,2000**).

III.2. Principaux BMR

III.2.1. *Staphylocoques*

Les bactéries du genre *Staphylococcus* sont des photogènes humains anciens, fréquents, polyvalents et importants, ont été décrits par Robert Koch en 1878 et cultivés par Louis Pasteur en 1880 (**JOHN, 2002**).

Ce sont des cocci à Gram positif, généralement groupés en amas ayant la forme de grappes de raisin, immobiles, non sporulés. *Staphylococcus aureus* est une bactérie commune présente sur la peau et les membranes muqueuses chez 20 à 30 % des personnes en bonne santé et chez les animaux. Ce sont en effet des bactéries qui peuvent être inoffensifs, commensaux ou provoquer des infections d'une extrême gravité (**FLEURETTE ,1989**)

Staphylococcus aureus, qui produit enzyme coagulase et dont les colonies sont généralement jaunes dorées, est le principal agent pathogène humain. C'est un pyogène qui possède 4 caractéristiques spécifiques : Virulence ; Diversité ; Persistance ; Résistance. Il est Oxydase(-), Catalase(+), Glucose(+), ADH(+), Mannitol(+), Coagulase(+), phosphatase(+) et DNASE(+). Les staphylocoques poussent sur milieux ordinaires en 18 à 24h à une température de 37°C (entre 10 à 40°C), ils sont aéro-anaérobies facultatifs. Fermente le mannitol sur milieu de Chapman (**OSMAN, 2011**).

III.2.2. Entérocoques

Le genre Entérocoque est constitué de cocci à Gram positif groupés par paires ou en courte chaînette, disposés en diplocoque, ovoïde, pousse en milieu hostile, bile esculine, résiste aux Na Cl à 6,5 % ; ils peuvent être pathogènes opportunistes; ce sont commensaux du tube digestif, chez l'homme et chez l'animal. Leur habitat et leur résistance aux antibiotiques expliquent que les entérocoques soient responsables de plus de 10% des infections nosocomiales (**OSMAN, 2011**)

Les entérocoques font partie des bactéries qui colonisent le tube digestif de l'homme (**CETINKAYA et al., 2000**). Il est responsable d'infection humaine, principalement dues à *Enterococcus faecalis* (80 % à 90 % des cas) et à *Enterococcus faecium* (5 à 10 % des cas) tandis que les autres espèces occasionnellement retrouvées sont *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus seliflavus* , *Enterococcus durans* , *Enterococcus avium* et *Enterococcus hirae* (**MURRAY BE, 1990**).

III.2.3. Entérobactéries

Les entérobactéries constituent un grand groupe de bactéries ayant une forte similitude. La création de ce groupe a été proposée par Rahn en 1937 qu'il dénomma *Enterobacteriaceae* (**JOLY et REYNAUD, 2007**).

44 genres sont regroupés en cinq tribus, d'après leurs propriétés fermentatives: *Escherichiae*, *Klebsielleae*, *Proteae*, *Yersinia* et *Erwiniae*. Les genres les plus communément isolés en bactériologie clinique sont: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* et *Yersinia*. La famille des *Enterobacteriaceae* est constituée des genres bactériens rassemblés sur la base de caractères bactériologiques communs:

- ✓ Ce sont des bacilles à Gram négatif dont les dimensions varient de 1 à 6 µm de long et de 0.3 à 1 µm de large;
- ✓ Immobiles (*Klebsiella*, *Shigella* et *Yersinia pestis*), ou fréquemment mobiles grâce à une ciliature péritriche;
- ✓ Se développant en anaérobiose facultative et sur gélose nutritive ordinaire;
- ✓ Oxydase négative, catalase positive (sauf *Shigella dysenteriae* sérotype I);
- ✓ Réduisent les nitrates en nitrites;
- ✓ Fermentent le glucose avec ou sans production de gaz (**SOUNA, 2011**).

III.2.3.1. *Escherichia coli*

Isolée pour la première fois par Escherich en 1885, *Escherichia coli* est l'espèce bactérienne qui a été la plus étudiée par les fundamentalistes pour des travaux de physiologie et de génétique (AVRIL *et al.*, 2000).

Elle représente l'espèce type de genre *Escherichia*. Appelée communément « colibacille » cette espèce possède des caractères biochimiques particuliers permettant de la différencier des espèces voisines. La production d'indole à partir de tryptophane, l'absence d'utilisation du citrate comme source de carbone et l'absence de production d'acétoïne (réaction de Voges Proskauer négative) (JOLY et REYNAUD, 2007).

Escherichia coli se retrouve en abondance dans la flore commensale humaine, en particulier dans le tube digestif de l'homme qu'elle colonise dès les premières heures de la naissance. Elle constitue l'espèce dominante de la flore aérobie anaéro-tolérante (AHOYO *et al.*, 2007; BONACORSI *et al.*, 2001).

Les *colibacilles*, hôtes normaux de l'intestin, ne provoquent normalement pas de maladie. Cependant ils possèdent un potentiel pathogène qu'ils expriment dans certaines circonstances (pathogènes opportunistes) (CHU-PS, 2003). C'est une des espèces bactériennes les plus souvent rencontrées en pathologie humaine. La plupart sont commensales, mais certaines souches possèdent des facteurs de virulence qui leur permettent de déclencher des diarrhées. *Escherichia coli* est une cause majeure de diarrhée aigue dans le monde (BERCHE, 2003). A côté des infections intestinales, elle est responsable d'infections extra-intestinales diverses: urinaires, abdominale, méningées et les bactériémies (FAUCHERE et AVRIL, 2002).

III.2.3.2. *Salmonelle*

KAUFFMANN, le pionnier de l'analyse du genre *Salmonella*, avait individualisé sur la base de tests phénotypiques et de tests sérotypiques plusieurs sous-genres et de très nombreuses espèces de *Salmonella* (*Salmonella typhi*, espèce responsable de la fièvre typhoïde) (WEILL, 2009). Depuis 2005, une nouvelle nomenclature est en vigueur sur le plan international (TINDALL *et al.*, 2005).

Des études moléculaires (hybridations ADN-ADN) ont révélé la présence de seulement deux espèces dans le genre *Salmonella* (*S. enterica*, espèce majoritaire et *S.*

bongori, espèce rare). *S. enterica* est elle-même subdivisée en six sous-espèces. L'espèce *bongori* et les différentes sous espèces *d'enterica* sont ensuite sub-divisées sur la base du sérotypage en de très nombreux sérotypes.

À ce jour, plus de 2500 sérotypes (ou sérovars) sont décrits (POPOFF, 2001). Le réservoir des bactéries du genre *Salmonella* est principalement le tube digestif des vertébrés. De très nombreuses espèces animales hébergent ces agents pathogènes (volailles, bovins, porcs, poissons, reptiles,....). La sous-espèce *enterica* est plutôt adaptée aux animaux à sang chaud et à l'homme (WEILL, 2009).

Les *salmonelles* sont responsables de fièvres typhoïdes et de salmonelloses non typhiques qui représentent une cause majeure de diarrhées dans le monde avec un taux important de mortalité infantile (DAGNRA *et al.*, 2007).

III.2.3.3. *Klebsiella*

Les *Klebsiella* sont des bactéries immobiles, en diplobacilles, généralement capsulées (DELARRAS, 2007) et fermentent de nombreux sucres avec production de gaz, mais elles ne sont pas protéolytiques (FAUCHERE et AVRIL, 2002). Sur milieu gélosé, les colonies sont caractéristiques: elles sont volumineuses, bombées, brillantes et très visqueuses à cause de la capsule (FAUCHERE et AVRIL, 2002).

Le genre *Klebsiella* comporte actuellement cinq espèces dont l'espèce type est *Klebsiella pneumoniae*, germe très répandu dans la nature (sol et eau), saprophyte des voies respiratoires supérieures et il est l'agent des surinfections respiratoires (LAMNAOUER, 2002).

Klebsiella pneumoniae est un pathogène à fort potentiel épidémique fréquemment impliqué dans des infections sévères. De nombreuses épidémies nosocomiales causées par cette bactérie ont été décrites, notamment chez des patients hospitalisés dans des unités de soins intensifs adultes ou pédiatriques (CARRÈR et NORDMANN, 2009; BOUKADIDA *et al.*, 2002).

III.2.4. *Pseudomonas*

Le genre *Pseudomonas* de la famille des *Pseudomonaceae* est un bacille Gram négatif, n'appartient pas à la famille des *Entérobactériaceae*, mais considéré comme une *entérobactérie*, car il végète dans le tube digestif des animaux à sang chaud et peut se

comporter comme un pathogène opportuniste. A la différence des *Enterobactériaceae*, chez La majorité des souches de *Pseudomonas*, le métabolisme glucidique n'est pas fermentatif mais oxydatif.

Pseudomonas aeruginosa C'est un bacille, Commensal du tube digestif mais peu abondant chez le sujet sain, il occasionne de nombreuses infections chez les sujets fragilisés. Il produit deux pigments qui diffusent dans le milieu de culture :

- ✓ La pyocyanine, bleu vert, soluble dans le chloroforme et ;
- ✓ La pyoverdine, jaune vert, fluorescent et soluble dans l'eau.
- ✓ Il existe de rares souches produisant d'autres pigments (noir ou rouge) mais surtout 10% de souches sont non pigmentées,
- ✓ Oxydase+ (**CHOUDER. N., 2006**).

III.2.5. *Bacillus*

Le genre *Bacillus* appartient à l'embranchement des *Firmicutes*, classe des *Bacilli*, ordre des *Bacillales*, Famille des *Bacillaceae*. Il comprend 268 espèces réparties en 3 groupes sur la base de la morphologie de l'endospore et du corps bactérien. *Bacillus subtilis* appartient au second groupe avec son endospore ellipsoïdale non déformante. (**BOUHAIRI, 2017**)

B. subtilis fait partie des bactéries gram-positives à faible pourcentage en guanine et en cytosine (%GC) dans leur génome. (**MARCHADIER, 2009**) *Bacillus subtilis*, bactérie ubiquitaire à Gram positif, catalase positive, aérobic pouvant se développer en anaérobiose, mobile par des flagelles peritriches, formant des spores très résistantes dont l'élimination efficace nécessite des conditions particulières. Malgré le fait qu'il s'agisse d'une bactérie à faible potentiel pathogène, elle peut donner lieu à de redoutables infections dans certains cas ou encore être à l'origine d'une intoxication alimentaire. C'est également un excellent modèle pour l'étude de la croissance végétative et de la sporulation.

Une colonie de *Bacillus subtilis* est de forme ronde à irrégulière, les bords varient de l'aspect ondulé à fimbrié, elle peut être plate, soulevée ou légèrement convexe de taille (2 à 4 mm), de couleur blanche, blanc cassé ou crème, translucide à opaque à texture mate ou brillante, sèche ou mucoïde. (**BOUHAIRI, 2017**)

III.2.6. *Streptocoque*

Les bactéries des genres *Streptococcus* sont des cocci à Gram positif, se disposent en général en chainettes, parfois par paires, ni mobiles ni capable de sporulation, parfois encapsulés, ce sont des anaérobies facultatifs ; exigeants ayant besoin du sang ou d'autres, milieux riches, certain souche importantes ne se développant que sur les, milieux enrichis en pyridoxine.

Ils peuvent vivre comme commensaux de la peau et des muqueuses, principalement dans nasopharynx, le tube digestif et le vagin.

Streptococcus pyogenes et *Streptococcus pneumoniae* sont des pathogènes agressifs, provoquant des dégâts au niveau des tissus (JOHN, 2002).

Ils sont catalase (-), oxydase (-), optichine (-), nitrate-réductase (-), esculine (-), gélatine (-) (OSMAN, 2011).

III.3. Types de résistances bactériennes

III.3.1. Résistance bactérienne naturelle

La résistance naturelle ou intrinsèque correspond à la résistance de toutes les souches d'une même espèce ou d'un même genre bactérien à un antibiotique. Son support génétique est généralement chromosomique. La résistance naturelle est liée soit à une absence de cible, soit à une imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique (BASSIROU FALL, 1999).

La résistance bactérienne naturelle est permanente et d'origine Chromosomique. Elle est stable, transmise a la descendance (transmission verticale) lors de la division cellulaire, mais elle n'est généralement pas transférable d'une bactérie a l'autre (transmission Horizontale) (SYLVIE, 2009)

III.3.2. Résistance bactérienne acquise

Ce phénomène résulte d'une modification du patrimoine génétique par l'acquisition de gène, en donnant un phénotype bien précis de résistance différent du phénotype sauvage. (JEHL *et al.*, 2003).

C'est une résistance évolutive, elle varie en fonction du temps, de la localisation (épidémie), et de l'utilisation des antibiotiques (**BASSIROU FALL, 1999**).

III.4. Mécanismes de la résistance bactérienne aux antibiotiques

Les bactéries exploitent des stratégies distinctes afin de se défendre contre l'action des antibiotiques

III.4.1. Diminution de la perméabilité

Elle est due grâce à la mutation affectant la structure des porines ou diminuant la synthèse des porines par lesquelles l'antibiotique peut pénétrer dans la bactérie (**LOZNIEWSKI et RABAUD ,2010**).

III.4.2. Efflux actif

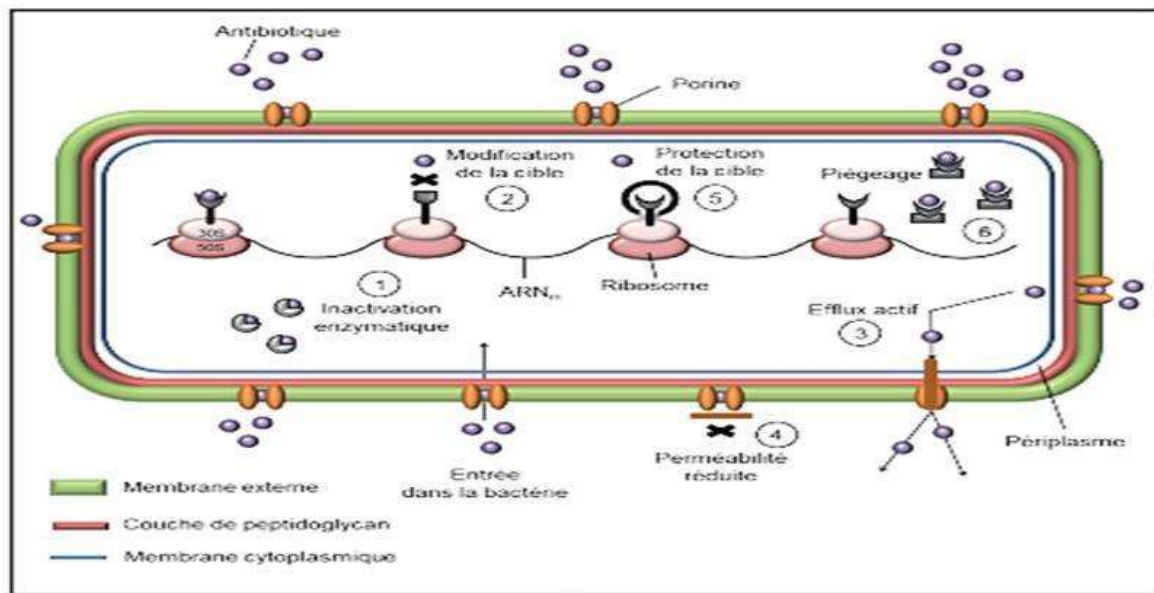
L'efflux repose sur une pompe insérée dans la membrane et capable d'éjecter l'antibiotique hors de la bactérie grâce à un canal ; cet efflux conduit à une diminution de la concentration intracellulaire de l'antibiotique (**MARTINEZ et al ., 2007**).

