

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



Mémoire de Fin d'Etudes

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER ACADIMIQUE

Domaine: Sciences de la nature et de la vie

Filière: Biologie

Spécialité: Microbiologie appliqué

Présenté par : Saidi Ferial

Guennoun Faiza

Thème

**Pouvoir antimicrobien des souches *Leuconostoc*
isolées à partir du lait de chèvre**

Devant le jury :

| | | | |
|---|---------------------|----------------|--------------------|
| Mr Hennie Abdallah | Président | M.C.A. | UKM Ouargla |
| Mr Bouricha M'hamed | Encadreur | M.A. A. | UKM Ouargla |
| M^{elle} Djelloul Daouadji.S | Examinatrice | M.C.B. | UKM Ouargla |

Année universitaire:2020/2021

Remerciements



Nous adressons en premier lieu ma reconnaissance à notre *Dieu* tout puissant, de nous avoir permis d'en arriver là, car sans lui rien n'est possible.

Nous désirions exprimer nos sincères remerciements à *Mr Bouricha M'hamed*, notre encadreur du mémoire, qui nous a accordé beaucoup de son temps, Nous le remercions pour sa disponibilité, pour la confiance qu'il nous a apportée tout au long de ce travail, pour son soutien et son aide dans les difficultés de ce travail...

Nous remercions particulièrement Mr Henni Abdallâh de conférences à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, de l'université Kasdi Merbah Ouargla avoir accepté de présider le jury.

Nous voudrions également à présenter nos plus vifs remerciements à *M^{elle} Djeulloul Daouadji.S S*, maître-de conférence à l'Université Kasdi Merbah Ouargla pour l'honneur qu'il nous fait en acceptant d'examiner ce travail.

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

Mes remerciements vont également à mes enseignants surtout *M^{elle} Baldi Nadia* qui nous ont accompagné pendant mon cursus universitaire.

Nos très spéciaux remerciements reviennent à nos parents, et aux familles Guennoun et Saidi, et Haroune et à tous nos amis Hinda, Ayoub, Slimane, Abdellhake, Narimene, Chahinezze, mayssoune, ichrake, Rania, pour leurs encouragements et leurs compréhensions.

Enfin, nous ne pouvons pas terminer sans remercier tous nos camarades de la promotion (2020/2021).

Dedicace

Avec l'aide de Dieu

C'est avec l'aide et la grâce du DIEU que j'ai achevé cet humble travail que je dédie ...

A mon père Abde elkader : Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous...Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuits pour mon éducation et mon bien être.

A ma mère: Tu représentes le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et prier pour moi ; ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études Ce travail est le fruit de vos sacrifices cher parents vous avez Consentis pour mon éducation et ma formation.

A mes très chers frères : Caoukie ; Ismahan ; Narimene ; Nawal

Je leur souhaite tout le bonheur du monde, et qu'ils soient heureux dans leur vie.



Faiza

Liste des Tableaux

| Numéro | Titre | Page |
|-----------|---|------|
| Tableau 1 | Bactériocines de classe III produites par des bactéries lactiques (Nilsen et al., 2003 ; Papagianni, 2003 ; Nigmatova et al., 2007). | 16 |
| Tableau 2 | les importants bactériocines produits par les bactéries lactiques (Serlene et al.2021). | 16 |
| Tableau 3 | Souches utilisées dans le test antimicrobien | 26 |
| Tableau 4 | Tableau représentant les résultats des tests physiologiques. | 34 |
| Tableau 5 | Résultats du profil fermentaire des souches des souches de bactéries lactiques isolées. | 37 |
| Tableau 6 | Tableau représentent le diamètre des zones d'inhibition (méthode direct Fleming et al. 1975). | 39 |
| Tableau 7 | Tableau représentés le diamètre des zones d'inhibition par Méthode de diffusion | 41 |

Liste des figures

| Numéro | Intitulé | Page |
|-----------|---|------|
| Figure 1 | Arbre phylogénique des bactéries lactiques et comparaison avec les genres <i>Aerococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Listeria</i> et <i>Staphylococcus</i> (Axelsson, 2004). | 07 |
| Figure 2 | Fixation des <i>Leuconostokes</i> sur les moules en grès-vernissé (Examen en microscopie électronique de balayage, 11 500×).Photo Micheline Rousseau - Christiane Le Gallo INRA -C.R. Jouy-en-Josas | 09 |
| Figure 3 | Structures tridimensionnelles de quelques bactériocines de classe IIa RB. | 15 |
| Figure 4 | Mode d'action des bactériocines de bactéries lactiques (Cotter et al., 2005). | 18 |
| Figure 5 | Méthode des spots (Fleming et al., 1975) . | 27 |
| Figure 6 | méthode des puits (Barefoot et Klaenhammer, 1983) | 28 |
| Figure 7 | Aspect des souches pures des <i>Leuconostoc</i> sur bouillon MRS. | 31 |
| Figure 8 | Aspect macroscopique des souches pures des <i>Leuconostoc</i> sur gélose MRS. | 31 |
| Figure 9 | Observations microscopiques des souches isolées après une coloration de Gram à grossissement x100. | 32 |
| Figure 10 | Test de catalae (A : test négative ; B : test positive). | 33 |
| Figure 11 | Type fermentaire des souches isolées (<i>Leuconostoc</i>) sur bouillon MRS. | 35 |
| Figure 12 | Test de l'hydrolyse de l'arginine par l'apparition des colonies de couleur jaune sue gélose M17.BCP. | 36 |
| Figure 13 | La dégradation des sucres par les souches de <i>Leuconostoc</i> . | 36 |
| Figure 14 | L'aspect des colonies productrices de dextrane sur gélose MSE | 38 |
| Figure 15 | Révélation de l'utilisation de citrate par l'apparition de contour bleu sur gélose KMK d'espèces <i>Ln. Mesenteroide</i> | 39 |

| | | |
|-----------|---|----|
| Figure16 | Histogramme représentent le diamètre des zones d'inhibition (méthode direct Fleming et al. 1975). | 40 |
| Figure 17 | Test de l'activité antimicrobiennes de <i>Leuconostoc mesentéroïdes ssp mesenteroides</i> par méthode direct (Fleming et al. 1975). | 41 |
| Figure 18 | Activité antibactérienne de <i>Leuconostoc mesentéroïdes ssp mesenteroides</i> vis-à-vis <i>Listeria monocytogenes</i> par méthode de diffusion (indirecte). | 42 |
| Figure19 | Histogramme représentés le diamètre des zones d'inhibition par Méthode de diffusion. | 43 |
| Figure 20 | L'étude du suivi de la cinétique de croissance de (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogene</i>) en présence et en l'absence de surnageant de LB1, inoculée dans le milieu de culture liquide MRS, incubée à une température de 30°C pendant 24 heures. | 44 |

Liste des abréviations

| | |
|-----------------------|---|
| Ac | Acide |
| ADH | Arginine di hydrolase |
| ARG | Arginine |
| °D | Degré dornic |
| GN | gélose nutritive |
| KDa | kilo dalton |
| <i>Lact</i> | <i>Lactococcus</i> |
| <i>Leuc</i> | Leuconostoc |
| MG | matière grasse |
| <i>S.thermophilus</i> | <i>Streptococcus thermophilus</i> |
| ssp/ subsp | sous-espèce |
| T° | Température |
| UFC/ml | Unité formant colonie par millilitre |
| Zi | Zone d'inhibition |
| MRS | Man Rogosa et Sharpe |
| MRS BCP | Man Rogosa Sharp additionné de pourpre de bromocrésol |
| MSE | Mayeux Sandine et Elikér |

Table des matières

| | |
|------------------------|----|
| Liste des tableaux | I |
| Liste des figures | II |
| Liste des abréviations | IV |
| Liste des matières | V |
| Introduction | 01 |

Partie01 : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Généralité sur les bactéries lactiques

| | |
|---|----|
| I.1. Définition des bactéries lactiques | 06 |
| I.2. Classification des bactéries lactiques | 06 |
| I.3. Genre <i>Leuconostoc</i> | 07 |
| I.3.1. Historique sur les <i>Leuconostocs</i> | 07 |
| I.3.2. Généralités sur <i>Leuconostocs</i> | 08 |
| I.3.3. Définition des <i>Leuconostocs</i> | 08 |
| I.3.4. Habitat des leuconostoques | 09 |
| I.3.5. L'intérêt des leuconostoques | 10 |
| I.4. Les substances antimicrobiennes | 10 |
| I.4.1. Définition des substances antimicrobiennes | 10 |
| I.4.1.a. Les acides organiques | 11 |
| I.4.1.b. Les Acides gras | 11 |
| I.4.1.c. Le Peroxyde d'Hydrogène | 11 |

| | |
|--------------------------------|----|
| I.4.1.d. Le Dioxyde de carbone | 11 |
| I.4.1.e. Le Diacétyle | 12 |
| I.4.1.f. Les Bactériocines | 12 |