III.4.3. Inactivation de l'antibiotique

C'est le mécanisme le plus fréquent en pathologie infectieuse. Il s'agit des modifications chimiques des antibiotiques, telle l'hydrolyse de bêta-lactamines par les bêta-lactamases, ou les estérifications des aminosides (**FAUCHERE et AVRIL, 2002**).

III.4.4. Modification de la cible de l'antibiotique

La cible de l'antibiotique peut être structurellement modifiée ou remplacée, de telle sorte que le composé antibactérien ne puisse plus se lier et exercer son activité au niveau de la bactérie. La modification de la cible, est un mécanisme de résistance décrit pour la majorité des antibiotiques (**NIKAIDO, 2009**).



1 : inactivation enzymatique de l'antibiotique, 2 : modification de la cible de l'antibiotique, 3 : efflux actif de l'antibiotique, 4 : perméabilité réduite, 5 : protection de la cible de l'antibiotique, 6 : piégeage de l'antibiotique.

Figure 04 : Différents mécanismes de résistance aux antibiotiques (GUARDABASSI et COURVALIN ,2006).

Partie
expérimentale

*Matériel et
méthodes*

I. Matériel et méthodes

Ce travail consiste à étudier l'activité antibactérienne de certaines souches de bactéries lactiques isolées à partir d'un produit laitier traditionnel à l'égard de quelques bactéries pathogènes au niveau des laboratoires de microbiologie et de biochimie de la faculté des sciences de la nature et de la vie (**Université KASDI Merbah Ouargla**).

Donc cette étude est basé sur :

- ✓ La sélection des bactéries lactiques productrice des substances antimicrobiennes;
- ✓ La détermination de la nature des ces substances inhibitrices.

❖ Matériel biologique

Les espèces des bactéries lactiques proviennent de la collection du laboratoire de microbiologie appliquée du département de biologie de la faculté des sciences, de l'université d'Ouargla, Algérie isolées à partir de fromage traditionnel (J'ben) à base de lait de vache et de chèvre par **DJOUHRI khadra et MADANI Sabrina** pour leur thème : Etude microbiologique d'un produit laitier fermenté traditionnel (J'ben) : isolement et identification des bactéries lactiques en 2014/2015 utilisées comme des souches tests dans le tableau 04.

Tableau 04 : Les espèces des bactéries lactiques utilisées comme des souches tests

Les souches	Souches identifié
Souche 7	<i>Lactococcus lactis subsp lactis</i>
Souche 8	<i>Leuconostoc mesonteroide</i>
Souche 14	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
Souche 18	<i>Lactococcus lactis subsp lactis</i>
Souche 79	<i>Lactococcus lactis</i>
Souche 86	<i>Leuconostoc crémoris</i>
Souche 87	<i>Leuconostoc sp</i>
Souche 96	<i>Lactococcus diacetilactis</i>
Souche 77	<i>Entérocooccus durans</i>
Souche 79	<i>Lactococcus lactis</i>
Souche 115	<i>Entérocooccus durans</i>
Souche 116	<i>Entérocooccus durans</i>
Souche 133	<i>Lactococcus lactis subsp crémoris</i>

Souche 145	<i>Leuconostoc lactis</i>
Souche 148	<i>Lactococcus lactis subsp lactis</i>
Souche 31	<i>Leuconostoc mesenteroide subsp crémoris</i>
Souche 125	<i>Weissella sp</i>
Souche 24	<i>Lactococcus lactis subsp lactis</i>
Souche 85	<i>Lactococcus lactis</i>

- Les bactéries pathogènes référenciées utilisés comme souches indicatrices dans le tableau 05.

Tableau 05 : Les bactéries pathogènes (BMR) utilisées comme souches indicatrices

Les souches	Référence
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC43300
<i>Escherichia coli</i>	ATCC25992
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC6633
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC9027
<i>Salmonella typhi</i>	ATCC14028
<i>Enterococcus faecalis</i>	WDCH0009
<i>Streptococcus Sp421</i>	Isolées à partir des crachats des patients au niveau de service de réanimation d'EPH MOHAMED BOUDIEF, Ouargla.
<i>Klebsiella Sp72</i>	

I.1. Revivification des bactéries lactiques

Les espèces des bactéries lactiques qui ont été conservé dans le glycérol sont ensemencées dans 5ml de milieu MRS liquide, puis incubées à 30°C pendant 24 h.

Après croissance, on les a ensemencées dans le milieu MRS solide, pour les utiliser ultérieurement.

I.2. Revivification des bactéries pathogènes

Et les bactéries pathogènes sont ensemencées dans le bouillon nutritif à 37°C pendant 18h/ ou 24 h.

Après croissance, on les ensemencées dans le milieu dans leur milieu sélectifs ou GN

I.3. Détermination de la substance antimicrobienne produite par les bactéries lactiques

La recherche d'éventuelle production de substances inhibitrices par les bactéries lactiques est réalisée selon la méthode de la double couche. Pour la recherche de l'activité inhibitrice en milieu liquide, surnageant, la méthode de diffusion en puits a été utilisée par **TAGG et MAC GIVEN, (1971)**. Dans les deux cas les bactéries multirésistantes ont été utilisées comme des souches indicatrices. L'inhibition de la bactérie indicatrice est par la production des substances antimicrobiennes par les bactéries productrices. La confrontation entre les mêmes espèces lactiques permet de détecter la présence d'une interaction antagonisme par la présence d'une zone d'inhibition autour des colonies productrices, ce qui nous oriente vers la présence d'une substance antimicrobienne.

I.3.1. Méthode directe de double couche (méthode de **FLEMING et al., 1975**)

En premier lieu, il est nécessaire de mettre en évidence l'activité antibactérienne des souches de bactéries lactiques étudiées. La méthode de spot accordée à **FLEMING et al., (1975)** et **TAGG et al., (1971)**, est utilisée pour la détection des inhibitions (**SCHILLINGER et LUCKE, 1989**). Ce test consiste à déposer un volume de spot de la culture fraîche de 18h de chaque souche lactique (18 souches) sur une gélose MRS. Les boîtes sont laissées à température ambiante pour permettre le séchage des spots, avant de les incuber à 37°C pendant 24h.

En parallèle, une culture fraîche de bactérie pathogène à tester est préparée en la cultivant dans 9mL du bouillon nutritif et incubée à 37°C pendant 18h.

Après l'incubation, 9mL de gélose Mueller Hinton (MH) en surfusion sont inoculés par la souche cible. Puis, le mélange est ensuite coulé sur la couche de MRS, en contact direct avec les spots. Les boîtes sont incubées à 37°C/ 24h. Ce test est répété 2 à 3 fois pour chaque souche cible.

L'activité antibactérienne se révèle par l'apparition de zones claires autour des spots. L'inhibition est considérée positive si la zone dépasse 2 mm de diamètre (**HERNANDEZ et al., 2004**). Le diamètre des zones d'inhibition est mesuré en millimètre et le diamètre du spot n'est pas pris en compte dans l'expression des résultats. La figure 05A représente les étapes suivies pour la réalisation de la méthode de double couche (test des spots).

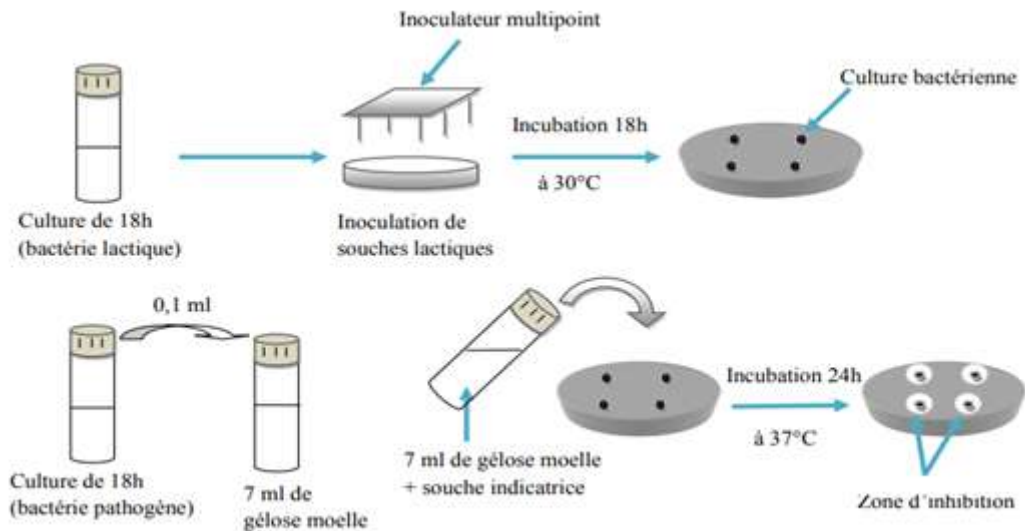


Figure 05 A : Méthode des spots (Fleming *et al.*, 1975)

Ou bien, Dans des boites de Pétri contenant le milieu MRS, on inonde la préculture des bactéries cibles et à l'aide d'un écouvillon on reparti par des stries très serrées la suspension versée.

Laissée sécher devant le bec benzène ensuite on ensemece par touche les bactéries lactiques susceptibles d'avoir un pouvoir de produire des bactériocines. On incube à 30°C/24h, pour la détermination des zones d'inhibition qui se manifeste par la présence de zones claire autour d'un trouble formée par la croissance des souches cibles.

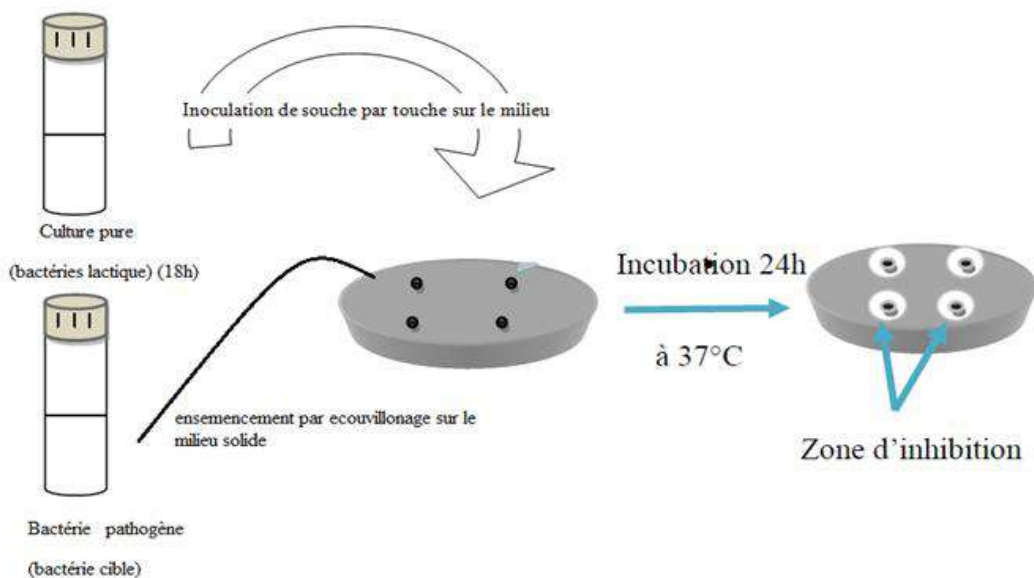


Figure 05 B : Méthode des spots (Fleming *et al.*, 1975)

I.3.2. Méthode de détection indirecte / Méthode des puits (BAREFOOT et KLAENHAMMER, 1983)

Parmi les techniques montrées pour la détection des souches lactiques productrices de bactériocines ; la méthode des puits qui est basée sur le principe de la capacité de ces substances à se diffuser dans le milieu de culture solide ou semi solide.

On inonde sur le milieu MRS, Miller-Hinton ou la gélose nutritive des souches pathogènes cibles (citées dans le tableau n°05). Pendant qu'on le laisse séché ; on prépare le surnageant comme suivant :

Préparation de surnageant : on centrifuge 15 ml de la suspension bactérienne préparé la veille afin d'obtenir une culture jeune 4000 tours/ 30min ensuite on neutralise le surnageant par NaOH 4N de façon à obtenir un pH de 6,8 (l'élimination de l'effet de l'acide lactique).

On réalise quatre à cinq puits par boîte de Pétri (selon le nombre de test à réaliser) de 8 mm de diamètre, ces puits sont remplis par 50 à 60 µl de surnageant [Le premier surnageant est traité par la pepsine laissé incubé à 37°C/1h] (**pour testé la nature protéique de la substance produite par les isolats on utilise l'enzyme protéolytique à raison de 0,1g dans 1ml d'eau distillée stérile. A l'aide de micropipette on prélève 100ul de ce mélange et on le dépose sur 1ml de surnageant**). [Les trois autres surnageant sont traités à différentes températures à 70°C, 90°C et à 110°C pendant 30min], le cinquième puits est remplis par le surnageant neutre. Après incubation 24 heures à 37°C, les diamètres des zones d'inhibition apparaissant autour des puits sont mesurés.

Une inhibition est considérée positive si le diamètre est supérieur à 2 mm (THOMPSON *et al*, 1996). 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 (8 mm)

Ou bien on peut les utilisés le surnageant dans les puits comme les protocoles suivants :

I.3.2.1. Précipitation des protéines

I.3.2.1.A. Précipitation avec le sulfate d'ammonium

Cette méthode consiste simplement à solubiliser une quantité de sulfate d'ammonium (SA) dans la solution dont on veut précipiter les protéines. Cette quantité est celle

nécessaire pour arriver à une concentration équivalente à un certain pourcentage de la quantité de SA suffisante pour saturer cette solution. C'est pourquoi il s'agit bien du % de saturation. Les protéines insolubles vont précipitées par centrifugation : donc le culot contient les protéines insolubles dans 50 % de SA et le surnageant contient les protéines solubles dans 50% de S.A. On reprend alors ce surnageant résultant pour en faire précipiter la protéine d'intérêt. **(GAUTHIER, 2009)**

Le surnageant neutralisé obtenu est saturé à 50% par l'ajout progressif de sulfate d'ammonium en poudre (50 g de sulfate d'ammonium pour 100 ml de solution) avec agitation modérée à 4°C plus de 48h . Après, une deuxième centrifugation de 4000 tours/30min à 4°C est effectuée, puis on prend le surnageant afin de réaliser la méthode de détection indirecte / Méthode des puits **(BAREFOOT et KLAENHAMMER, 1983)**

I.3.2.1.B. Précipitation par l'éthanol

On peut facilement précipiter les protéines en présence d'éthanol 80% (EtOH), pour un volume de surnageant neutralisé 3 volume de l'éthanol en les gardant à -20°C pendant 24heures. Une centrifugation de 4000 tours/ 30min permet alors de sédimenter les protéines précipitées, le culot résultant est dissout dans 4 ml du l'eau distillé stériles **(M.MOOSAVI *et al.*, 2009 ; S.MONTERSINO *et al.*, 2008)**.

Par la suite l'effet de ces protéines précipitées va être testé par la méthode de détection indirecte / Méthode des puits **(BAREFOOT et KLAENHAMMER, 1983)**

Ou bien, Dans des boites de Pétri contenant le milieu MH ou GN, qu'on ensemence par écouvillonnage par des bactéries pathogènes.

Ensuite, On dépose des petits disques de papier absorbant sur la gélose, puis on ajoute 100 µl du surnageant brut de la culture lactique à tester ou la solution (culot de surnageant qu'est précipité par le méthanol avec l'eau distillé) ou surnageant précipité par le sulfate d'ammonium.