Chapitre II : Les bactériocines

| | |
|---|----|
| II.1.Définition des bactériocines | 14 |
| II.2.Classification des bactériocines | 14 |
| II.2.1. Classe 1: L'antibiotique | 14 |
| II.2.2.Classe II: Bactériocines peptidiques | 15 |
| II.2.2.a. La sous-classe Ia | 15 |
| II.2.2.b.a. Sous-classe IIb | 15 |
| II.2.3.Classe III: Bactériocines protéiques | 15 |
| II.2.4.Classe IV: Bactériocines complexes | 16 |
| II.3.Production des bactériocines | 16 |
| II.4. Mode d'action des bactériocines | 17 |
| II.5.Application des Bactériocines | 18 |
| II.5.a. Dans l'industrie alimentaire | 18 |
| II.5.b.Domains de la médecine humaine | 18 |
| II.6.limite d'utilisation des Bactériocines | 19 |

Partie02 : partie expérimentale

Chapitre1 : Matériel et méthodes

| | |
|----------------------------------|----|
| I. Matériel et Méthodes | 21 |
| I.1. Provenance de l'échantillon | 21 |
| I.2.Prélèvement de lait | 21 |
| I.3.Préparation des dilutions | 21 |
| I.4. Isolement et purification | 22 |

| | |
|--|----|
| I.4.1. Isolement | 22 |
| I.4.2. Purification des isolats | 22 |
| I.5. Pré-identification des isolats | 22 |
| I.5.1. Tests morphologiques | 22 |
| I.5.1.1. L'aspect macroscopique | 22 |
| I.5.1.2. L'aspect microscopique | 22 |
| I.5.1.2.a. Coloration de Gram | 22 |
| I.5.1.2.b. Test de catalase | 23 |
| I.5.3. Conservation des isolats | 23 |
| I.5.3.1. Conservation court terme (courte durée) | 23 |
| I.5.3.2. Conservation longue terme (longue durée) | 23 |
| I.5.4. Tests physiologiques | 23 |
| I.5.4.1. Croissance à différent température | 24 |
| I.5.4.2. Croissance à différent pH | 24 |
| I.5.4.3. Résistance à la salinité | 24 |
| I.5.5. Tests biochimiques | 24 |
| I.5.5.1. Recherche de type fermentaire | 24 |
| I.5.5.2. Utilisations des sucres | 25 |
| I.5.5.3. Hydrolyse de l'arginine | 25 |
| I.5.6. Test biotechnologique | 26 |
| I.5.6.1. Production de dextrane | 26 |
| I.5.6.2. Production des substances aromatiques | 26 |
| I.5.6.3. Production des substances antimicrobienne | 26 |

| | |
|--|----|
| I.5.6.3.a. Interaction microbienne | 26 |
| I.5.6.3.b. Préparation des précultures des bactéries pathogène | 27 |
| I.5.6.b.1.Méthode Direct (Spot agar test) | 27 |
| I.5.6.b.2.Méthode indirecte (well diffusion assays) | 28 |
| I.5.7. Mode d'action des bactériocine | 28 |
| Chapitre2 : Résultats et discussion | |
| II. 1. Isolement et purification | 31 |
| II. 1. 1. Isolement | 31 |
| II.1.2.Caractérisation macroscopique | 31 |
| II.2. Caractérisation microscopique | 32 |
| II. 2 .1.Coloration de Gram | 32 |
| II. 2.2.Test de catalase | 32 |
| II. 3 .Tests physiologique | 33 |
| II. 3.1.Croissance à différentes températures | 33 |
| II. 3.2.Résistance à la salinité | 34 |
| II. 3.1.Croissance à différents pH | 34 |
| II.4. Tests biochimiques | 35 |
| II.4.1.Recherche de type fermentaire | 35 |
| II.4.2.Hydrolyse d'arginine | 35 |
| II.4.3.Test des sucres | 36 |
| II. 5. Tests biotechnologique | 37 |
| II. 5. 1.Production d'exopolysaccharides | 37 |
| II. 5. 2.Production des substances aromatiques | 38 |

| | |
|---|----|
| II. 5. 3.Production des substances antimicrobiennes | 39 |
| II. 5. 3.1.Interaction microbienne | 39 |
| II. 5. 3.1.a.Méthode de détection directe (Fleming et al., 1975) | 40 |
| II. 5. 3.1.b.Méthode indirect (Barefoot et Kaenhammer, 1983) | 41 |
| II. 5.4. Mode d'action des bactériocine | 43 |
| Conclusion et perspective | 48 |
| Références bibliographiques | 51 |
| Annexes | |
| Résumé | |
| Abstract | |
| ملخص | |



Introduction

Introduction

Aujourd'hui, bien que la sécurité sanitaire des aliments soit un problème de santé mondial grave, la plupart du temps les aspects de la transformation et de la conservation des aliments restent à revoir non seulement dans les pays en développement mais aussi dans les pays dits développés. Cela conduit au gaspillage de matières alimentaires qui affecte grandement l'économie alimentaire. Parmi les techniques de conservation disponibles, depuis un passé lointain, des additifs chimiques et des conservateurs sont utilisés pour lutter contre les micro-organismes pathogènes et d'altération se développant sur les surfaces des aliments.

Mais aujourd'hui, une sensibilisation accrue à la santé a attiré les consommateurs vers des aliments naturels et produits de manière traditionnelle avec des avantages accrus pour la santé sans conservateurs chimiques ajoutés. Ainsi, les producteurs alimentaires sont confrontés à des défis en raison des réglementations strictes et de la demande des consommateurs pour des aliments naturels avec une qualité et une durée de conservation améliorées. La bio-conservation peut être une solution à ce problème, qui renvoie en fait à l'amélioration de la sécurité des aliments et à l'allongement de la durée de conservation grâce aux micro-organismes et/ou à leurs produits fermentés (**D. Lahiri et al., 2020**).

Les bactéries lactiques (BL) et leurs métabolites tels que divers acides organiques, acides gras ou acide phényle-lactique, éthanol, peroxyde d'hydrogène, bactériocine et antibiotiques tels que la reutéricycline sont connus pour jouer un rôle important dans la conservation des aliments en contribuant à la saveur, la texture et valeur nutritionnelle des produits alimentaires. Les bactériocines sont un groupe de peptides antimicrobiens de faible poids moléculaire synthétisés par les ribosomes ayant un effet bactéricide ou bactériostatique sur les micro-organismes apparentés et non apparentés. Cette caractéristique en fait un conservateur alimentaire efficace pour le lait, les produits laitiers, la viande et les produits alimentaires fermentés (**D. Lahiri et al., 2020**).

Leuconostoc spp. sont le groupe des bactéries lactiques que l'on trouve principalement dans les produits laitiers fermentés, le vin et les matières premières alimentaires (**Tagg et al., 1976, van Laack et al., 1992**). *Leuconostoc* est un genre de bactéries anaérobies facultatives à Gram positif, placé dans la famille des *Leuconostocaceae*. Les membres de ce genre sont des cocci ou coccobacilles ovoïdes, disposés individuellement, par paires ou formant de longues chaînes. Ils forment des colonies de forme ronde avec des bords lisses, une surface convexe, de couleur blanchâtre ou crème, une consistance collante et une taille de 1 à 4 mm (**Cholakov et al., 2016**).

Introduction

Leuconostoc ssp sont catalase-négatives et oxydase-négatives, et ces propriétés biochimiques les distinguent des staphylocoques (qui sont catalase-positifs et oxydase-négatifs). Toutes les espèces de ce genre sont hétérofermentaire et sont capables de produire du dextrane à partir de saccharose. *Leuconostoc* ssp sont intrinsèquement résistants à la vancomycine. La plage de température de croissance est comprise entre 1°C et 37°C, mais l'optimum se situe entre 20°C et 30°C (Yang *et al.*, 2015 ; Cholakov *et al.*, 2021).

La leucocine A a été le premier type de bactériocine, isolée de *Leuconostoc gelidium* UAL 187(Hastings *et al.*, 1991), qui a été suivie par la découverte et l'identification de divers autres types de bactériocines de *Leuconostoc mesenteroides* subsp (Mat-aragas *et al.*, 2004 ; Todorov *et Dicks* 2005).

La bactériocine communément appelée leucocine appartenant à la bactériocine de classe II, de *Leuconostoc* sp, peut être utilisée comme conservateur des aliments fermentés, il possède aussi un effet antimicrobien contre les bactéries pathogènes, parmi elles on trouve *Listeria monocytogene*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Salmonella typhimurium*. Cette activité antimicrobienne est attribuée à la présence des bactéries lactiques qui produisent des substances antimicrobiennes telles que les bactériocines. Sur le plan hygiénique, elles freinent le développement de la flore indésirable et améliorent la conservation de l'aliment, par l'abaissement du pH et la production de plusieurs métabolites ayant un effet antimicrobien (Hammi, 2016).

Actuellement, il n'y a pas suffisamment de données rapportées dans la littérature scientifique pour l'activité antimicrobienne de *Leuconostoc* ssp. Ce travail consiste à isoler de nouvelles souches de *Leuconostoc* à partir du lait cru de chèvre ayant le pouvoir de produire des substances antimicrobiennes vis-à-vis des bactéries d'altération et pathogènes. Ce mémoire sera divisé en deux parties le premier une partie bibliographique sur les bactéries lactiques et le genre *Leuconostoc*, ainsi des généralités sur les substances antimicrobiennes produites par les BL et *Leuconostoc*.

Et une partie matérielle et méthodes où on a tracé les objectifs suivants :

1. Isolement des bactéries lactiques genre *Leuconostoc* à partir du lait cru de chèvre
2. Identifier et caractériser à l'aide des méthodes phénotypiques et biotechnologiques des *Leuconostocs* cultivables isolées à partir du lait cru de chèvre, produit dans les régions d'Ouargla.

Introduction

3. Etudier des interactions microbiennes des souches *Leuconostoc* vis-à-vis des souches pathogènes.
4. Caractérisation des substances antimicrobiennes produites par les isolats.
5. L'étude de la cinétique de croissances des bactéries pathogènes en absence et en présence des substances produites par les isolats.

Partie01 : Synthèse

bibliographique

Chapitre : Généralité sur les

bactéries lactiques

I.1. Généralité sur les bactéries lactiques

I.1.1. Définition des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont un groupe d'organismes à Gram positif, non sporulés, cocci ou bâtonnets. Ils se caractérisent par la production d'acide lactique comme produit majeur de la fermentation des glucides (**De Vuyst et Leroy, 2007**). Les groupes des bactéries lactiques sont classés dans le phylum *Firmicutes*, classe *Bacilli*, ordre *Lactobacillales*, incluant les principaux genres *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Weissella* (**Mokoena, 2017**). Les bactéries lactiques se trouvent dans les matières végétales, les produits laitiers, les boissons fermentés, les céréales, les jus et dans les cavités humaines et animales (**Papadimitriou et al., 2016**).

Les bactéries lactiques sont tous non pathogènes, anaérobie facultatif ou aéro-tolérants, ont un métabolisme anaérobie facultatif avec un type de fermentation homolactique ou hétéro lactique. Ils ont des besoins nutritionnels complexes en acides aminés, peptides, vitamines, minéraux, glucides, acides gras, ne produisent pas de catalase, oxydase négatif, nitrate réductase négative. Ils colonisent des milieux naturels variés tel que la surface des végétaux et les muqueuses des mammifères (intestin, bouches, vagin et surface de la peau) (**Mokoena, 2017**).

I.1.2. Classification des bactéries lactiques

La classification des bactéries lactiques en différents genres est largement basée sur la morphologie, le mode de fermentation du glucose, la croissance à différentes températures, la configuration de l'acide lactique produit, la capacité de croître à des concentrations élevées en sel et la tolérance aux acides ou aux alcalins. Des marqueurs chimio- taxonomiques tels que la composition en acides gras et les constituants de la paroi cellulaire sont également utilisés dans la classification. De plus, la taxonomie actuelle repose sur de véritables relations phylogénétiques, qui ont été révélées par des travaux approfondis sur la détermination des séquences d'ARNr ou le séquençage direct du d'ARNr 16S (**Axelsson, 2004**).

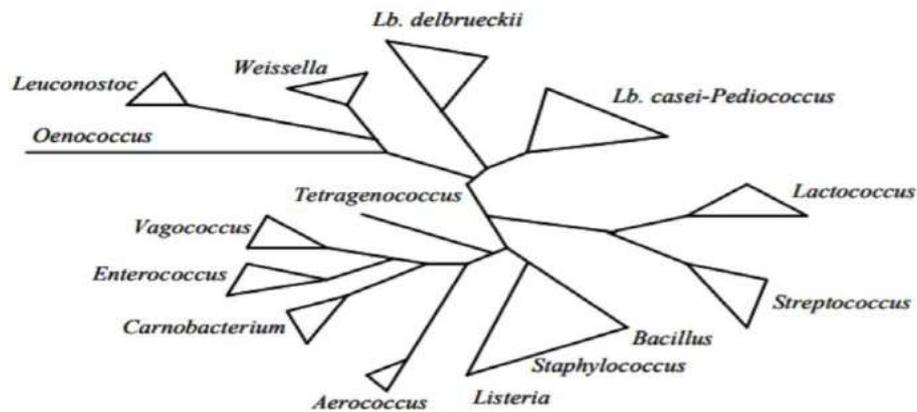


Figure1:(Schéma) Arbre phylogénique des bactéries lactiques et comparaison avec les genres *Aerococcus*, *Bacillus*, *Listeria* et *Staphylococcus* (Axelsson, 2004).

I.3.Genre *Leuconostoc*

I.3.1. Historique sur les *Leuconostoc*

Leuconostoc est un genre de bactéries lactiques. Leur première description a été proposée en 1878, par Van Tieghem (Garvie, 1986), l'isolement des premières souches de *Leuconostoc* produisant du dextrane à partir de saccharose présenté dans le milieu provient des accidents apparus dans les sucreries. En 1918, EVAN trouva que les espèces du genre *Leuconostoc* ont le caractère hétérofermentaire, donc ils sont capables de produire de CO₂ à partir du glucose, et celui-ci a été confirmé par HUCKER en 1928 (Devoyod et Poullain, 1988).

En 1919, une étude sur les bactéries lactiques a été réalisée par ORLA-JENSEN dans laquelle le genre *Betacoccusa* été séparé du genre *Streptococcus* et leur nom vient des betteraves (*Beta communis*) d'où ils ont été trouvés. Puis, ORLA-JENSEN a trouvé pour la première fois et à partir de leurs résultats qu'il y a une relation entre les *Leuconostoc* producteurs de dextrane (*Betacoccus*) et certains streptocoques producteurs de l'acide lactique trouvé dans les produits laitiers. Ce genre a été séparé ensuite en deux espèces par ORLA-JENSEN, *B. arabinosaceus* et *B. bovis* (Devoyod et Poullain, 1988).

I.3.2. Généralités sur *leuconostoc*

Les *Leuconostoc* présentent sous forme de cellules sphériques immobiles, non pigmentés souvent lenticulaires après culture sur gélose, regroupées par deux ou en chaînes. et

en milieu saccharosé, les chaînes de cocci sont entourées d'une gaine bien distincte à l'examen microscopique: gaine qui rappelle celle des Nostocs (**Devoyod et Poullain, 1988**).

Les souches de *Leuconostoc* sont des bactéries lactiques hétéro fermentaires, anaérobies facultatives, catalase-négatif, cocci Gram-positif (**Garvie, 1986 in:Ogier et al., 2008**) asporulées, sphériques, mésophiles(**Garvie,1967 in Bendimerad,2013**), ils se développent entre 20 et 30 °C pas à 45 °C, ils ne sont pas hémolytiques ni pathogènes (**Guiraud, 2003**).

Le contenant de leur ADN en G+C est relativement bas (37-45 mol%).Elles produisent l'acide lactique comme l'un des principaux produits finaux de la fermentation des sucres, et dans beaucoup de cas, elles produisent du dextrane à partir du saccharose (**Deilaglio et al., 1995 ; Garvie,1986in :Lee et al., 2005**).

La sélection pour *Leuconostoc* est facilitée par l'utilisation de la vancomycine dans le milieu de croissance, puisque toutes les espèces de *Leuconostoc* sont intrinsèquement résistant à la vancomycine (**Horowitz et al, 1987;DyasetChauhan, 1988;in: Ogier et al.,2008**).

Les souches de *Leuconostoc* ont généralement mésophiles, avec une température optimale de croissance de 25-30°C;(**Garvie,1967**),et anaérobies facultatifs; Cependant, l'espèce *lcarosum*, isolée de viandes fraîches lors de leur conservation, est une bactérie anaérobie ayant une température optimale de croissance de 2°C .Ils ne produisent pas d'ammoniac à partir d'arginine, et sont hétéro fermentaires stricts, produisant à partir des glucides de l'acide lactique du type (D), du CO₂, de l'éthanol et parfois même de l'acétate. Leur pouvoir protéolytique est nul. (**Hodwitzet al., 1987; DyasetChauhan, 1988**).