Les boites sont incubées pendant 24 h à 37°C. Les disques entourés d'une zone claire d'inhibition de la souche test et ayant un diamètre supérieur à 2 mm sont considérées comme positive.

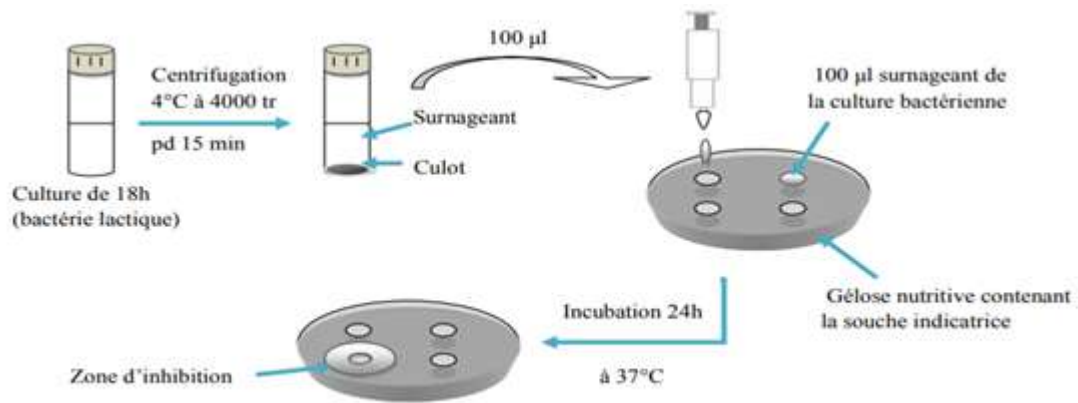


Figure 06 : Méthode des puits (BAREFOOT et KLAENHAMMER, 1983)

I.4. Cinétique de croissance en présence et en absence de surnageant

On réalise un suivi de croissance des bactéries pathogènes avec le surnageant des bactéries lactiques en culture mixte. On prépare une suspension de bactéries pathogènes dans un volume de 100ml de BN.

Après une incubation à 37°C pendant 24 h. on mesure la densité optique D_0 , qui a été ajusté à une absorbance environ 0.2 à une longueur d'onde 600nm,

On divise le volume dans 2 flacons 50ml / 50ml, on ajoute dans l'un des deux un volume de 5ml de surnageant neutralisé de la bactérie lactique. La D_0 a été mesuré chaque 1 h pendant 10h.

Résultats et discussion

II. Résultats et discussion

II.1. Revivification des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques donnent un trouble homogène sur milieu liquide et apparaissent en petites colonies blanchâtres ou crémeuses sur milieu solide. La figure suivante représente l'aspect des souches de bactéries lactiques sur gélose et bouillon MRS après une culture fraîche.

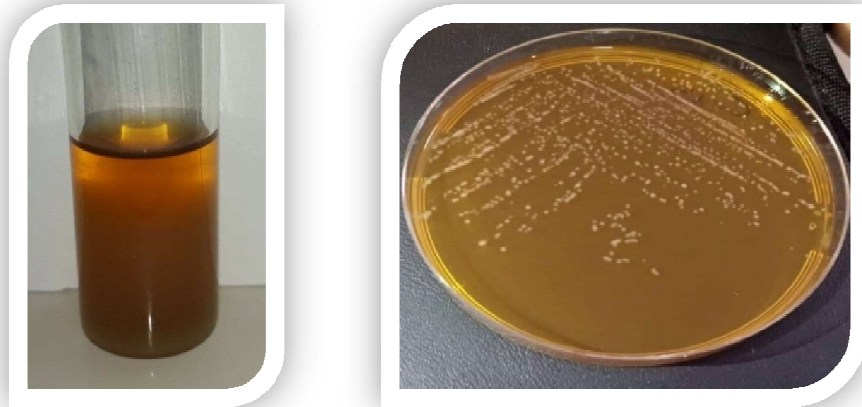


Photo 01 : Aspect des bactéries lactiques sur milieu MRS liquide et solide

II.2. Revivification des bactéries pathogènes

Les bactéries pathogènes donnent un trouble sur milieu liquide BN et leur aspect macroscopique est présenté sur les figures suivantes (chacune sur son milieu approprié).

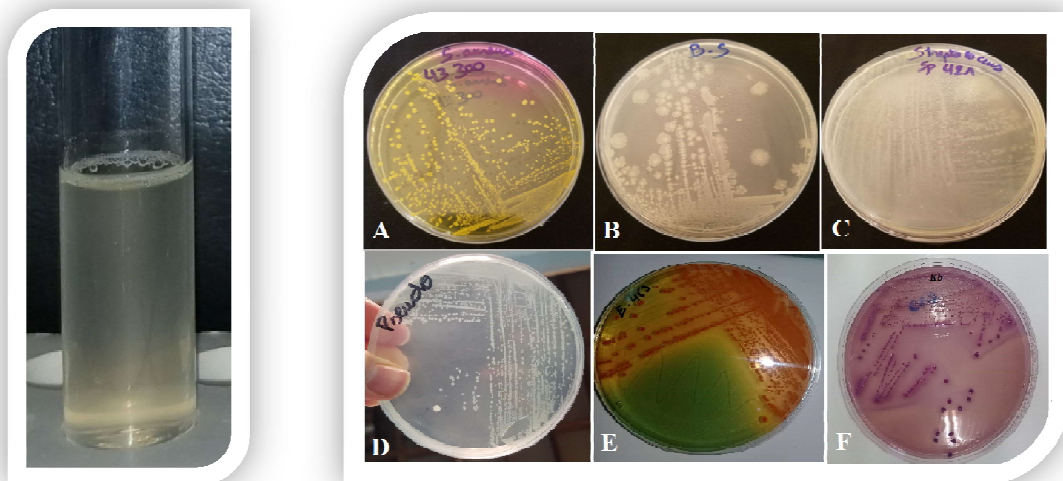


Photo 02 : Aspect de quelques bactéries pathogènes sur le milieu liquide BN et chacune sur son milieu solide approprié (A : Aspect de *S.aureus* sur milieu Chapman., B : Aspect de *Bacillus sub* sur GN, C : Aspect de *Streptococcus sp* sur GN, D : Aspect de *Pseudomonas* sur GN., E : Aspect d'*E.coli* sur milieu Hektoen, F : Aspect de *Klebsiella sp* sur Macconkey)

II.3. Détermination de la substance antimicrobienne produite par les bactéries lactiques

Après avoir ensemencé de 12 à 18 souches lactiques par touches sur le milieu MRS solide dans le but de cribler et de sélectionner celles qui possèdent une activité antimicrobienne.

II.3.1. Méthode directe de double couche (méthode de FLEMING *et al.*, 1975)

Cette méthode nous a permis de cribler les bactéries lactiques ayant une activité antimicrobienne.

La méthode des spots où la souche test et la souche cible sont en contact direct, a montré que la plupart des bactéries lactiques testées ont le pouvoir d'inhiber les bactéries multirésistantes.

On a remarqué l'apparition d'un halot clair (zone claire) autour de la souche lactique

Les résultats de l'interaction entre les bactéries lactiques et celles des bactéries pathogènes sont exposés dans les figures suivantes :

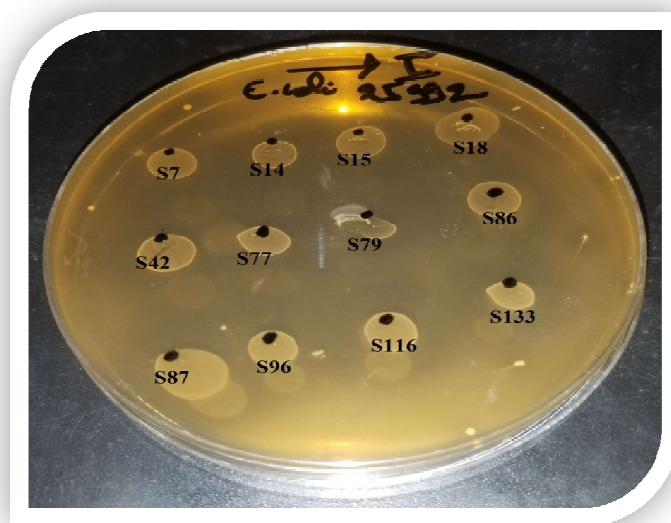


Photo 03 : Test de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques à l'égard d'*E.coli*,
Méthode de spot (FLEMING *et al.*, 1975)



Photo 04: Test de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques à l'égard d'*Ec.faecalis*,
Méthode de spot (FLEMING *et al.*, 1975)

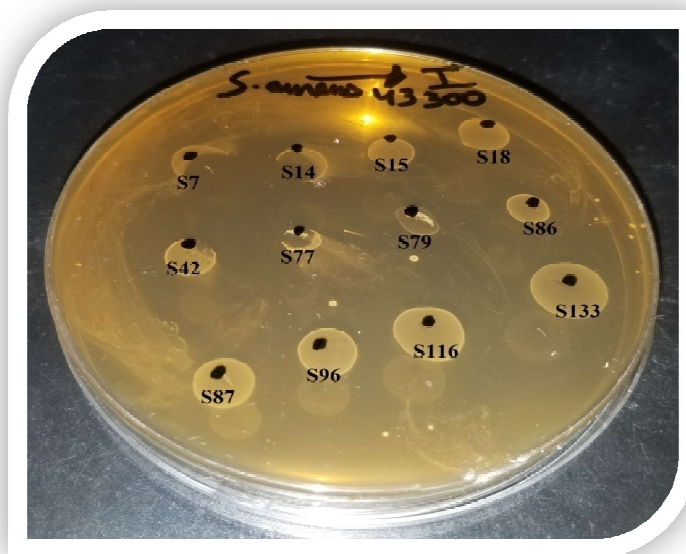


Photo 05: Test de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques à l'égard de *S.aureus*,
Méthode de spot (FLEMING *et al.*, 1975)

La présence de cet halot indique que les bactéries lactiques étudiées ont une activité antibactérienne à l'égard de ces bactéries pathogènes qui peut être due à différents facteurs

(Les acides organiques, le diacetyl, le peroxyde d'hydrogène et/ou les bactériocines) (SCHILLINGER *et al.*, 1996).

Les 12 souches lactiques avaient une action positive sur les germes pathogènes indicateurs (*E.coli*, *S.aureus*, et *E.faecalis*) avec des diamètres d'inhibition différents. Des résultats similaires ont été rapportés par BOUADJAIB (2013) et par MADI (2010) dans leur travail où les souches de bactéries lactiques isolées à partir de produits laitiers ont montré une activité à l'égard de ces bactéries pathogènes.

Le Tableau 06 représente les diamètres des zones d'inhibition des souches à activité antimicrobienne positive.

Ce tableau montre que tous ces souches lactiques qu'on a testées ont pu inhiber ces bactéries pathogènes (*E.coli*, *S.aureus*, et *E.feacalis*).

Tableau 06 : Diamètres des zones d'inhibition (mm) des bactéries lactiques à activité antimicrobienne

Diamètres des zones d'inhibition (mm) des bactéries lactiques à activité antimicrobienne			
Souches inhibitrices	Souches indicatrices		
	<i>E.coli</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>S.aureus</i>
S7	20 mm	18 mm	19 mm
S14	20 mm	11 mm	20 mm
S15	20 mm	12 mm	22 mm
S18	6 mm	20 mm	21 mm
S42	13 mm	12 mm	18 mm
S77	14 mm	17 mm	22 mm
S79	12 mm	14 mm	20 mm
S86	14 mm	13 mm	21 mm
S87	17 mm	20 mm	19 mm
S96	12 mm	14 mm	18 mm
S116	17 mm	18 mm	22 mm
S133	15 mm	16 mm	21 mm

II.3.2. Méthode de détection indirecte / Méthode des puits (BAREFOOT et KLAENHAMMER, 1983)

L'objectif de ce test est de déterminer la nature de la ou des substances actives; On observe des zones d'inhibition autour des puits lorsqu'on a utilisé le surnageant des

souches sélectionnée S86, S14, S77, S79 qu'ont une activité contre les *Staphylococcus aureus*, *E.coli*, *Bacillus subtilis*, *E.faecalis*.

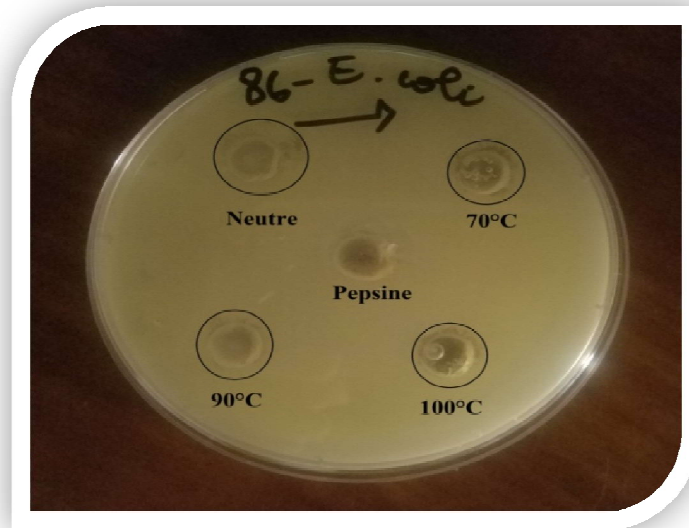


Photo 06 : Activité antibactérienne de *Leuconostoc cremoris* vis-à-vis *E.coli*, Par méthode de diffusion (puits)

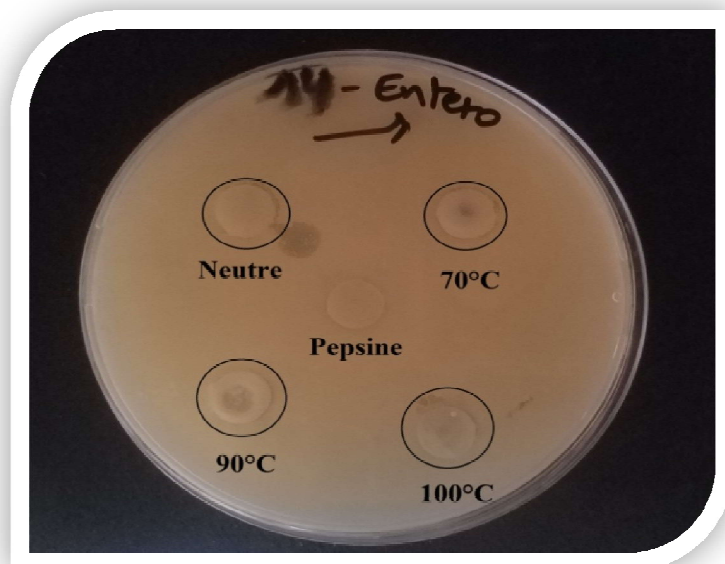


Photo 07 : Activité antibactérienne de *Lactococcus raffinolactis* vis-à-vis *E.faecalis*, Par méthode de diffusion (puits)

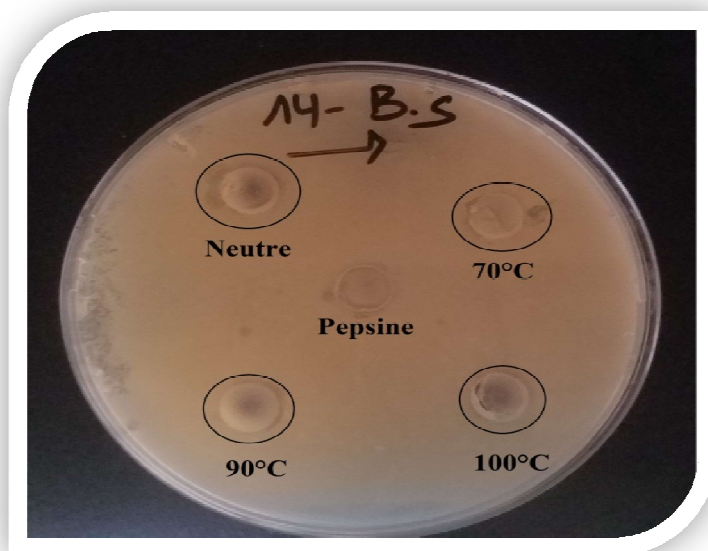


Photo 08 : Activité antibactérienne de *Lactococcus raffinolactis* vis-à-vis *Bacillus subtilis*, Par méthode de diffusion (puits)

Ce test a été réalisé sur les quatre bactéries testées : S86, S14, S79 et S77 en fonction de leur inhibition remarquable dans les tests précédents (Photo 03, 04 et 5).