I.3.3. Définition des *Leuconostocs*

Ce sont des bactéries lactiques qui prennent la forme de coccobacilles et se trouvent en paire ou en chaînette (**Devoyod etPoullain, 1988**), ils sont hétérofermentaires produisant uniquement de l'acide lactique, et ne produisant pas d'ammoniaque à partir de l'arginine. Leur température optimale de croissance se situe entre25°C et 30°C, et leurs contenus G+C sont assez voisins (37à 45%) (**Garvie, 1986**). Leur croissance est toujours lente. Ils ne sont pas hémolytiques ni pathogènes. Ces espèces sont caractérisées par la production à partir du citrate du lait de diacétyle et parfois par la synthèse des dextrans et de lévanes extracellulaires en présence de saccharose (**Novel, 1993**).

Les *Leuconostokes* peuvent être isolés à partir plusieurs denrées alimentaire tels que le lait et leurs produits, les légumes et essentiellement la betterave, les fruits et d'autres aliments fermentés (**Bekhouché, 2006**). En général les *Leuconostokes* sont utiles dans différents types de fromages ou ils facilitent l'ouverture par la production de CO₂. Ils interviennent aussi dans l'industrie laitière (beurre et crème) principalement les *Ln. mesenteroides ssp.cremoris*, ensilage et les végétaux fermentés (olives, choucroute, etc) (**Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004**).

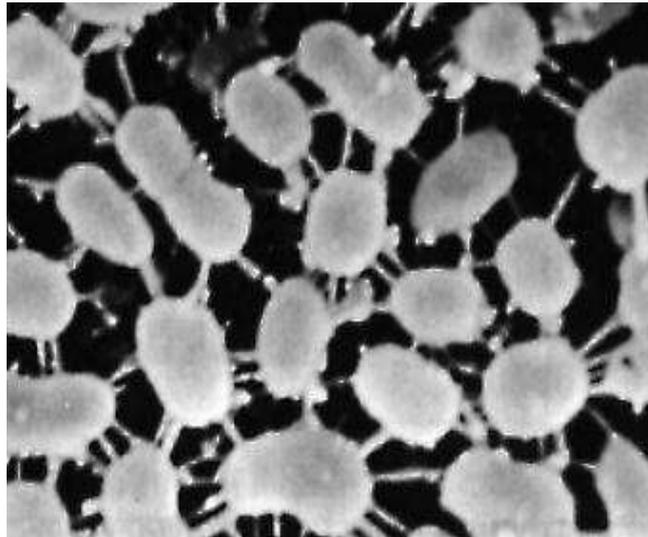


Figure2: Fixation des *Leuconostokes* sur les moules en grès-vernissé.(Examen en microscopie électronique de balayage, 11 500×).Photo Micheline Rousseau -Christiane Le GalloINRA -C.R. Jouy-en-Josas

I.3.4. Habitat des leuconostokes

Les *Leuconostocs* sont naturellement présents sur les végétaux (en particulier la betterave à sucre d'où leur ancien nom de *Betacoccus*). On les retrouve dans le lait en particulier dans des nombreux laits fermentés et de nombreux fromages fabriqués à partir de lait cru de vache, brebis ou chèvre (**Devoyod et Poullain, 1988**). Les espèces couramment trouvées dans le lait et les fromages fabriqués au lait cru sont les espèces *Ln. mesenteroides*, avec les sous-espèces *dextranicum* et *mesenteroides*, puis *L. citreum* (**Cibik et al., 2000**). *Leuconostoc* n'est généralement pas considéré comme faisant partie de flore humaine bien que des souches ont été isolées à partir de déchets humaine, des échantillons vaginaux et des échantillons de lait maternel (**Augeet al., 1987; Vertet al., 1990; Heinkel.a et Saris, 2003 et Belloet al., 2003 in : Hemme et Foucaud -Scheunmann, 2004**).

I.3.5. L'intérêt des Leuconostokes

Les Leuconostokes constituent le troisième groupe important de bactéries lactiques, leur développement est peut abondant, mais ils jouent un rôle essentiel dans plusieurs fermentation industrielle (**Buckenhuskes, 1993; Caplice et Fitzgerald, 1999 et Steinkraus, 2002** in : **Ogier et al., 2008**) tels que les saucisses fermentées, les légumes et les produits fermentés à base de céréales et les produits laitiers (par exemple, le beurre, crème, lait frais et crus, fromages).

Ils sont responsable de fermentation Malo-lactique des vins (*Ln. oenos*), ils interviennent aussi dans les ensilages (*Ln. mesenteroides*), et les végétaux fermentés: olives, choucroute, etc., mais aussi cacao et café (**Guiraud, 2003**). Les *Leuconostocs* sont des hétéro fermentaires, qui produisent à partir du lactose de l'acide lactique, de l'acétate ou l'éthanol et du dioxyde de carbone. Ces bactéries sont considérées comme des ingrédients technologiques essentiels dans la formation des ouvertures dans le fromage bleu à pâte persillée comme le Roquefort par la production de CO₂. Ces ouvertures facilitent le développement, la croissance et l'installation correcte de *Penicillium roquefortis* (**Devoyod et Poullain, 1988**).

Leur rôle dans la formation de l'arôme et la texture est essentiel. En particulier, *Ln. Mesenteroides* et *Ln. Lactis* métabolisent le citrate et produisent des composés aromatiques qui contribuent à la flaveur de fromage tel que diacétyl et acétone (**Vedamuthu, 1994**). Leur métabolisme du citrate et des oses participent à l'aromatisation des produits laitiers fermentés. Leur production d'acide acétique, de diacétyl et de CO₂, en inhibant les bactéries psychotropes, permettrait d'augmenter la durée de vie de fromages (**Vedamuthu, 1994**). Quelques autres espèces *Leuconostoc* peuvent induire une altération par production de composés indésirables (amines biogènes) dans les aliments, ou dextrane dans les processus de fermentation du sucre (**Hemme et Foucaud-Scheunmann, 2004**).

I.4. Les substances antimicrobiennes

I.4.1. Définition des substances antimicrobiennes

Désigne une substance naturelle, semi-synthétique ou synthétique qui aux concentrations observées in vivo, possède une activité antimicrobienne (c'est-à-dire qu'elle tue ou inhibe la croissance des micro-organismes). Soit bactéricides tue les micro-organismes ou bien bactériostatiques inhibe les micro-organismes.

Les bactéries lactiques ont la capacité de produire des substances antimicrobiennes telles que les acides organiques, les acides gras, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyle et les bactériocines (**Dortu et Thonart, 2009**).

I.4.1.a. Les acides organiques

L'effet antimicrobien primaire exercé par les bactéries lactiques est la production d'acide lactique et l'abaissement consécutif du pH qui limiter la croissance de certaines bactéries entre autres les bactéries indésirables. Les acides organiques sont produits soit par la voie homofermentaire (l'acide lactique), soit par la voie hétéro fermentaire (l'acide lactique, acétique et formique, acide succinique, et d'éthanol et dioxyde de carbone (**kostinek et al.,2005**).

Ainsi, les acides organiques ont différentes actions telles qu'un excellent pouvoir bactéricide ou un effet bactériostatique contre les micro-organismes pathogènes se trouvant dans le tube digestif (**Jedidi, 2007**).

I.4.1.b. Les 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**)et des saucisses sèches(**Sanz et al., 1988**).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**).

I.4.1.c. Le Peroxyde d'Hydrogène

Les bactéries lactiques sont dépourvues de catalases catalysant la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et en oxygène (**Condon, 1987**). Le peroxyde d'oxygène peut s'accumuler et être inhibiteur de différents microorganismes par l'oxydation des lipides membranaires et la destruction des structures des protéines cellulaires (**Zalan et al., 2005**).