Les bactéries lactiques peuvent produire des substances inhibitrices différentes des bactériocines. On utilise le surnageant pour confirmer qu'il y a une substance produite.

Pour rechercher si la cause d'inhibition est due à une substance de nature protéique ou au moins dont la partie portante cette activité est protéique on a éliminé deux causes d'inhibition ; l'acidité du milieu et le H₂O₂ (en utilisant les bactéries catalase positive).

Les bactéries lactiques produisent des acides organiques tels que l'acide lactique et acétique (KIHAL *et al*, 2006) qui se libèrent dans le milieu de culture ce qui conduit à l'acidification et qui peuvent être une cause principale d'inhibition des souches indésirables. La neutralisation de surnageant par le NaOH nous a permis de stabiliser le pH et donc d'exclure l'effet de l'acidité qui présente un pouvoir antimicrobien.

Des résultats similaires ont été rapportés par LABIOUI *et al*. (2005) ; qui ont aussi trouvé avec le surnageant neutralisé des zones d'inhibition avec leur test.

Après le traitement du surnageant avec des différentes températures (70°C, 90°C et 110°C), on a remarqué qu'il y a une inhibition même après le chauffage d'une température de 100°C. Qui veut dire que la substance résiste à la température (LACHANCE ,2000 ;

LABIOUI *et al*, 2005).

Les trois photos (06, 07 et 08) montrent qu'il y a une disparition de la zone d'inhibition après le traitement du surnageant avec la pepsine, ceci indique que l'agent inhibiteur est sensible aux enzymes protéolytiques. **SAVADOGO *et al*. (2004), HERNANDEZ (2005), BENDALI (2009) et MAMI (2013)** ont rapporté des résultats similaires à ceux obtenus dans ce travail où ils ont constatés une perte d'activité après traitement aux protéases.

Ces substances ont été caractérisées par d'autres chercheurs comme étant des molécules de nature protéique vue leur traitement par des enzymes protéolytiques (**BROUGHTON 1990**).

Les résultats obtenus après le traitement thermique du surnageant contenant la substance et les tests des enzymes protéolytiques ainsi que l'élimination de l'acidité et le H₂O₂ nous on permet de sélectionner des souches productrices de substance antimicrobienne d'une nature protéique thermorésistante (**HUGAS *et al*, 2003**).

On a constaté que ces composés protéique se localisent dans les fractions extracellulaires parce que les zones d'inhibition ont été détectées lors de traitement de surnageant des bactéries lactiques et non pas le culot bactérien.

Ces caractéristiques font penser qu'on a affaire à des bactériocines (**LABIOUI *et al*, 2005**) qui nous on permis de sélectionner des souches productrices de substance antimicrobienne.

**Diamètre d'inhibition Zi (mm) = diamètre de la zone d'inhibition obtenue (mm)
– diamètre de puits (8 mm)**

Le tableau 07 représente le diamètre d'inhibition de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques vis-à-vis *E.coli* , *E.feacalis*, *Bacillus Sublitis*

Tableau 07: Résultat de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques vis-à-vis *E.coli*, *E.faecalis*, *Bacillus Sublitis*

Diamètre de la zone d'inhibition															
Surnageant	vis-à-vis <i>E.coli</i>					vis-à-vis <i>E.faecalis</i>					vis-à-vis <i>Bacillus Sublitis</i>				
	Neutre	70°C	90°C	110°C	Pepsine	Neutre	70°C	90°C	110°C	Pepsine	Neutre	70°C	90°C	110°C	Pepsine
S14 <i>Lactococcus raffinolactis</i>	4mm	3mm	2mm	2mm	0mm	5mm	3mm	2mm	4mm	0mm	6mm	3mm	3mm	4mm	0mm
S77 <i>Entérocooccus durans</i>	5mm	3mm	3mm	2mm	0mm	4mm	3mm	2mm	2mm	0mm	4mm	2mm	2mm	1mm	0mm
S79 <i>Lactococcus lactis</i>	7mm	4mm	3mm	2mm	0mm	3mm	3mm	2mm	1mm	0mm	4mm	3mm	2mm	2mm	0mm
S86 <i>Leuconostoc crémoris</i>	6mm	5mm	3mm	4mm	0mm	6mm	5mm	3mm	2mm	0mm	5mm	6mm	4mm	2mm	0mm

En fin, d'après les résultats de la recherche de pouvoir antimicrobien des bactéries lactiques ; on suggère que cette bactériocine secrété par les genres testés, *Leuconostoc*, *Lactococcus* et *Enterococcus* appartient à la classe II qui renferme les bactériocines thermorésistantes (KLAENHAMMER, 1988).

II.3.2.1. Précipitation des protéines

Les protéines sont des molécules sensibles à leur environnement et peuvent être facilement dénaturées. C'est à dire que leur structure peut être modifiée jusqu'au point où elles perdent temporairement ou définitivement leurs propriétés biologiques. (GAUTHIER, 2009)

Donc on a fait ce test sur des disques de papier absorbant qui contient la solution (culot de surnageant précipité par le méthanol avec l'eau distillé) et surnageant précipité

par le sulfate d'ammonium ; pour confirmer que cette substance antimicrobienne est de nature protéique.

II.3.2.1.A. Précipitation des protéines au sulfate d'ammonium

Cette procédure est employée pour séparer une protéine d'intérêt d'autres protéines dans une solution contenant un mélange complexe de protéines. Le sulfate d'ammonium est un sel très soluble en solution aqueuse et permet d'atteindre des forces ioniques très élevées. Il est très hydrophile et compétition efficacement avec les protéines pour l'eau causant leur déshydratation. Les ions sulfates et ammonium sont relativement petits et peuvent facilement s'approcher des résidus chargés des protéines pour les neutraliser. Ce sel a aussi l'avantage de peu dénaturer les protéines et permet de maximiser l'obtention de protéines biologiquement actives. (GAUTHIER, 2009)

Dans ce cas, on a cherché une protéine soluble dans le surnageant qu'est le bactériocine. On observe des zones d'inhibition plus large des souches lactique S14 et S86 contre presque tous les bactéries multi résistantes par l'utilisation de surnageant qu'est précipité par le sulfate d'ammonium.

II.3.2.1.B. Précipitation des protéines par l'éthanol

Ainsi on a des résultats positifs par cette méthode, On remarque des zones d'inhibition aussi large des mêmes souches lactique S14 et S86 contre tous les BMR utilisées par l'utilisation de la solution (culot de surnageant qu'est précipité par le méthanol avec l'eau distillé). Qui indique que cette solution contient le bactériocine recherché qu'est de nature protéique.

D'après les résultats qu'on a obtenus (**Photo 09, 10, 11, 12, 13 et 14**), on a pour confirmer que cette substance antimicrobienne est officiellement de nature protéique

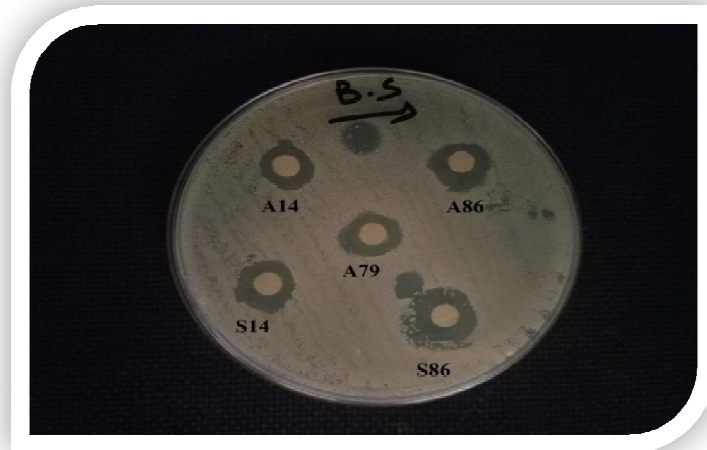


Photo 09 : Activité antibactérienne de bactéries lactiques vis-à-vis *Bacillus subtilitus*, Par la méthode de précipitation

A14 : Solution (culot de surnageant de *Lactococcus raffinolactis* qu'est précipité par le méthanol avec l'eau distillé)

A86 : Solution (culot de surnageant de *Leuconostoc crémoris* qu'est précipité par le méthanol avec l'eau distillé)

A79 : Solution (culot de surnageant de *Lactococcus lactis* qu'est précipité par le méthanol avec l'eau distillé)

S86 : Surnageant de *Leuconostoc crémoris* qu'est précipité par le sulfate d'ammonium

S14 : Surnageant *Lactococcus raffinolactis* de qu'est précipité par le sulfate d'ammonium

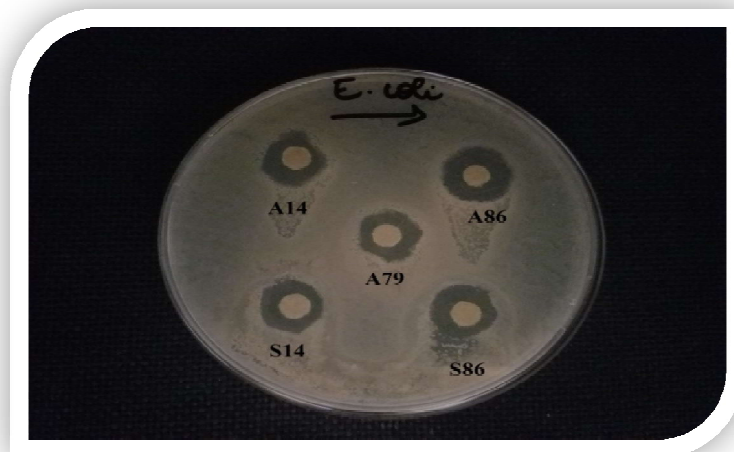


Photo 10 : Activité antibactérienne de bactéries lactiques vis-à-vis *E.coli*, Par la méthode de précipitation

A14 : Solution (culot de surnageant de *Lactococcus raffinolactis* qu'est précipité par le méthanol avec l'eau distillé)

A86 : Solution (culot de surnageant de *Leuconostoc crémoris* qu'est précipité par le méthanol avec l'eau distillé)

A79 : Solution (culot de surnageant de *Lactococcus lactis* qu'est précipité par le méthanol avec l'eau distillé)

S86 : Surnageant de *Leuconostoc crémoris* qu'est précipité par le sulfate d'ammonium

S14 : Surnageant *Lactococcus raffinolactis* de qu'est précipité par le sulfate d'ammonium



Photo 11 : Activité antibactérienne de bactéries lactiques vis-à-vis *S.aureus*, Par la méthode de précipitation

A14 : Solution (culot de surnageant de *Lactococcus raffinolactis* qu'est précipité par le méthanol avec l'eau distillé)

A86 : Solution (culot de surnageant de *Leuconostoc crémoris* qu'est précipité par le méthanol avec l'eau distillé)

A79 : Solution (culot de surnageant de *Lactococcus lactis* qu'est précipité par le méthanol avec l'eau distillé)

S86 : Surnageant de *Leuconostoc crémoris* qu'est précipité par le sulfate d'ammonium

S14 : Surnageant *Lactococcus raffinolactis* de qu'est précipité par le sulfate d'ammonium



Photo 12 : Activité antibactérienne de bactéries lactiques vis-à-vis *Pseudomonas aeruginosa*, Par la méthode de précipitation

A14 : Solution (culot de surnageant de *Lactococcus raffinolactis* qu'est précipité par le méthanol avec l'eau distillé)

A86 : Solution (culot de surnageant de *Leuconostoc crémoris* qu'est précipité par le méthanol avec l'eau distillé)

A79 : Solution (culot de surnageant de *Lactococcus lactis* qu'est précipité par le méthanol avec l'eau distillé)

S86 : Surnageant de *Leuconostoc crémoris* qu'est précipité par le sulfate d'ammonium

S14 : Surnageant *Lactococcus raffinolactis* de qu'est précipité par le sulfate d'ammonium



Photo 13 : Activité antibactérienne de bactéries lactiques vis-à-vis *Salmonella typhi*, Par la méthode de précipitation

A14 : Solution (culot de surnageant de *Lactococcus raffinolactis* qu'est précipité par le méthanol avec l'eau distillé)

A86 : Solution (culot de surnageant de *Leuconostoc crémoris* qu'est précipité par le méthanol avec l'eau distillé)

A79 : Solution (culot de surnageant de *Lactococcus lactis* qu'est précipité par le méthanol avec l'eau distillé)

S86 : Surnageant de *Leuconostoc crémoris* qu'est précipité par le sulfate d'ammonium

S14 : Surnageant *Lactococcus raffinolactis* de qu'est précipité par le sulfate d'ammonium



Photo 14 : Activité antibactérienne de bactéries lactiques vis-à-vis *Streptococcus sp421*, Par la méthode de précipitation

A14 : Solution (culot de surnageant de *Lactococcus raffinolactis* qu'est précipité par le méthanol avec l'eau distillé)

A86 : Solution (culot de surnageant de *Leuconostoc crémoris* qu'est précipité par le méthanol avec l'eau distillé)

A79 : Solution (culot de surnageant de *Lactococcus lactis* qu'est précipité par le méthanol avec l'eau distillé)

S86 : Surnageant de *Leuconostoc crémoris* qu'est précipité par le sulfate d'ammonium

S14 : Surnageant *Lactococcus raffinolactis* de qu'est précipité par le sulfate d'ammonium

II.4. Cinétique de croissance d'une culture mixte dans le bouillon nutritif (BN)

L'estimation de la croissance bactérienne en fonction du temps est basée sur deux critères, la masse cellulaire et le nombre de bactéries qui augmentent dans des proportions variables au cours de la croissance. L'interprétation des courbes de croissance obtenue par spectrophotométrie n'est cependant pas immédiate pour deux raisons : la densité optique permet de mesurer la biomasse de la culture et non directement sa concentration en cellules viables et cette densité n'est mesurable que lorsque la concentration de la culture atteint un certain seuil qui varie de 10^5 - 10^7 cellules par ml en fonction du microorganisme étudié. La masse cellulaire est mesurée selon la densité optique du milieu, ceci permet de décrire la courbe de croissance de la bactérie. (KHODJA, 2017)

La détermination de l'activité de la bactériocine produite par S14 et S86 vis-à-vis des souches cibles de l'activité antagoniste s'effectue par l'évaluation de production de la biomasse bactérienne.

L'étude de la cinétique bactérienne est effectuée sur le milieu BN par la mesure de la densité optique chaque 1h d'incubation à 37°C en absence et en présence de surnageant des bactéries lactiques S14 et S86 et exprimée en absorbance en fonction de temps.

Les figures (17, 18 et 19) présentent la cinétique de croissance de : *Salmonella typhi*, *Bacillus subtilis* et *Enterococcus faecalis* en absence et en présence de surnageant des bactéries lactiques S14 et S86 en fonction de temps.