I.4.1.d. Le Dioxyde de carbone

Le dioxyde de carbone est produit principalement par les BL hétérofermentaires. Le mécanisme précis de ces propriétés antimicrobiennes est encore inconnu. Cependant, le

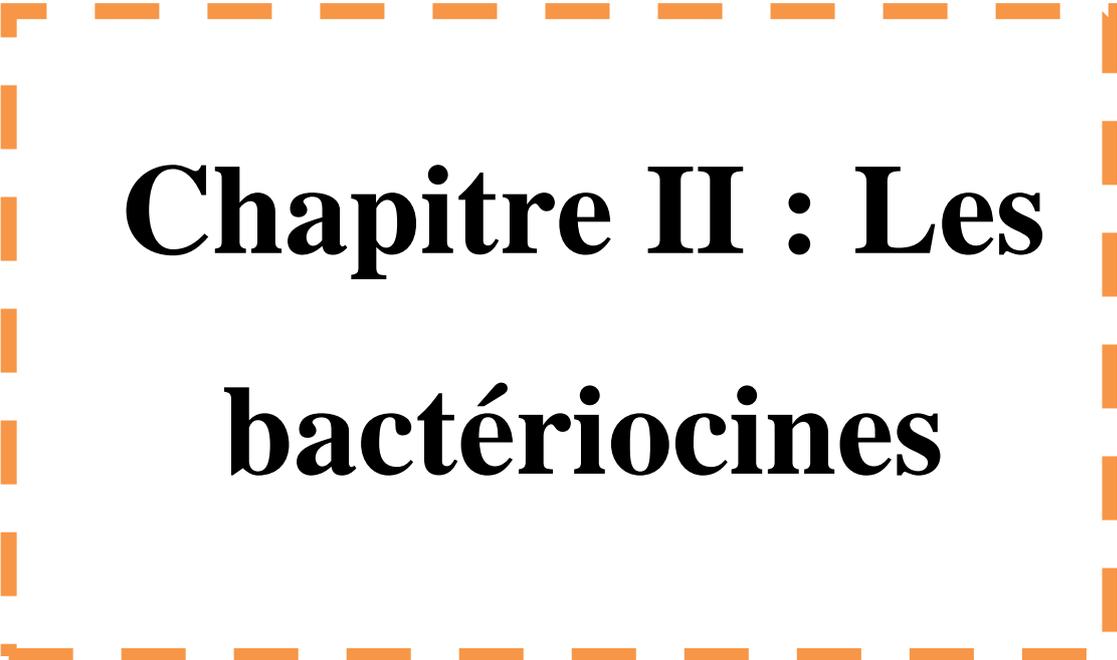
CO₂ peut jouer un rôle en créant un environnement anaérobie qui inhibe la décarboxylation enzymatique, et l'accumulation de CO₂ dans la bicouche lipidique de la membrane peuvent provoquer un dysfonctionnement de la perméabilité (**Bellil, 2013**).

I.4.1.e. Le Diacétyle

Le diacétyle (C₄H₆O₂) est un produit du métabolisme de citrate qui est responsable de l'arôme "beurre" de produits laitiers. Le diacétyle inhibe la croissance bactérienne en interférant probablement avec les mécanismes gouvernant l'utilisation de l'arginine. Il est rarement présent dans l'aliment en quantité suffisante pour y exercer une activité antimicrobienne importante (**Hansal, 2015**).

I.4.1.f. Les Bactériocines

Certains ferments sont capables de produire des bactériocines, ces molécules sont particulièrement intéressantes pour l'élaboration de produits à partir de lait cru donc susceptibles de contenir des micro-organismes indésirables voire pathogènes (**Cintas et al., 2001**). Les bactériocines sont des peptides ou protéines antimicrobiennes synthétisées par voie ribosomique, naturellement produites par des bactéries à Gram négatif et le plus souvent par des bactéries à Gram positif telle que les bactéries lactiques (BL). Elles ont une activité inhibitrice ou bactéricide contre des bactéries phylogénétiquement proches de la souche productrice mais surtout contre des pathogènes. On prend l'exemple des bactériocines produites par les bactéries lactiques qui forment un groupe hétérogène de peptides antimicrobiens, se distinguent par leur poids moléculaire, propriétés chimique, structure et leur mode d'action (**Daw et Falkiner 1996 ; Dortu et Thonart 2009**). Les bactériocines sont l'un des nombreux mécanismes de défense naturels que les bactéries utilisent pour concurrencer les micro-organismes dans le même environnement (**Chikindas et al. 2018**).



Chapitre II : Les bactériocines

Chapitre II Les bactériocines

II. Les bactériocines

II.1. Définition des bactériocines

Les bactériocines représentent une large gamme de peptides qui varient considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leur spectre d'activité et de leur mode d'action (**Klaenhammer, 1988**). Les bactériocines des bactéries lactiques ressemblent à certains peptides antimicrobiens des eucaryotes (**Riley, 2009**). D'une manière générale, les bactériocines sont thermostables, solubles et actives à des valeurs de pH acides (**Laboui et al., 2005**), non toxiques et sensibles aux enzymes protéolytiques du tractus gastro-intestinal (**Wijaya et al., 2006; Castellano et al., 2008**).

En outre, de point de vue physico-chimique, les bactériocines sont généralement cationiques, amphiphiles, non structurées en solution aqueuse (**Reis et al., 2012**). Leur poids moléculaire est relativement petit (2-6 kDa) ce qui leur permet d'accéder aux cellules cibles et de perméabiliser la membrane en se liant à des récepteurs de surface (**Gillor et al., 2008; Anthony et al., 2009; Simova et al., 2009; Hartmann et al., 2011; Todorov et al., 2011**). La différence majeure entre les antibiotiques et les bactériocines est que ces dernières sont synthétisées par voie ribosomique (2) et produites au cours de la phase primaire de la croissance, cependant, les antibiotiques sont des métabolites secondaires (**Zacharof, Lovittb, 2012**).

II.2. Classification des bactériocines

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont réparties en quatre classes, comme proposé par (**Klaenhammer, 1993**). Selon leur structure primaire, poids moléculaire, stabilité à la chaleur. Ces quatre classes sont:

II.2.1. Classe 1: Lantibiotiques

Les Lantibiotiques sont des peptides de taille inférieure à 5 kDa, stables à la chaleur et qui contiennent des acides aminés inhabituels soufrés formés post-traditionnellement, comme la lanthionine, la 3-méthyl lanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine. Les antibiotiques peuvent être divisés en deux types: -la classe Ia qui comprend des peptides cationiques hydrophobes allongés contenant jusqu'à 34 acides aminés -la classe Ib qui comprend les peptides globulaires chargés négativement ou sans charge nette et contenant jusqu'à 19 acides aminés (**Twomey et al., 2002**).

Chapitre II Les bactériocines

II.2.2. Classe II: Bactériocines peptidiques

Ce sont des peptides de taille inférieure à 10 kDa, stables à la chaleur, ne contenant pas d'acides aminés modifiés. Leur point isolé le citrique varie entre 8 et 10. Cette dernière est subdivisée en trois sous-classes.

II.2.2.a. La sous-classe IIa

Ces bactériocines contiennent entre 27 et 48 acides aminés et ont toutes une partie N-terminale hydrophobe contenant la séquence consensus YGNGV ainsi qu'un pont disulfure et une partie C-terminale moins conservée, hydrophobe ou amphiphile qui détermine la spécificité d'action (Richard *et al.*, 2006). Elles ont toutes une activité contre *Listeria monocytogenes*.

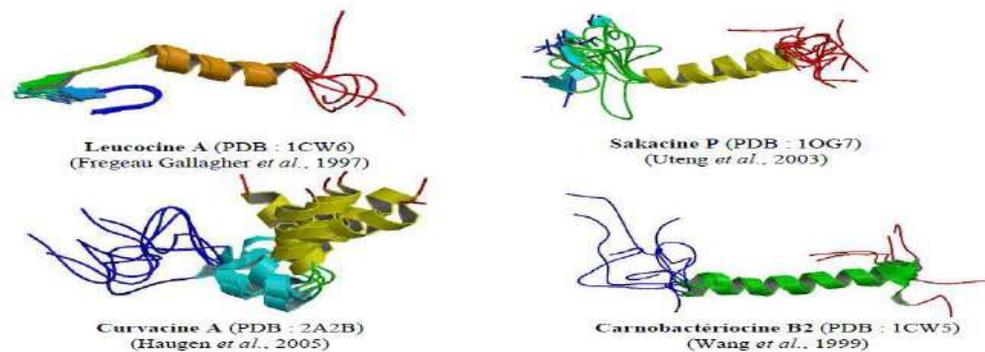


Figure 3 : Structures tridimensionnelles de quelques bactériocines de classe IIa.

II.2.2.b.a. sous-classe IIb

Elle comprend les bactériocines ayant besoin de deux peptides pour avoir une activité. Deux types de bactériocines de classe IIb peuvent être distingués:

- le type E (Enhancing) où la fonction d'un des deux peptides est d'augmenter l'activité de l'autre
- le type S (Synergy) où les deux peptides sont complémentaires (Carne et Thonart, 2009)

II.2.3. Classe III: Bactériocines protéiques

Ce sont des 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 (Nigutova *et al.*, 2007).

Chapitre II Les bactériocines

Tableau 01 : Bactériocines de classe III produites par des bactéries lactiques. (Nilsen *et al.*, 2003 ; Papagianni, 2003 ; Nigutova *et al.*, 2007).

| Bactériocine | Bactérie productrice |
|---------------|------------------------------------|
| Helveticin J | <i>Lactobacillus helveticus</i> A |
| Enterolysin A | <i>Enterococcus faecium</i> |
| Zoocin A | <i>Spreptococcus zooepidemicus</i> |
| Millericin B | <i>Streptococcus milleri</i> |

II.2.4. Classe IV: Bactériocines complexes

Ce sont des peptides requérant une partie carbo-hydratée ou lipidique pour avoir une activité. (Carme et Thonart, 2009).

Tableau02: les importantes bactériocines produites par les bactéries lactique (Serlene et al.2021).

| Bacteriocin | Producer | Reference |
|---|---|---|
| Nisin A | <i>Lactococcus lactis</i> | (De Vuyst and Leroy, 2007) ^[13] |
| Lactococcin DR | <i>Lactococcus lactis</i> ADRIA 85L030 | (Dufour <i>et al.</i> , 1991) ^[15] |
| Estreptococcin A-FF22 | <i>Streptococcus pyogenes</i> FF22 | (Hynes, <i>et al.</i> , 1993) ^[26] |
| Lactocin S | <i>Lactobacillus sakei</i> L45 | (Nissen-Meyer <i>et al.</i> , 1992) ^[42] |
| Pediocin PA1 | <i>Pediococcus acidilactici</i> PAC-1.0 | (Henderson <i>et al.</i> , n.d.) ^[23] |
| Leucocin A-UAL187 | <i>Leuconostoc gelidum</i> UAL187 | (Hastings <i>et al.</i> , 1991) ^[21] |
| Mesentericin Y105 | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> Y105 | (Hechard <i>et al.</i> , 1992) ^[22] |
| Acidocin A | <i>Lactobacillus acidophilus</i> TK9201 | (Kanatani <i>et al.</i> , 1995) ^[30] |
| Bavaricin A | <i>Lactobacillus bavaricus</i> MI401 | (Larsen <i>et al.</i> , 1993) ^[33] |
| Curvacin A | <i>Lactobacillus curvatus</i> LTH1174 | (Tichaczek <i>et al.</i> , n.d.) ^[54] |
| Plantaricin S (Pls α and Pls β) | <i>Lactobacillus plantarum</i> LCPO10 | (Jimé Nez-di <i>et al.</i> , 1995) ^[27] |
| Termophilin 13 (ThmA/ThmB) | <i>Streptococcus thermophilus</i> SPi13 | (Marciset <i>et al.</i> , 1997) ^[35] |
| Piscicolin 61 | <i>Carnobacterium piscicola</i> LV61 | (Holck <i>et al.</i> , 1994) ^[25] |

II.3. Production 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. Il a même été suggéré que des conditions de croissance défavorables permettent de stimuler leur production. 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

Chapitre II Les bactériocines

purification des bactériocines est une procédure longue et couteuse 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.

II.4. Mode d'action des bactériocines

Toutes les bactériocines de bactéries lactiques, dont le mode d'action a été étudié, paraissent agir de façon similaire en formant des pores dans la membrane plasmique des cellules cibles. La formation des pores dans la membrane cytoplasmique va causer l'efflux rapide de petits composés cytoplasmiques tels que les ions, les acides aminés, l'ATP... (**Montville et al., 1995; Dortu et Thonart, 2009**) qui aura pour conséquence de perturber le potentiel transmembranaire et le gradient de pH, à la cessation rapide des activités cellulaires et à la mort de la cellule. Certaines bactériocines, comme la nisine (l'antibiotique), n'ont pas de récepteur spécifique. En effet, la nisine semble se lier aux lipides et phospholipides cationiques présents à la surface de la cellule (**Rink et al., 2005; Moll et al., 1999**).

Par contre, il semblerait que pour les lactococcines A, B et M. l'initiation de la formation de pores nécessite la présence d'un récepteur spécifique qui permet la fixation de la bactériocine à la membrane cellulaire (**van Belkum et al., 1991**). De plus, certaines bactériocines, telles que, la bactériocine J46 dont l'activité dépend de la présence d'une force proton motrice sur la membrane pour pouvoir s'y lier. Certaines bactériocines ne sont pas actives à pH 7 et donc une activité due à la production d'une bactériocine pourrait être considérée comme étant due à la production d'acide (**Klaenhammer, 1993**).

Gravesen et al.,(2002) ont examiné la résistance de *Listeria monocytogenes* à la classe II des bactériocines et ont trouvés un rapport avec le site spécifique de reconnaissance. Huit mutants de *L. monocytogenes* résistants aux bactériocines de la classe IIa, tel que la pediocine PA-1 et la leucocine A, ont été isolés et étudiés. La lacticine 3147 est un l'antibiotique constitué de 2 composants, 2 peptides appelés lac 1 et lac 2 (**McAuliffe et al., 1998**); les deux composants sont nécessaire pour exercer une activité antagoniste complète résultant de la formation de pores ioniques spécifiques dans la membrane de la cellules gram positive cible.(**McAuliffe et al., 2000**) ont démontrés que la lacticine 3147 exige une enzyme de modification séparée pour chacun des perceptives lac1 et lac2.

Chapitre II Les bactériocines

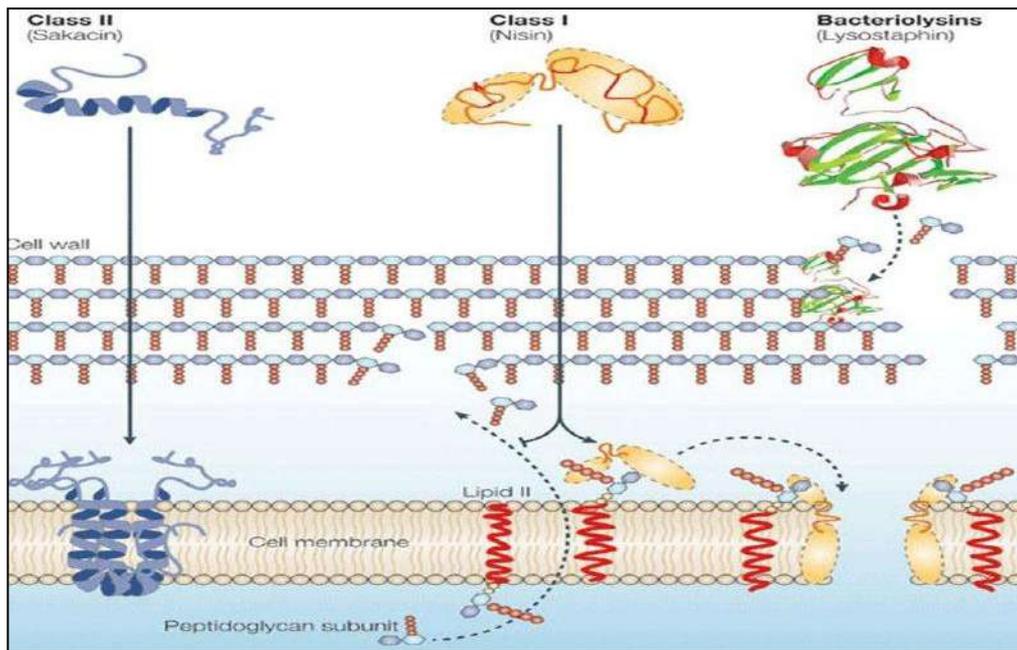


Figure 4 : Mode d'action des bactériocines de bactéries lactiques (Cotter et al., 2005).

II.5. Application des Bactériocines

II.5.a. Dans l'industrie alimentaire

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).

Du fait qu'elles sont des substances naturelles, l'emploi des bactériocines permettait d'avoir des produits plus sains et réduirait l'utilisation des agents chimiques de conservation (Galvarez et al., 2007). Ces dernières années, l'application des bactériocines dans la technologie a gagné une grande attention. En effet, plusieurs bactériocines montrent des effets synergiques ou additionnels lorsqu'elles sont utilisées en combinaison avec d'autres agents antimicrobiens, incluant des conservateurs chimiques, des composés phénoliques naturels (Grande et al., 2007).