On remarque une augmentation continue de croissance avec le temps en absence et en présence de surnageant des bactéries lactiques S14 et S86 pour toutes les souches cible dans les premières heures.

Après 6h d'incubation, On a remarqué une diminution de la croissance de toutes les souches cibles en présence de surnageant des bactéries lactiques S14 et S86.

Par contre, On a remarqué une croissance continue de la biomasse bactérienne en absence de surnageant grâce à la présence des nutriments essentiels dans le milieu. On peut dire que la diminution de la croissance des bactéries en présence de surnageant des bactéries lactiques S14 et S86 est due à une inhibition par l'effet des surnageant, cette inhibition est combinée par la présence de substance antimicrobienne (bactériocin-like) dans le surnageant.

Les résultats obtenus sont aussi similaires à ceux rapportés par (KHODJA, 2017) qui ont aussi trouvé que la biomasse bactérienne d'*E. coli* est nettement diminué après l'ajout des bactériocines.

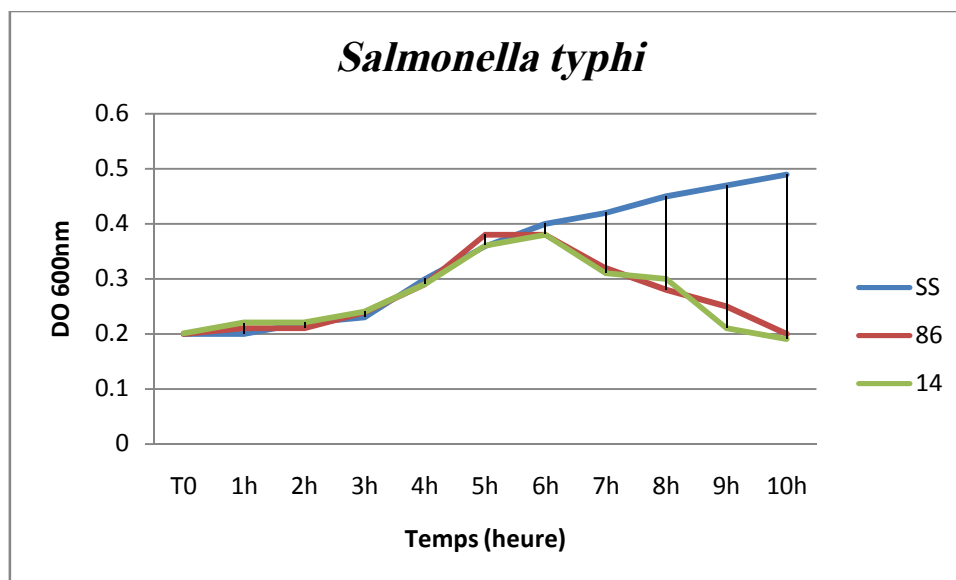


Figure 07: Cinétique de croissance de *Salmonella typhi* en fonction du temps, en présence et en absence de surnageant (SS : sans l'ajout de surnageant, 86 : en présence de surnageant de la souche lactique S86, 14 : en présence de surnageant de la souche lactique S14).

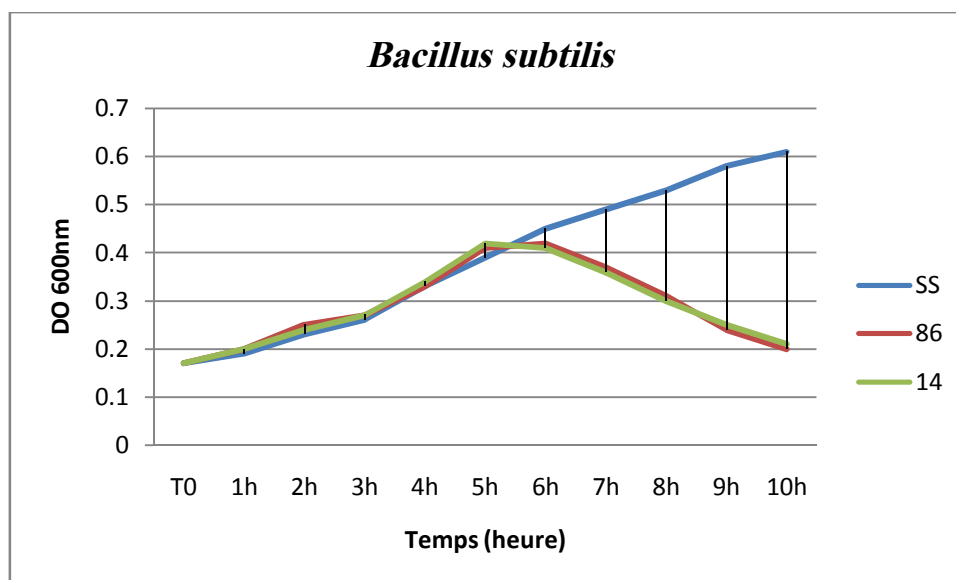


Figure 08 : Cinétique de croissance de *Bacillus subtilis* en fonction du temps, en présence et en absence de surnageant (SS : sans l'ajout de surnageant, 86 : en présence de surnageant de la souche lactique S86, 14 : en présence de surnageant de la souche lactique S14).

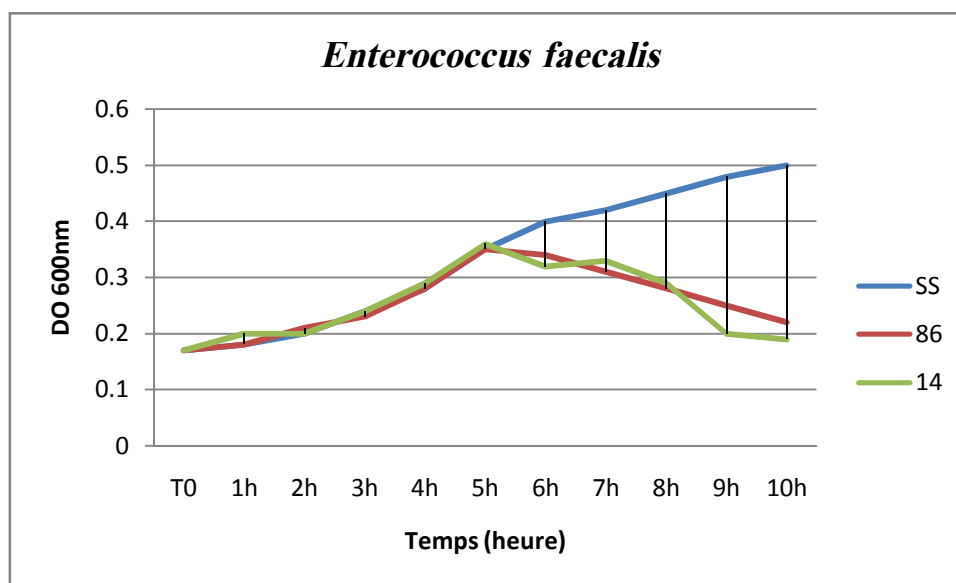


Figure 09 : Cinétique de croissance de *Enterococcus faecalis* en fonction du temps, en présence et en absence de surnageant (SS : sans l'ajout de surnageant, 86 : en présence de surnageant de la souche lactique S86, 14 : en présence de surnageant de la souche lactique S14).

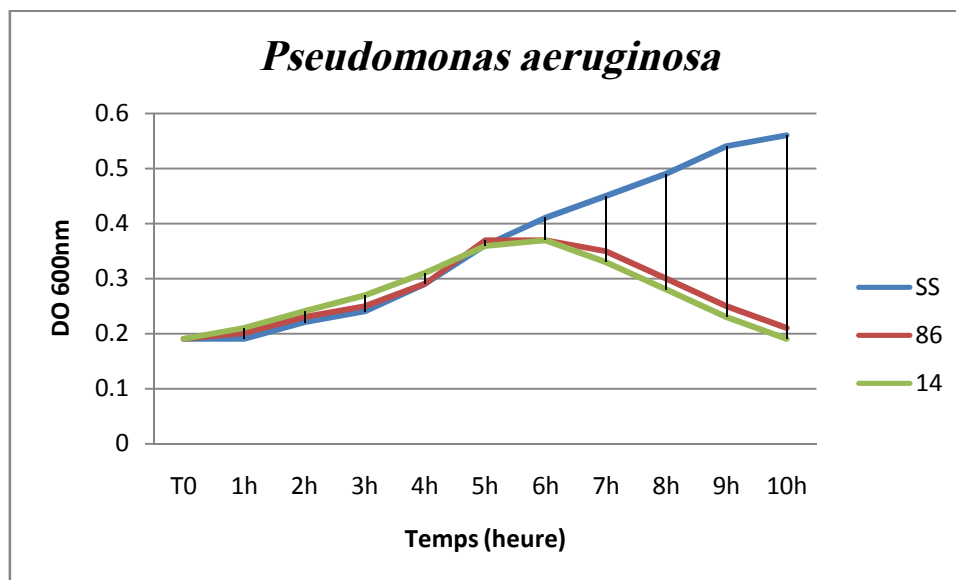


Figure 10 : Cinétique de croissance de *Pseudomonas aeruginosa* en fonction du temps, en présence et en absence de surnageant (SS : sans l'ajout de surnageant, 86 : en présence de surnageant de la souche lactique S86, 14 : en présence de surnageant de la souche lactique S14).

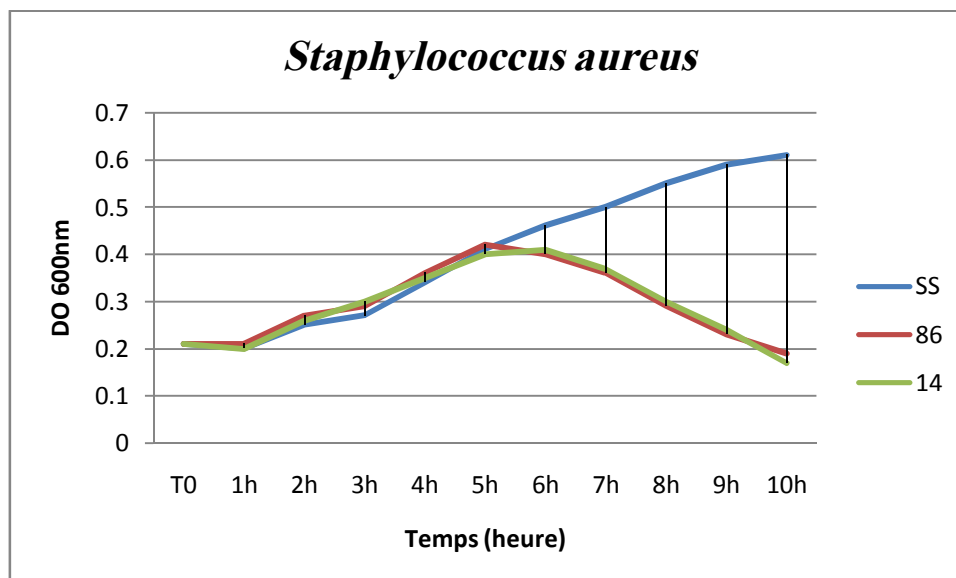


Figure 11 : Cinétique de croissance de *Staphylococcus aureus* en fonction du temps, en présence et en absence de surnageant (SS : sans l'ajout de surnageant, 86 : en présence de surnageant de la souche lactique S86, 14 : en présence de surnageant de la souche lactique S14).

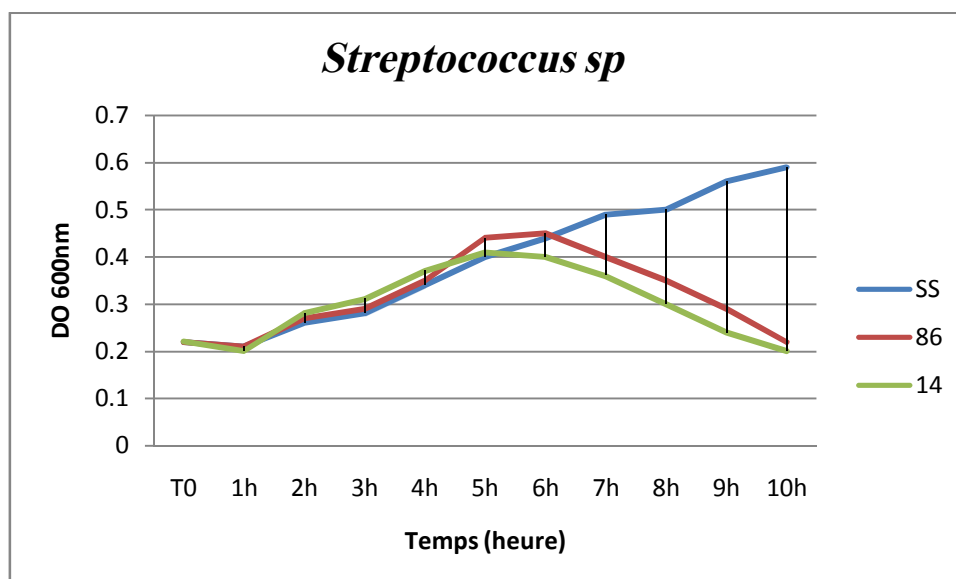


Figure 12 : Cinétique de croissance de *Streptococcus sp* en fonction du temps, en présence et en absence de surnageant (SS : sans l'ajout de surnageant, 86 : en présence de surnageant de la souche lactique S86, 14 : en présence de surnageant de la souche lactique S14).

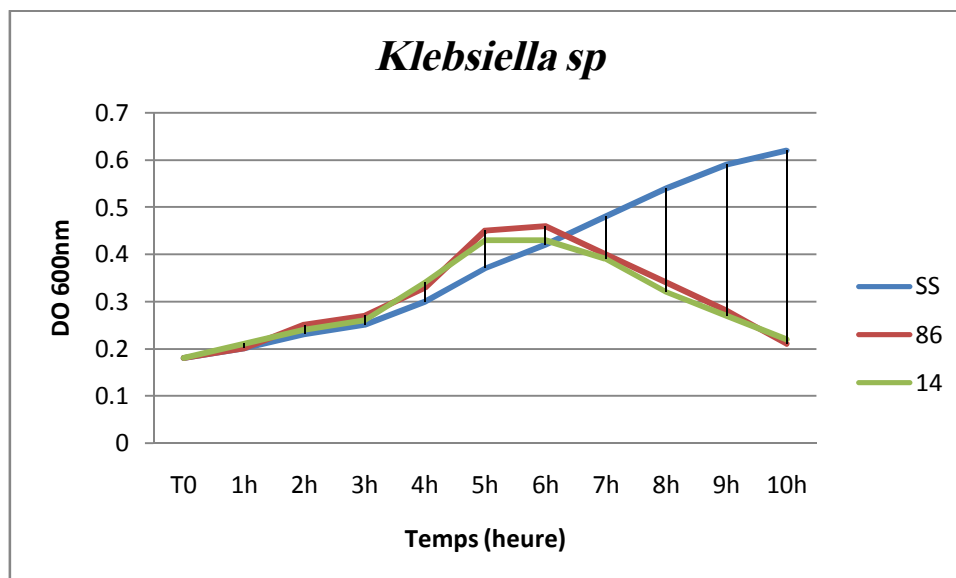


Figure 13 : Cinétique de croissance de *Klebsiella sp* en fonction du temps, en présence et en absence de surnageant (SS : sans l'ajout de surnageant, 86 : en présence de surnageant de la souche lactique S86, 14 : en présence de surnageant de la souche lactique S14).