II.5.b. Domaines de la médecine humaine

L'utilisation des bactériocines n'est pas restreinte au domaine alimentaire, plusieurs études ont démontré que l'utilisation répandue des antibiotiques pour traiter et prévenir les infections, engendrait de sérieux problèmes de toxicité et de résistance. Les bactériocines ont été énormément appréciées comme étant des agents de thérapie naturelle, alternative aux antibiotiques, puisque l'effet inhibiteur des bactériocines pourrait réduire les effets nocifs

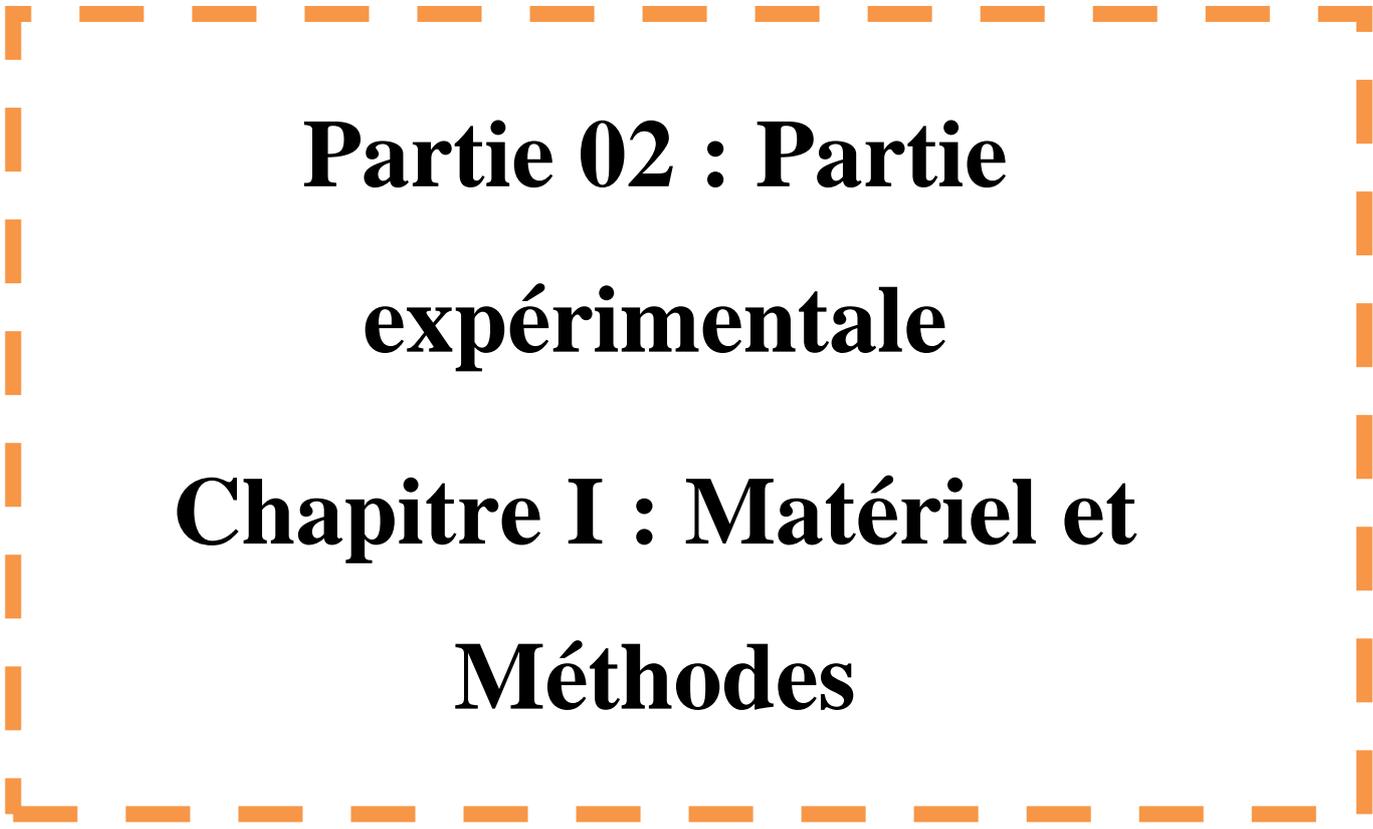
Chapitre II Les bactériocines

engendrés par l'antibiothérapie. Un antibiotique est utilisé dans la thérapie pour remplacer l'usage habituel de l'érythromycine et de la vitamine A. Cette application montre plusieurs avantages tels que l'absence de résistance aux antibiotiques. (Smaoui, 2010) Trois bactériocines produites par *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus casei* et *Lactobacillus amylovorus* montrent une activité inhibitrice contre l'agent pathogène gastrique humain *Helicobacter pylori* qui cause des ulcères gastriques. (Monts et DeVuyst, 2001)

II.6.limites d'utilisation des Bactériocines

L'utilisation des bactériocines peuvent présenter des effets additifs ou synergiques lors de leur utilisation en combinaison avec d'autres agents antimicrobiens, y compris des produits chimiques, des emballages, des traitements thermiques ou non thermiques (Gounadaki et al., 2008). L'application des bactériocines constitue certes une méthode « naturelle » de conservation des aliments, cependant, leur mise en œuvre est pratiquement très difficile.

En effet, les propriétés des bactériocines ont favorisé leur utilisation dans le domaine agroalimentaire et médical. Le coût élevé de préparations de bactériocines pures prêtes à l'emploi entraîne de loin la limite la plus importante.



**Partie 02 : Partie
expérimentale**

**Chapitre I : Matériel et
Méthodes**

I. Matériel et Méthodes

Ce travail a été réalisé au niveau de laboratoire de recherche CRAPC , situé au niveau du nouveau pôle universitaire, université de Kasdi Merbah -Ouargla Dans lesquels différentes analyses ont été réalisées à fin d'étudier le pouvoir antimicrobien des souches *Leuconostoc* et leur caractères biotechnologiques isolés à partir de lait de chèvre cru, cette étude a été effectuée durant la période du 15 Janvier 2021 jusqu'à 30 Mai 2021

I.1. Provenance des échantillons

Notre étude est basée sur l'isolement des bactéries de genre *Leuconostoc* à partir de trois échantillons de lait chèvre, ces échantillons proviennent de la région d'Ouargla (**Hassi ben Abdallah**) depuis la date 15/01/2021.

I.2. Prélèvement du lait

Le lait cru doit être traité avec un grand soin afin d'éviter tout risque de contamination qui peut influencer sur la flore lactique et ceci par la réalisation du prélèvement en enfilant des gants et lavant les trayons avec une serviette propre, tirer quelques jets de lait pour réduire le nombre de bactéries dans le canal du trayon (**Lévesque , 2004**), ensuite désinfecter tout le trayon avec l'eau savonneuse, rincé avec l'eau de javel puis séché avec un coton hydrophile stérile (**Benazzouz, 2012**).

Prélever du lait dans des flacons en verre de 250 ml stérile puis mettez les flacons dans la glace au fond d'une glacière pour conserver le lait au cours de transport au laboratoire dans une température 4C° (**Lévesque, 2004**).

I.3. Préparation des dilutions

Après homogénéisation d'échantillon du lait (agitation pendant 10 secondes). Prélever aseptiquement 1ml de lait à l'aide d'un pipette gradué ou micropipette stérile et introduit dans un tube contenant 9ml de l'eau physiologique peptonée, agiter puis transférer 1ml de cette première dilution dans le deuxième tube. De même façon on effectuer des dilutions décimales jusqu'à 10^{-4} (**Benazzouz, 2012**).

I.4. Isolement et purification

I.4.1. Isolement

Pour l'isolement des souches *Leuconostoc* nous avons utilisés un milieu sélectif, MRS avec l'addition d'un antibiotique la vancomycine (30µg/ml), pour inhiber et ralentir la croissance des autres genres des bactéries Gram positif (la plupart des bactéries lactique sont sensible à cette dose (**Badiset al., 2005**), on fait un ensemencement en masse à partir des dilutions (1mlde chaque dilution), en fin toutes les boites sont incubées à 30C° jusqu'à la croissance. Les techniques d'isolement sont basées sur l'obtention d'un clone, c'est-à-dire une culture issue d'une seule cellule (**Benazzouz, 2012**).

I.4.2.Purification des isolats

Elle consiste à effectuer des repiquages successifs sur milieu MRS liquide et MRS solide utilisés alternativement jusqu'à l'obtention des colonies bien distinctes et homogènes (**Zarour et al., 2013**), la purification des souches sur milieu gélosé se fait par la méthode des stries.

I.5. Pré-identification des isolats

I.5.1.Tests morphologiques

I.5.1.1.L'aspect macroscopique

Cette étude est basée sur l'observation visuelle de la culture des isolats sur milieu MRS solide et liquide ; pour caractériser la taille, la forme et la couleur des colonies sur milieu solide et le trouble dans le milieu liquide (**Badis et al., 2005**).

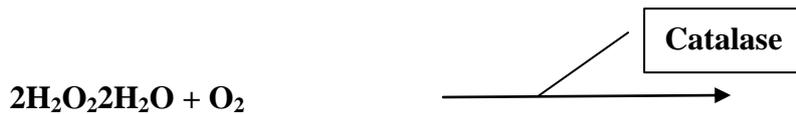
I.5.1.2.L'aspect microscopique

I.5.1.2.a. Coloration de Gram

C'est une étape très importante dans l'identification de genre (**Badis et al.,2004**), elle consiste à distinguer entre deux types différents des bactéries par rapport leurs constituants de la paroi bactérienne, plus précisément, par rapport à l'épaisseur du peptidoglycane, parmi ceci il y a des bactéries Gram positif et d'autre bactéries Gram négatif.