Conclusion

Les bactéries lactiques occupent une place importante dans les industries agroalimentaires. Ce sont des Gram positives non pathogènes. Leur importance en industrie alimentaire est considérable puisqu'elles interviennent dans une large gamme de produits comme flore technologique dont le principal but d'améliorer la qualité technologique, la qualité organoleptique et l'inhibition de la flore d'altération et les germes pathogènes par la production de substances inhibitrices.

De nos jours, l'intérêt de l'emploi de bactéries lactiques productrices de substances inhibitrices a suscité beaucoup de recherches grâce à la résistance des bactéries pathogènes (*Staphylococcus aureus*, *E.coli*, *Bacillus*.....) à l'antibiothérapie a orienté l'industrie pharmaceutique vers la découverte de nouvelles molécules antimicrobiennes comme les bactériocines pour des applications médicales.

Le but de cette recherche consiste à étudier l'activité antibactérienne de certaines souches de bactéries lactiques à l'égard de quelques bactéries pathogènes qu'est basé sur la sélection des bactéries lactiques productrice des substances antimicrobiennes et la détermination de la nature des ces substances inhibitrices par la méthode des interactions de ces souches productrices et les germes pathogènes.

Les souches des bactéries lactiques utilisées dans cette étude ont été isolées à partir de fromage traditionnel (J'ben) préparé à base de lait de vache et de chèvre qu'elles ont été déjà identifiées.

Nous avons essayé de montrer que tous les bactéries lactiques utilisées (18 souches) dans ce travail produisent une activité antimicrobienne contre les bactéries pathogènes sur le milieu solide (MH et GN).

Nous avons criblé 04 souches lactiques pures (*Entérocooccus durans*, *Leuconostoc crémoris*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus raffinolactis*) qui sont capables de produire des substances antimicrobiennes permettant d'éliminer la croissance des germes cibles pathogènes (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus sp*, *Klebsiella sp*)

Par la suite, nous avons déterminé la nature biochimique de ces substances inhibitrices par traitement de surnageant neutralisé à différentes températures (70°C, 90°C et 110°C) pendant 30min et par des enzymes protéolytiques (pepsine) en adoptant la

méthode de diffusion sur milieu solide (méthode de puits). On a constaté que ces composés étaient de nature protéique et se localisent dans les fractions extracellulaires parce que les zones d'inhibition ont été détectées lors de traitement de surnageant des bactéries lactiques et non pas le culot bactérien.

La mesure de diamètres des zones d'inhibition sur la culture de la souche cible a révélée une variation des résultats pour chaque traitement ce qui nous a laissé suggérer que ces bactériocines appartiennent à la classe II –bactériocine like-.

La cinétique de croissance des bactéries pathogènes multi résistantes en présence et en absence de la bactériocine produite par (S14 et S86) a montré que la biomasse bactérienne a diminué progressivement après l'ajout de surnageant.

L'importance de ce travail est d'utiliser les substances inhibitrices spécialement les bactériocines des bactéries lactiques comme un agent thérapeutique, de nombreuses possibilités d'utilisation ont été envisagées par les chercheurs, pour répondre aux besoins du domaine médical sur ces germes lactiques par leur capacité à sécréter des substances antimicrobiennes pour montrer l'efficacité de ces composés vis-à-vis les bactéries pathogènes multirésistantes.

Quelques perspectives qui peuvent être proposées pour compléter ce travail :

- La purification et la caractérisation structurale des bactériocines
- L'identification de poids moléculaire, composition en acides aminés
- L'analyse de leurs structures chimiques
- L'étude de leurs spectre d'inhibition
- Elargir l'étude de leurs action sur d'autres bactéries à Gram négatif et positif et autres types de microorganismes que les bactéries.
- L'utilisation dans le domaine médical et biotechnologique.

*Références
bibliographiques*

- **ADAMS M.R. et HALL C.J. 1988.** Growth inhibition of food borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. *Int. J. Food Sci. Technol.* 23: 287-292.
- **AHOYO A.T., BABA-MOUSSA L., ANAGO A.E., AVOGBE P., MISSIHOUN T.D., LOKO F., PREVOST G., SANNI A. ET DRAMANE K. 2007.** Incidence d'infections liées à *Escherichia coli* producteur de β -lactamase à spectre élargi au Centre hospitalier départemental du Zou et Collines au Bénin. *Médecine et maladies infectieuses*.
- **ANDERSSON R. 1986.** Inhibition of *Staphylococcus aureus* and spheroplasts of gram-negative bacteria by an antagonistic compound produced by a strain of *Lactobacillus plantarum*. *Int. J. Food Microbiol.* 3:149-160.
- **ANDRERNONT, (1997)** Laboratoire de Bactériologie, Groupe Hospitalier Bichat-Claude-Bernard et CHU Xavier-Bichat, Université Paris VII, 46, rue Henri- Huchard, 75018 Paris, France
- **AROUS, A. RAMNATH, M., S. GRAVESEN, J. W. HASTINGS, AND Y. HECHARD. (2004).** Expression of *mptC* of *Listeria monocytogenes* induces sensitivity to class IIa bacteriocins in *Lactococcus lactis*. *Microbiology* **150**:2663–2668.
- **AVRIL J.L., DABERNAT H., DENIS F. ET MONTEIL H. 2000.** Bactériologie clinique. 3ème édition. Ellipses édition marketing S.A. Paris.
- **AXELSSON L.T., CHUNG T.C., DOBROGOSZ W.J. et LINDGREN S.E. 1989.** Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microbiol. Ecol. Health Dis.* 2:131-136.
- *Bacteria: Microbial and Functional Aspects*, 3rd ed. *Marcel Dekker, New York.* 375–
- **BADIS A., LAOUABDI-SELLAMI N., GUETARNI D., KIHAL M. ET OUZROUT R., 2005.** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales «Arabia et Kabyle». *Sci. Technol.*, 23: 30-37.
- **BAREFOOT S.F. ET KLAENHAMMER, T.R. (1983).** Detection and activity of lacticin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45** :1808- 1815.
- **BAUER, R ET DICKS, L. M. (2005).** Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. *Int. J. Food Microbiol. Rev.* **101**: 201-216.
- **BENDALI F. (2009).** Criblage de souches de bactéries lactiques douées d'activité antagoniste à l'égard de *Listeria monocytogenes*. Thèse de Doctorat en Microbiologie. Université A/MIRA de Bejaia. 130p.

- **BERCHE P. 2003.** Bactériologie systématique D.C.E.M. 1. Faculté de médecine Necker-Enfant malade. Sur le lien : www.medix.free.fr/.../bacterie-diarrheeaigne.
- **BERGEY'S MANUAL TRUST, 2001–2009.** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1–5, 2nd ed. Springer-Verlag, New York
- **BERRY E.D., LIEWEN M.B., MANDIGO R.M. ET HUTKINS R.W. 1995.** bial activities among Bulgarian *lactobacilli* strains. *J. Culture Collections.* 2: 15-20. Biosynthesis and utilisation of folic acid and vitamin B12 by lactic cultures in skim milk. *J. Dairy Sci.* 67: 1169-1174.
- **BONACORSI S., HOUDOIN V. ET BINGEN E. 2001.** Facteurs de virulence associés à *E. coli* responsable de méningite néonatale. Paris, France.
- **BOTTAZZI V. et DELLAGLIO F. 1967.** Acetaldehyde and diacétyl production by *Streptococcus thermophilus* and other lactic streptococi. *J. Dairy Res.* 34: 109-113.
- **BOUDJAIB S. (2013).** Etude physico-chimique du produit laitier du sud Algérien « Jben » recherche du pouvoir antimicrobien des bactéries lactiques. Mémoire de Master en Biologie. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers. Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen. 91p.
- **BOUHAIRI Soraya, 2017.** *Bacillus subtilis* : caractères et application. Thèse de doctorat. Université Mohamed V- Rabat.
- **BOUKADIDA J., SALEM N., HANNACHI N., MONASTIRI K. ET SNOUSSI N. 2002.** Exploration génotypique d'une bouffée épidémique nosocomiale néonatale à *Klebsiella pneumoniae* productrice de B-lactamase à spectre étendu. Editions scientifiques et médicales Elsevier SAS.
- **BROUGHTON J TUNELI A. ET DELVES-. (1998).** International acceptance of nisin as a food preservative. *Int. Dairy. Fed. Bull.*, 329, 20-23
- **BYCZKOWSKI J. et GESSNER T., 1988.** Biological role of superoxide ion radical. *Int. J. Biochem.* 20: 569-580
- **CALVEZ. S ; BELGUESMIA. Y ; KERGOURLEY. G.(2009).** in bactériocines : de la synthèse aux applications in bacteries lactiques : physiologique , métabolisme, génomique et applications industrielles édition : Economica .2009. p 100-122.
- **CAPLICE, E., FITZGERALD, G. F., 1999.** Food fermentation: role of microorganismes in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology* 50, 131-49.

- **CARINE. D ; TONART. P., 2009.** Les bactériocines des bactéries lactiques caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. BASE. VOLUME 13.
- **CARRÈR A. ET NORDMANN P. 2009.** *Klebsiella pneumoniae* CTX-M-15 : vers une modification de l'épidémiologie des β -lactamases à spectre étendu. Pathologie Biologie.
- **CASTALA, E., MONTEL, M. C., 2008.** Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactococcus* genus. *International Journal Food Microbiology* 126, 271-273.
- **CETINKAYA, Y., FALK, P. &MAYHALL, C., 2000.** Vancomycin-Resistant Enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*, Volume 13, pp. 686- 707.
- **CHATTERJEE, C., PAUL, M., XIE, L., AND VAN DER DONK, W. A. (2005)** Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chem Rev.***105**: 633-684.
- **CHOUDE. NEDJMA, 2006.** Contribution à l'étude de flores intentionnelles des poulets conventionnels sains. Mém: magister en médecine vétérinaire
- **CHU-PS Pitié-Salpêtrière. 2003.** Bactériologie DCEM1. Université PARIS
- **CINTAS L.M., HERRANZ C., HERNANDEZ P.E., CASAUS M.P., NES I.F. ET HERNANDEZ P.E. 2001.** Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Sci. Technol. Int.* 7: 4, 281-305.
- **COLLINS, M. D., WILLIAMS, A. M. AND WALLBANKS, S. (1990).** The phylogeny of *Aerococcus* and *Pediococcus* as determined by 16S rRNA sequence analysis: description of *Tetragenococcus* gen. nov. *FEMS Microbiology Letters* **70**, 255-262.
- **COLLINS, M.D., FARROW, J.A., PHILLIPS, B., FERUSA, S. AND JONES, D. (1987)** Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola* and some catalase-negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus, *Carnobacterium*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **37**, 310-316. compound. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1-5.
- **CONDON S. 1987.** Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiol. Rev.*, 46: 269-280. Coryniformis strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal
- **DAGNRA A.-Y., AKOLLY K., GBADOE A., AHO K. ET DAVID M. 2007.** Émergence des souches de salmonelles multirésistantes aux antibiotiques à Lomé (Togo). Médecine et maladies infectieuses.
- **DE VUYST L. ET VANDAMME E. J. (1994).** A bacterial potential of lactic acid bacteria. Dans: Bacteriocin of lactic acid bacteria. End. Blacki Academic & Profitonel, Londre.

- **DEEGAN L.H., COTTER P.D., HILL C. ET ROSS P. 2006.** Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.* 16: 1058-
- **DEEGAN L.H., COTTER P.D., HILL C. ET ROSS P. 2006.** Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.* 16: 1058-1071.
- **DEEGAN. L. H; COTTER. P. D; HILL. C; ROSS. P. (2006).** Bacteriocins: biological tools for bio preservation and shelf-life extension. *International. Dairy. Journal.*
- **DELARRAS C. 2007.** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Edition Techniques et Documentation. Paris. p 248-296.
- **DELLAGLIO F., DE ROISSARD H., TORRIANI S., CURK M.C. ET JANSSENS D., 1994.** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques (De Roissard H. et Luquet F.M.).Ed., Loriga, Uriage. 1 :pp. 25-116.
- **DESMAZEAUD M., 1998.** Bactéries lactiques et qualité des fromages. Lab. De recherches laitières *INRA.* 1-3.
- **DICKS, L. M. T., HEUNIS, D. A., VAN STADEN, D. A., BRAND, A., SUTYAK NOLL, K., AND CHINKINDAS, M. L. (2011)** Medical and personal care applications of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. In: Drider, D., and Rebuffat, S. (Eds). *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications.* Springer Verlag. Stellenbosch, South Africa. pp 391-421.
- **DICKS, L. M. T., HEUNIS, D. A., VAN STADEN, D. A., BRAND, A., SUTYAK NOLL, K., AND CHINKINDAS, M. L. (2011)** Medical and personal care applications of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. In: Drider, D., and Rebuffat, S. (Eds). *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications.* Springer Verlag. Stellenbosch, South Africa. pp 391-421.
- **DICKS, L. M., DELLAGLIO, F. AND COLLINS, M. D. (1995).** Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **45**, 395-397.
- **DIEP , INGOLF F., NES, DZUNG B, ET HOLO H., (2007).** Bacteriocin Diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Laboratory of Microbial Gene Technology, Department for Chemistry, Biotechnology and Food Science, Norwegian University of Life Sciences, N1432 Ås, Norway. Vol4: 1198*
- **DORTU, C, AND P THONART.** "Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et." *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 13 (2009): 143-154.

- **DORTU, C. ET THONART, P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 143-154.
- **DRIDER .D ; PREVOST. H. (2009).** Bactéries lactiques : physiologie, métabolisme, génomique et applications industrielles Edition : Economica
- **DRIDER J., PREVOST H. (2009).** Bactéries lactiques. Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles. Ed . Economica., Paris , 504p.
- **DRIESSEN ET AL 1995.** In. Bacteriocins :mechanism of membrane insertion and pore formation .Antonie Van Leeuwenhoek 76: p 186.**1999**
- edientseds.Goldberg I. et Williams R. *Van Nostrand Reinhold*, New York. pp. 461 483.
- **EKLUND T. 1989.** Organic acids and esters. In: Gould, G.W. (Ed.), Mechanisms
- **EKLUND T. 1989.** Organic acids and esters. In: Gould, G.W. (Ed.), Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures, *Elsevier Applied Science*, London, pp. 161-200.
- **EUZÉBY, J.P., (1997).** List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature. *International Journal of Systematic Bacteriology* 7: 590-592.
- **FAUCHERE L.et AVRIL J.2002.**Microbiologie général et médicale. Edition ellipses paris. P 141-319.
- **FIELD ET AL ., 2007.** in construction of a new shuttle vector and its use for cloning AND expression of two plasmide encoded bacteriocins from *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* BGSJ2-8.Int.J.Food Microbiol.
- **FLEMING, H.R., ETCHELL, G.L., COSTILOW, R.N. (1975).**Microbial inhibition by isolate of pediococcus from cucumber brine. *Appl and Microbiology*, **30**:104-1042.
- **FLEURETTE J. (1989).**Staphylocoques et Microcoques. In Bactériologie médicale. 2ème édition. Paris : Médecine-Sciences. Flammarion ; p 773.
- **FREDERIQ, P. (1946)** «Sur la pluralité des récepteurs d'antibiose d'E.coli.» *C.R Soc Biol* 140: 1189-1194.
- **FREESE E., SHEU C.W. ET GALLIERS E. 1973.** Function of lipophilic acids as antimicrobial foodadditives. *Nature*. 241: 321-325.
- **FRENEY, J., RENAUD, F., HANSEN, W., BOLLET, C., 2000.** Précis de Bactériologie clinique. Ed. Eska (Paris), 1692 p.
- **GALVEZ A., ABRIOURL H., BEN OMAR N. AND LUCAS R., 2011.** Food Applications and Regulation In: Drider D., et Rebuffat S. (eds). Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications. Springer Verlag. Jaen, Spain. pp. 253-390.

- **GÁLVEZ, A., ABRIOUEL, H., LÓPEZ, R. L., BENOMAR, N. (2007).** Bacteriocin-based
- **GARNEAU, S., MARTIN, N.I., VEDERAS, J.C., 2002.** Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie* 84, 577-592.
- **GILL A.O. ET HALLEY R.A. 2003.** Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24°C. *Int. J.Food Microbiol.* 80: 251-259.
- **GOULD G.W. 1991.** Antimicrobial compound. In: Biotechnology and Food Ingr
- **GRAVESEN, A., RAMNATH, M., RECHINGER, K.B., ANDERSEN, N., JÄNSCH, L., HÉCHARD, Y., HASTINGS, J.W., KNOCHEL, S. (2002).** High-level resistance to class IIa bacteriocins is associated with one general mechanism in *L. monocytogenes*. *Microbiology*, **148** : 2361- 2369.
- **GUARDABASSI L., COURVALIN P. (2006).** Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance. In:Aarestrup F.M. (Ed.), Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. ASM Press : Washington ; p : 1-18.
- **GUESSAS B., HADADJI M., SAIDI N. ET KIHAL M. 2006.** Inhibition of
- **GUIRAUD J.P. (2003).** Microbiologie alimentaire. Edition DUNOD. P.
- **GUIRAUD J.P. 2003.** Microbiologie alimentaire. Edition DUNOD. P.
- **H. CHEN, D.G. HOOVER,** Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Rev. Food Sci. Food Safety*, 2 (2003) 82–100.
- **HAMMES W.P. ET HERTEL C. (2009).** Genus I. *Lactobacillus*. Dans: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.
- **HANCOCK, R. E. (2000)** Cationic antimicrobial peptides: towards clinical applications. *Expert Opin Investig Drugs*.**9**: 1723-1729.
- **HASSAN A.N. ET FRANK J.F., 2001.** Starter Cultures and their use. In: Applied Dairy Microbiology (Marth E.H. et Steele J.L.) *2e Ed., Marcel Dekker, Inc.* New York. 151-205.
- **HÉCHARD, Y., PELLETIER, C., CENATIEMPO, Y., FRÈRE, J. (2001)** Analysis of sigma(54)-dependent genes in *Enterococcus faecalis* : a mannose PTS permease (EII(Man)) is involved in sensitivity to a bacteriocin, mesentericin Y105. *Microbiology*, **147** : 1575 1580.
- **HERNANDEZ D, CARDELL E ET ZARATE V. (2005).** Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese : initial characterization of plantaricin TF711 A bacteriocin-like Substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. *Journal of Applied Microbiology*. 99, 77-84.

- **HERNANDEZ D., CARDELL E. ET ZARATE V. (2005).** Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheeses: Initial characterization of plantaricin TF 711, bacteriocin like substance produced by *Lactobacillus plantarum*. TF 711. *J. Appl. Microbiol.* 99: 77-84
- **HIRSCH, A, E GRINSTED, H.R CHAPMAN, ET A.T.R MATTICK.** «A note on the inhibition of an anaerobic sporeformer in Swiss-type cheese by a nisin-producing *Streptococcus*.» *J Dairy Sci* 18 (1951): 205–206.
- **HOLS P., HANCY F., FONTAINE L., GROSSIORD B., PROZZI D. ET LEBLOND-BOURGET N., (2005).** New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiology Reviews*, 29:435–463.
- **HUGAS, M., GARRIGA, M ET AYMERICH, M.T. (2003).** Functionally of enterococci in meat product. *Int. J. Food Microbiol.* 88(2-3): 22-33. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 on beef by application of organic acids. *J. Food Prot.* 59: 370-373. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bacteriocin-producing *Pediococcus* during manufacture of fermented semi-dry sausage. *J. Food Protect.* 53: 194-197.
- **JEHL F. (2003).** Pharmacocinétique et pharmacodynamie des glycopeptides. *Antibiotiques* 2003 ; 5: 89-98.
- **JOHN S., 2002.** Pratique cliniques en bactériologie, mycologie et parasitologie. Paris 28-51
- **JOLY B. ET REYNAUD A. 2007.** Entérobactéries : systématique et méthodes de diagnostic. Edition Techniques et Documentation. Paris.
- **KHODJA Badra (2017).** Caractérisation phénotypique et moléculaire des souches de bactéries lactiques productrice de bactériocine. Thèse de doctorat. Université Djillali Liabes de Sidi Bel Abbes
- **KIHAL.M, HENNI J,H..PREVOST ET DIVIÉS.C(2006).** A new manometric methode for measuring carbon dioxide production by dairy starter culture : a cause of *leuconostoc meenteroides*.*Int.African J. Biotechnol.* Vol.5(4): 378-383.
- **KLAENHAMMER T.R., 1993.** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Review* 12, 39-85.
- **KLAENHAMMER, T.R.** «Bacteriocins of lactic acid bacteria.» *Biochimie* 70 (1988): 337-349.

- **KLAENHAMMER, T.R., 1988.** Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70, 337-349.
- **KONG S. ET DAVISON A.J. 1980.** The role of interactions between O₂, H₂, OH⁻ and O₂ in free radical damage to biological systems. *Arch. Biochem. Biophys.* 204: 13-29.
- **KULSHRESTHA D.C. ET MARTH E.H. 1974.** Inhibition of bacteria by some volatile and nonvolatile compounds associated with milk. I. *Escherichia coli*. *J. Milk Food Technol.* 37:510-516.
- **LABIOUI H, ELMOUALDI L, EL YACHIOUI M ET OUHSSINE M. (2005).** Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux. 144, 237-250.
- **LABIOUI, H., ELMOUALDI,L., EL YACHIOUI,M ET OUHSSINE,M.(2005)** Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes.Bull.Soc.Pharm.Bordeaux.144 :237-250.
- **LACHANCE, M. (2000).**Purification et caractérisation d'une bactériocine produite par *Lactococcus Lactis supp.Lactis* MJC15.Mémoire (MSc.)Faculté des études supérieures de l'université Laval. *Lactea Latinoamericana*.7. *Lactococcus lactis. Res Microbiol.***152**: 131-139.
- **LAMNAOUER D. 2002.** Détermination des propriétés biologiques (activités pharmacologiques et toxicologiques) des plantes médicinales et aromatiques du PNT. Programme de l'UICN en Afrique du Nord.
- **LANSING M., PRESCOTT, JOHN P., HARLEY, DONALD A. KLEIN, (2003).** Microbiologie De Boeck Supérieur, P 549
- **LEROY, F. AND DE VUYST, L. (2004).** Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology* 15, 67-78.
- **LEVEAU J.Y, BOUIX M, DE ROISSART H. 1991.** La flore lactique In Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaire. Bourgois C.M, Leveau J.Y.Edition : Techniques et documentations, Lavoisier. Paris. pp 152-186.
- **LOZNIEWSKI A., RABAUD C. (2010).** Resistance bacterienne aux antibiotiques. Infections associées aux soins, Nancy : 4P.
- **LOZNIEWSKI A., RABAUD C. (2010).** Resistance bacterienne aux antibiotiques Infections associées auxsoins ; Nancy. Juillet 2010.

- **LUQUET F.M. ET CORRIEU G., 2005.** Bactéries lactiques et probiotiques. Santé et Nutrition. France. 306p.
- **M. BAKAR DIOP, R. DUBOIS-DAUPHIN, E. TINE, A. NGOM, J. DESTAIN, P. THONART,** Bacteriocin producers from traditional food products. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 11 (2007) 275–281.
- **M. BASSIROU FALL. (1999).** Evaluation de la prescription des Antibiotiques dans la region de Kaolack (sénégal). Thèse de Doctorat en pharmacie à université CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR.
- **M. MOOSAVI-NASAB, Z. ALAHDAD, et SH. NAZEMI , (2009).** Characterization of the Dextran Produced by *Leuconostoc mesenteroides* from Date Fruit Extract. *Iran Agricultural Research*, Vol. 27, No. 1-2, 2008 and Vol. 28 No. 1, 2009
- **MADI N. (2010).** Criblage de souches de bactéries lactiques douées d'activité antibactérienne envers *Staphylococcus aureus* multirésistant. Mémoire de Magister en Microbiologie Appliquée. Université A/MIRA de Béjaia. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. 89p.
- **MAGNUSSON J. ET SCHNÜRER J. 2001.** *Lactobacillus coryniformis* subsp.
- **MARCHADIER Elodie, 2009.** Etude fonctionnelle d'un centre d'interactions protéiques chez *Bacillus subtilis* par une approche intégrée. Thèse de doctorat. Université PARIS XI UFR SCIENTIFIQUE D'ORSAY
- **MARGARET, A.R, ET E.W JOHN .** «BACTERIOCINS: Evolution, Ecology, and Application.» *Annu Rev Microbiol* 56 (2002): 117–137.
- **MARTINEZ JL, BAQUERO F, ANDERSSON DI. (2007).** Predicting antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* ; 5(12) : 958-65.
- **MATTICK , A.T.R, ET A HIRSCH.** «Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci.» *Lancet* 2 (1947): 5–7.
- **MCAULIFFE, O, T O'KEEFFE, C HILL, AND R.P ROSS. (2001)** "Regulation of immunity to the two-component lantibiotic, lactacin 3147, by the transcriptional repressor LtnR." *Mol Microbiol* 39: 982-993.
- **MICHEL FEDRIGHI, 2005.** Bactériologie alimentaire. Compendium d'hygiène des aliments. 2^{ème} édition. Page
- **MOFREDJ, A., BAHLOUL, H., CHANUT, C., 2007.** *Lactococcus lactis* : un pathogène opportuniste. *Revue générale. Médecine et Maladies infectieuses* 37, 200-207.

- **MOLL. G. N; KONINGS. W. N; DRIESSEN. J. M. (1999)** .Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation .*Antonie Van Leeuwenhoek* 76: p 182
- **MORAES, M.P, L.M PERIN, M.B.T ORTOLANI, A.K YAMAZI, G.N VIÇOSA, AND L.A NERO.** "Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic." *Food Sci.Technol* 43 (2010): 1320-1324.
- **MORISSET ET AL (2002).** in *bacteries lactiques : physiologique, métabolisme, génomique et applications industrielles* édition : Economica .2009.
- **MOZZI, F., RAYA, R. R., VIGNOLO, G. M. (2010).** *Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications.* Blackwell publishing, Singapore.
- **MURRAY BE. (1990)**The life and times of the *Enterococcus*.*ClinMicrobiol Rev* 1990 ; 3 : 46-65.
- **NAGHMOUCHI, K., DRIDER, D., KHEADR, E., LACROIX, C, PREVOST, H. et FLISS, I. (2006).** Multiple characterizations of *Listeria monocytogenes* sensitive and insensitive variants to divergicin M35, a new pediocin-like bacteriocin. *Journal of Applied Microbiology.* 100: 29-39.
- **NIGUTOVA, K., MOROVSKY, M., PRISTAS, P., TEATHER, R.M., HOLO, H., JAVORSKY, P., 2007.** Production of enterolysin A by rumen *Enterococcus faecalis* strain and occurrence of enlA homologues among ruminal Gram+ cocci. *Journal of Applied Microbiology* 102, 563-569.
- **NIKAIDO H. (2009).** Multidrug resistance in bacteria. *Annu. Rev. Biochem.*, 78, 119-146.
- **NILSEN, T., NES, I.F., HOLO, H., 2003.** Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG2333. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 2975-2984.
- **O. KANDLER AND N. WEISS,** "Regular, Nonsporing Gram-Positive Rods," In: P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt, Eds., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams and Williams, Baltimore, 1986, pp. 1208-1234. of *Action of Food Preservation Procedures*, Elsevier Applied Science, London, pp. 161-200.
- **OGIER J.C., CASALTA E., FARROKH C. ET SAIHI A. 2008.** Safety assessment of dairy microorganisms : The *Leuconostoc* genus. *International Journal of Food Microbiology* 126 p 286- 290.
- **OPPEGARD ET AL (2007).** In *Les bactériocines des bactéries lactiques caractéristiques et intérêts pour la bio conservation des produits alimentaires.* BASE.VOLUME 13.
- **OSMAN M., 2011.** L'examen cyto bactériologique de pus .Mém : de fin d'étude en vue d'obtention d'un diplôme d'état. Université Stif.

- **OUWEHAND A.C. et VESTERLUND S. 2004.** 11 Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: Salminen S., Ouwehand A., Von Wright A. (eds.). *Lactic Acid*
- **OUWEHAND, A. C., KIRJAVAINEN , P. V., GRONLUND, M. M., ISOLAURI, S. J ET SALMINEN, S. (1999).** Adhesion of probiotic microorganisms to intestinal mucus. *International Dairy Journal*, **9**:623-630.
- **OYETAYO V.O., ADETUYI F.C. et AKINYOSOYE F.A. 2003.** Safety and protective effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* used as probiotic agent *in vivo*. *Afr. J. Biotech.* **2**: 448-452.
- **PAPAGIANNI, M., 2003.** Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function and applications. *Biotechnology Advances* **21**, 465- 499.
- **PARENTE E., RICCIARDI A. ET ADDARIO G. 1994.** Influence of pH on growth and bacterioc production by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* 140NWC during batch fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41**: 388-394.
- **PATTON ET AL., (2005).** In Les bactériocines des bactéries lactiques caractéristiques et intérêts pour la bio conservation des produits alimentaires. BASE.VOLUME 13
- **PIARD J.C. ET DESMAZEAND M., 1991.** Inhibiting factors produced by lactic and bacteria part L.oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait.* **71**: 525-
- **PIARD J.C. ET DESMAZEAND M., 1991.** Inhibiting factors produced by lactic and bacteria part L.oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait.* **71**: 525-541.
- **PIARD JC. , DESMAZEAUD M. (1991).** Inhibitions' factors produced by lactic acid bacteria: Bacteriocins and other antibacterial substances. *Le lait*, **72**, 113-142.
- **PILET M.F., MAGRAS C., FEDERIGH M., 2005.** Bactéries lactiques. *In* : bactériologie alimentaire (Federighi M.). *2e Ed., Economica.* Paris. 219-240.
- **PODOLAK P.K., ZAYAS J.F., KASTNER C.L. ET FUNG D.Y.C. 1996.**
- **POOLE K. (2004).** Resistanceto beta-lactamantibiotics. *Cell Mol Life Sci.* **61(17)**: 2200-2223.
- **POPOFF M.Y. 2001.** Antigenic formulas of the Salmonella serovars, 8th ed. WHO Collaborating center for reference and research on *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris, France.
- **POT B., 2008.** The taxonomy of lactic acid bacteria. *In* : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). *Tec & Doc, Lavoisier.* Paris.1 106.
- **R.W. JACK, J.R. TAGG et B. RAY,** Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Microbiol Rev*, **59** (1995) 171–200.

- **RACCACH M., MC GRATH R. ET DAFTARIAN H. 1989.** Antibiosis of some lactic acid bacteria including *Lactobacillus acidophilus* to ward *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.*
- **RAO D.R., REDDY A.V., PULUSANI S.R. ET CORNWELL P.E. 1984.**
- **ROGERS, L.A. (1928):** “The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*”. *J. Bacteriol* 5 161-168.
- **ROSS, R. P., MORGAN, S. AND HILL, C. (2002).** Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology* 79, 3-16.
- **ROSS, R. P., MORGAN, S., AND HILL, C. (2002)** Preservation and fermentation: past, present and future. *Int J Food Microbiol.* 79: 3-16.
- **RUOFF, K. L. (2007).** *Aerococcus, Abiotrophia, and Other Aerobic Catalase-Negative, Gram-Positive Cocci.* In P. R. Murray, E. J. Baron, M. L. Landry, J. H. Jorgensen & M. A. Pfaller (Eds.), 9th ed., pp. 443-454
- **S.MONTERSINO, A. PRIETO, R.MUÑOZ, AND B. DE LAS RIVAS (2008).** Evaluation of Exopolysaccharide Production by *Leuconostoc mesenteroides* Strains Isolated from Wine. *Journal of Food Science.* ScholarOne, 375 Greenbrier Drive, Charlottesville, VA, 22901.
- **SAVADOGO A, OUATTARA CHEIK A T, BASSOLE IMAEL H N ET TRAORE A S. (2004).** Antimicrobial Activities of Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Burkina Faso Fermented Milk. *Pakistan Journal of Nutrition.* 3 (3), 174-179.
- **SAVIJOKIE K., INGMER H. ET VARMANEN P., 2006.** Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl.Microbiol. Biotechnol.* 71 : 394-406.
- **SCARDOVI, V.,(1986).** Section 15. Irregular nonsporing. Gram-positive rods. Genus *Bifidobacterium* Orla- Jensen 1924. In: Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E., Sharpe and J.G. Holt (Eds.). *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology.* 9th Edn., Williams and Wilkins Co., Baltimore, 2: p 1418-1434.
- **SCHILLINGER U. ET LÜCKE K. (1989).** Antimicrobial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1901-1906.
- **SCHLEIFER, K. H., EHRMANN, M., BEIMFOHR, C., BROCKMANN, E., LUDWIG, W. AND AMANN, R. (1995).** Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* 5, 1081-1094
- **SHAH, N.P. ,(2000) :** Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods, *Journal of Dairy Science* , 83, 894-907

- **SHOLEVA Z., STEFANOVA S. ET CHIPEVA V. 1998.** Screening of antimicro
- **SMITH J.L. ET PALUMBO S.A. 1983.** Use of starter cultures in meats. *J. Food Prot.* 46: 11, 997-1006.
- **SMITH L. ET PALUMBO M. 1983.** De Bacterias Lacticas: Novel approaches for the development of lactic acid bacteria resistant to phages. Aniverario. *Technologia*
- **SMULDERS F.J.M., BARENDSEN P., VAN LOGTESTIJN J.G., MOSSEL D.A.A. ET VAN DER MAREL G.M. 1986.** Review: Lactic acid: considerations in favor of its acceptance as a meat decontaminant. *J. Food Technol.* 21: 419-436.
- **SOUNA DJAHIDA ; 2011.** Epidémiologie de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries au niveau du C.H.U de Sidi Bel Abbes. Mém : Magister. Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen *Staphylococcus aureus* Growth by Lactic Acid Bacteria in Milk. *Dirasat, Agricultural Sci.* 32: 3, 304-312.
- **STILES, M. E. (1996)** Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 70: 331-345.
- **STILES, M.E.** "Biopreservation by lactic acid bacteria." *Antonie van Leeuw* 70 (1996): 331-340.
- **STILS M.E. and Holzapfl w.H. (1997),** *Int. J. food Microbiol.* ,36:1-29. Th. Méd. Vét., Dakar, 1997, n09, III p.
- **SUTRA L., FEDERIGHI M. ET JOUVE J. L., (1998).** Manuel de bactériologie alimentaire. Ed : POLYTECHNICA, Paris, 308(6) : 31-249.
- **SYLVIE C. 2009.** Art : La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important!
- **T. MATILLA-SANDHOLM, J. MÄTTÖ, M. SAARELA,** LAB with health claim interactions and interference with gastrointestinal flora. *Int. Dairy J.* 9 (1999) 25–35.
- **T.R. KLAENHAMMER,** Bacteriocin of lactic acid bacteria. *Biochimie,* 70 (1988) 337 – 349.
- **TAGG J.R. ET MCGIVEN A.R. (1971).** Assay system for bacteriocins. *J. Appl. Microbiol.* 21: 943.
- **TAILLIEZ, P., QUIBERONI, A., REZAIKI, L., EL KAROUI, M., BISWAS, I., AND GRUSS, A. (2001)** Distinctive features of homologous recombination in an 'old' microorganism,
- **TALARICO T.L. et DOBROGOSZ W.J 1989.** Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33 : 674-679.

- **TALARICO T.L., CASAS I.A., CHUNG T.C. et DOBROGOSZ W.J. 1988.** Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 1854-1858.
- **THOMPSON J.K, M.A COLLINS. ET W.D. MERCER, (1996)** Characterisation of a proteinaceous antimicrobial produced by *Lactobacillus helveticus* CNRZ 450. *J. Appl. Bacteriol*, 80 338– 348.
- **TINDALL B.J., GRIMONT P.A.D., GARRITY G.M., EUZÉBY J. 2005,** Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*, *Int*
- **VESCOVO, M, S TORRIANI, C ORSI, F MACCHIAROLO, AND G SCOLARI.** "Application of antimicrobialproducing lactic acid bacteria to control pathogens in ready-to-use vegetables." *Journal of Applied Bacteriology* 81 (1996): 113–119.
- **VINCENT. J.(2000).** Bactéries multirésistantes dans les hôpitaux français : bilan en 2000et perspectives de surveillance nationale dans le cadre du Réseau d'Alerte d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales (RAISIN)
- **VOLLENWEIDER, S. (2004)** "3-hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production." *Appl Microbiol Biotech* 64: 16-27.
- **WEILL F.-X. 2009.** *Salmonella*: épidémiologie, typage et résistance aux antibiotiques. Centre national de référence des *Salmonella* Laboratoire des bactéries pathogènes émergentes. Institut Pasteur Elsevier Masson SAS. *Revue Francophone Des Laboratoires.*
- **ZALAN, Z, A BARATH, AND A HALASZ.** "Influence of growth medium on hydrogen peroxide and bacteriocin production of *Lactobacillus* strains." *Food Technol Biotech* 43 (2005): 219-225.

Annexes

Annexe I : Composition des milieux de cultures (Formule en g/l d'eau distillée)**➤ Milieu MRS (de Man Rogosa et Sharpe, 1960)**

- Extrait de levure..... 5g
- Extrait de viande..... 5g
- Peptone..... 10 g
- Acétate de sodium..... 5g
- Citrate de sodium2g
- Glucose20g
- KH₂PO₄2g
- MgSO₄0.1g
- MnSO₄ 0.05 g
- Agar12g
- Tween801 ml
- Eau distillée1000 ml
- pH=6.5 ± 0.2 à 37°C Autoclavage : 121°C /15min.
- **MRS semi solide**.....agar 7g

➤ Milieu Mueller-Hinton (Mueller et Hinton, 1941)

- Infusion de viande de boeuf3000 cm³
- Peptone de caséine17,5 g
- Amidon de maïs1,5 g
- Agar-agar17 g
- pH 7.4 Autoclavage 120°C/ 20 minutes

➤ Gélose nutritive

- Extrait de viande 1 g
- Extrait de levure2 g
- Peptone5 g
- Chlorure de sodium5 g
- Agar-agar15 g
- Eau distillée1000 ml
- pH 7,4 Autoclavage 120 °C pendant 20 minutes

➤ Bouillon nutritif

- Extrait de viande1 g
- Extrait de levure2 g
- Peptone5 g
- Chlorure de sodium5 g
- Eau distillée1000 ml
- pH 7,4 Autoclavage 120 °C pendant 20 minutes

➤ Milieu de Chapman (JOFFIN et GUY, 2006).

- Peptones.....10g
- Extrait de viande de b.....1,0g
- Chlorure de sodium.....75, 0g
- Mannitol.....10, 0g
- Rouge de phénol.....0, 025g
- Agar.....15,0g
- pH=7,4

➤ Milieu Hektoen (JOFFIN et GUY, 2006).

- Protéose-peptone.....12,0g
- Extrait de levure.....3,0g
- Lactose.....12,0g
- Saccharose.....12,0g
- Salicine.....2,0g
- Citrate de fer III et d'ammonium.....1,5g
- Sels biliaires.....9,0g
- Fuschine acide.....0,1g
- Bleu de bromothymole.....0,065g
- Chlorure de sodium.....5,0g
- Thiosulfate de sodium.....5, 0g
- Agare.....13,0g
- PH=7,5

➤ Gélose de MacCONKEY

- Peptone pancréatique de gélatine17,0 g
- Tryptone.....1,5 g
- Peptone pepsique de viande1,5 g
- Lactose10,0 g
- Sels biliaires.....1,5 g
- Chlorure de sodium.....5,0 g
- Rouge neutre30,0 mg
- Cristal violet1,0 mg
- Agar agar bactériologique.....13,5 g
- pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,1 ± 0,2.

Annexe II : Tableau de la cinétique de croissance des BMR en fonction du temps, en présence et en absence de surnagent (SS : sans l'ajout de surnageant, 86 : en présence de surnageant de la souche lactique S86, 14 : en présence de surnageant de la souche lactique S14).

	<i>Salomnelle typhi</i>			<i>Enterococcus faecalis</i>			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Bacillus subtilis</i>			<i>Streptococcus sp</i>			<i>Klebsiella</i>		
	S	+8	+1	S	+8	+1	S	+8	+1	S	+8	+1	S	+8	+1	S	+8	+1	S	+8	+1
T₀	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1
1h	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
2h	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
3h	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
4h	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
5h	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.4	0.4	0.4	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.3	0.4	0.4
6h	0.4	0.3	0.3	0.4	0.3	0.3	0.4	0.3	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
7h	0.4	0.3	0.3	0.4	0.3	0.3	0.4	0.3	0.3	0.5	0.3	0.3	0.4	0.3	0.3	0.4	0.4	0.3	0.4	0.4	0.3
8h	0.4	0.2	0.3	0.4	0.2	0.2	0.4	0.3	0.2	0.5	0.2	0.3	0.5	0.3	0.3	0.5	0.3	0.3	0.5	0.3	0.3
9h	0.4	0.2	0.2	0.4	0.2	0.2	0.5	0.2	0.2	0.5	0.2	0.2	0.5	0.2	0.2	0.5	0.2	0.2	0.5	0.2	0.2
10 h	0.4	0.2	0.1	0.5	0.2	0.1	0.5	0.2	0.1	0.6	0.1	0.1	0.6	0.2	0.2	0.5	0.2	0.2	0.6	0.2	0.2

Résumé

Au cours des dernières années, un intérêt croissant pour l'utilisation des bactéries lactiques a été observé pour leurs propriétés probiotiques et antimicrobiennes. Le but de ce travail est la sélection des bactéries lactiques productrices de substances antimicrobiennes.

L'étude des interactions de 18 souches lactiques isolées à partir d'un fromage traditionnel (J'ben) préparé à base de lait de vache et de chèvre ; a révélé une activité antimicrobienne inhibitrice vis-à-vis des bactéries multi résistantes (*S.aureus* et *E. coli*, *Bacillus Sublitis*, *Pseudomonas aeruginosa*). L'effet antagoniste a été évalué par des techniques de diffusion sur gélose (méthode de double gélose, méthodes des puits) par la production de bactériocine remarquée par l'apparition des zones d'inhibition.

Une caractérisation physico-chimique indique que les substances antimicrobiennes étudiées présentent une forte thermorésistance (traitement à 70°C 90°C 110°C pendant 20 min). Ces substances inhibitrices sont entièrement détruites sous l'action des enzymes protéolytiques. Ces propriétés suggèrent que cette bactériocine appartient à la classe II (bactériocine-lik). La cinétique de croissance des bactéries multi résistantes en présence et en absence de la bactériocine produite par (S14 et S86) a montré que la biomasse bactérienne a diminué progressivement après l'ajout des bactériocines.

Les résultats de cette étude des interactions inhibitrices nous ont permis d'indiquer que ces souches lactiques sont satisfaisantes pour une utilisation médicale à l'égard de bactéries pathogènes car elles possèdent un bon pouvoir antimicrobien.

Mots-clés : bactéries lactiques, substances inhibitrices, bactériocine, bactéries multirésistantes, activité antimicrobienne.

Abstract

In recent years, a growing interest in the use of lactic acid bacteria has been observed for their probiotic and antimicrobial properties. The purpose of this work is the selection of lactic acid bacteria producing antimicrobial substances.

The study of the interactions of 18 lactic strains isolated from a traditional cheese (J'ben) made from cow's milk and goat's milk; revealed inhibitory antimicrobial activity against multi-resistant bacteria (*S.aureus* and *E. coli*, *Bacillus Sublitis*, *Pseudomonas aeruginosa*). The antagonistic effect was evaluated by agar diffusion techniques (double agar method, well methods) by the production of bacteriocin observed by the appearance of the zones of inhibition.

A physico-chemical characterization indicates that the antimicrobial substances studied have a high heat resistance (treatment at 70 ° C. for 90 minutes at 110 ° C. for 20 minutes). These inhibitory substances are completely destroyed by the action of proteolytic enzymes. These properties suggest that this bacteriocin belongs to class II (bacteriocin-lik). The growth kinetics of multi-resistant bacteria in the presence and absence of the bacteriocin produced by (S14 and S86) showed that the bacterial biomass decreased gradually after the addition of bacteriocins.

The results of this study of the inhibitory interactions allowed us to indicate that these lactic strains are satisfactory for a medical use with regard to pathogenic bacteria because they possess a good antimicrobial power.

Key words: lactic acid bacteria, inhibitory substances, bacteriocin, multidrug-resistant bacteria, antimicrobial activity.

المخلص

في السنوات الأخيرة ، لوحظ اهتمام متزايد في استخدام بكتيريا حمض اللبن لخصائصها بروبيوتيك ومضادة للميكروبات. الغرض من هذا العمل هو اختيار بكتيريا حمض اللبن المنتجة للمواد المضادة للميكروبات.

تم دراسة تفاعلات 18 سلالة لكتيك معزولة من جبنة تقليدية (جبنة) مصنوعة من حليب البقر وحليب الماعز ؛ كشف النشاط المثبط لمضادات الميكروبات ضد البكتيريا المتعددة المقاومة.

وقد تم تقييم التأثير المضاد بواسطة تقنيات أجار من خلال إنتاج bacteriocines الذي لوحظ من خلال ظهور مناطق تثبيط ضد البكتيريا المتعددة المقاومة. (*S.aureus* et *E. coli*, *Bacillus Sublitis*, *Pseudomonas aeruginosa*).

تشير الخصائص الفيزيائية والكيميائية إلى أن المواد المضادة للميكروبات التي تمت دراستها لها مقاومة عالية للحرارة مع تثبيطها بشكل كامل عن طريق عمل الانزيمات المحللة للبروتين. هذه الخصائص تشير إلى أن هذه المواد المضادة للميكروبات تنتمي إلى فئة (bacteriocine-lik)

أظهرت حركيات نمو البكتيريا المتعددة المقاومة في وجود وغياب bacteriocine التي تنتجها S14 و S86 أن الكتلة الحيوية البكتيرية انخفضت تدريجياً بعد إضافة bacteriocine. تشير نتائج هذه الدراسة للتفاعلات المثبطة إلى أن هذه السلالات اللبنية مرضية للاستخدام الطبي فيما يتعلق بالبكتيريا المسببة للأمراض لأنها تمتلك قوة جيدة مضادة للميكروبات.

كلمات البحث: بكتيريا حمض اللبن ، المواد المثبطة ، bacteriocine ، البكتيريا المقاومة للأدوية المتعددة ، النشاط المضاد للميكروبات