I.5.1.2.b.Test de catalase

L'activité catalytique se traduit par l'intervention d'une enzyme respiratoire appelé catalase qui permet de dégrader le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau (H₂O) et oxygène (O₂).



La recherche de la catalase se fait par la mise en contacte d'une colonie bien isolée avec une goutte d'eau oxygénée: un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulles traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de la catalase (**Guiraud, 1998**). Seules les bactéries à catalase négatif sont retenues.

I.5.3. Conservation des isolats

La conservation d'une souche pure a comme but de maintenir ces souches pures à conserver viable, dans cette étude, deux types de conservation ont été réalisés:

I.5.3.1. Conservation court terme (courte durée)

Dont laquelle un ensemencement a été effectué sur gélose MRS incliné et incubé à 30°C, après l'apparition des colonies les cultures ont été maintenues sous une température de 4°C.

I.5.3.2. Conservation longue terme (longue durée)

Elle a été faite à partir des cultures sur milieu liquide et après une centrifugation à 8000 tours pendant 10 min les cellules ont été récupérées, un rinçage par l'eau distillée stérile a été fait avec une autre centrifugation. Le surnageant a été éliminé et un milieu de culture de conservation (3 ml de glycérol avec 6 ml de bouillon MRS) a été ajouté sur le culot, cette conservation a été effectuée en tubes eppendorf à une température de -20°C (**BADIS et al., 2005**).

I.5.4. Tests physiologiques

Les souches isolées ont été testées à différentes conditions hostiles pour vérifier leur résistance à ces conditions qui sont les suivants:

I.5.4.1. Croissance à différentes température

La croissance bactérienne est évaluée par un trouble en milieu MRS après 5 jours d'incubation à 4 °C, 10 °C, 37 °C et 44°C (**Guessas et Kihal, 2004**).

Alors que la thermorésistance des bactéries a été testée au bain marie à 63°C/30 minutes puis on a incubé à 30°C/24h à 48h (**Guiraud, 1998**).

Ces tests vont nous aider à distinguer les souches mésophiles des thermophiles ainsi que thermorésistantes.

I.5.4.2. Croissance à différent pH

Après avoir une culture jeune des isolats (culture de 24h à 30°C), ces derniers ont été ensemencées dans un milieu MRS liquide à : pH 4.6, pH 6.3, pH 9.6 et incubé à 30°C pendant 2 à 3 jours.

I.5.4.3. Résistance à la salinité

La croissance des isolats purs en présence de différentes concentrations de Na Cl, à savoir (3% Na Cl, 6% Na Cl, 9% Na Cl) ont été ensemencé puis incubé à 30°C pendant 2 à 3 jours, la croissance est appréciée par l'apparition d'un trouble (**Ghozlane, 2012**).

I.5.5. Tests biochimiques

I.5.5.1. Recherche de type fermentaire

Ce test permet de connaître le type du métabolisme (homofermentaire ou hétérofermentaire) par lequel le substrat carboné est transformé, et la production du gaz à partir de la dégradation du glucose (**Hansal, 2015**). Les souches isolées sont ensemencées dans un bouillon MRS contenant les cloches des Durhams, puis incubés à 30°C pendant 24h. L'absence de gaz dans les cloches montre qu'il s'agit d'un métabolisme homofermentaire alors que la présence de gaz indique qu'il s'agit d'un métabolisme hétérofermentaire (**Boumediene, 2013**). Le type fermentaire de *Leuconostoc* est hétérofermentaire (le métabolisme de glucose produit des quantités équimolaires d'acide lactique, d'éthanol et de CO₂ (**Hansal, 2015**)).

I.5.5.2. Utilisations des sucres

La vérification de la capacité de dégradation des sucres de ces souches isolées a été effectuée sur bouillon MRS.BCP dépourvu d'extrait de viande et sans sucre (**Badis et al., 2005**).

Les sucres utilisés dans ce test sont les suivants: Mannose, Xylose, Arabinose, Ribose, Lactose, Maltose, Fructose, Saccharose, Galactose, Glucose. Des solutions sucrées ont été

préparer de 01g de chaque sucre avec 10 ml de l'eau distillé stérile, le tout a été homogénéisé puis stérilisé à 100°C pendant 15 min au bain marie.

Trois cultures jeunes de chaque souche ont été préparées, puis une centrifugation de chaque culture dans un tube d'Eppendorf a été effectuée à 4000 tours pendant 10 min.

Le culot a été récupéré et additionnée à l'eau distillée stérile puis une autre centrifugation a été réalisée pour éliminer les restes de milieu de culture et obtenir un culot cellulaire pur; ce rinçage est réalisé deux fois consécutives, et après, 01 ml de bouillon MRS.BCP a été ajouté sur le culot récupéré de dernière centrifugation et bien homogénéisé **(Hansal, 2015)**.

L'ensemencement a été réalisé dans des microplaquettes contenant des puits, chaque ligne verticale comporte un sucre qui sera utilisé par différentes souches, chaque puits contient 200 µl de MRS.BCP avec 100µl de solution sucré et 100µl de suspension bactérienne, le tout a été recouvrir par une couche d'huile de paraffine.

Les microplaquettes ont été incubées à 30°C pendant 72h et vérifié chaque 24h **(Guessas, 2006)**.

I.5.5.3.Hydrolyse de l'arginine

L'arginine déshydrogénase (ADH) est une enzyme capable de dégrader l'arginine en ammoniac, et des acides amines (composés basiques) **(Hansal, 2015)** mis en évidence par l'ensemencement des souches sur milieu M17 BCP après incubation à 30C°/ 24h en anaérobiose. Le virage de milieu de vert au jaune (car on a utilisé l'indicateur coloré le bleu de bromothymol) indique qu'il n'ya pas d'hydrolyse de l'arginine. Par contre les colonies de couleur blanches hydrolysent l'arginine **(Boumediene, 2013)**

I.5.6.Tests biotechnologiques

I.5.6.1.Production de dextrane

Le dextrane est un exopolysaccharide produit par quelques espèces du genre *Leuconostoc* ainsi que d'autre genres bactériens. La production du dextrane à partir du saccharose est mise en évidence sur milieu solide MSE **(Mayeux et al., 1962)**. Les souches productrices de dextrane sont caractérisées par la formation de colonies larges, visqueuses, gluantes. Ce test est aussi considéré comme clé d'identification permettant d'identifier les

souches du *Leuconostoc* productrices et non de EPS. On a réalisé des ensemencements sur milieu MSE par des précultures de 18h et incubé à 30°C pendant 24h à 48h (Sanchez et al, 2006).

I.5.6.2. Production des substances aromatiques

La production des substances aromatiques est une propriété spécifique aux bactéries lactiques dont laquelle le lactose, le citrate, les acides aminés ou les matières grasses sont utilisés comme substrat. Cette capacité de produire l'arôme est très importante lors de la fermentation des laits ou l'élaboration des fromages frais, crèmes et beurre (Dhouib, 2017).

L'étude de ce caractère a été réalisée sur gélose KMK (Kempner et McKay, 1980) dont la seule source de carbone est le citrate qui va alcaliniser le milieu après leur utilisation par les bactéries. L'ensemencement est effectué par stries sur la surface à partir d'un milieu solide et incubé à 30°C durant 24h (Guiraud, 1998).

I.5.6.3. Production des substances antimicrobiennes

I.5.6.3.a. Interaction microbienne

Dans cette partie on réalise des interactions entre les souches isolées du lait cru de chèvre et 04 souches pathogènes de références. Les microorganismes utilisés dans notre étude sont mentionnés dans le tableau suivant :

Tableau03 : Souches utilisées dans le test antimicrobien

| Bactéries | Gram | Référence |
|-------------------------------|---------|------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Positif | ATCC25923 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Négatif | ATCC9027 |
| <i>Escherichia coli</i> | Négatif | ATCC25992 |
| <i>Listeria monocytogene</i> | Positif | ATCC 14028 |

I.5.6.3.b. Préparation des précultures des bactéries pathogènes

Dans un premier temps ces bactéries sont cultivées à 37°C^{±1} sur 10 ml de Bouillon nutritif pendant 18 à 24h. La culture d'une nuit obtenue servirait d'inoculum.

I.5.6.b.1.Méthode directe (Spot agar test)

L'activité antimicrobienne de nos souches a été évaluée sur milieu solide selon la méthode (Fleming *et al.*, 1975). Le milieu MRS est ensemencé en touche par nos isolats (souches inhibitrices). Après 24 heures d'incubation une couche du milieu Mueller-Hinton est ensemencée par la souche indicatrice (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*) est coulée à la surface puis réincubée pour 24 à 48 heures supplémentaire. Les souches présentant une zone claire tout autour sont considérées comme productrices de substances antimicrobiennes.

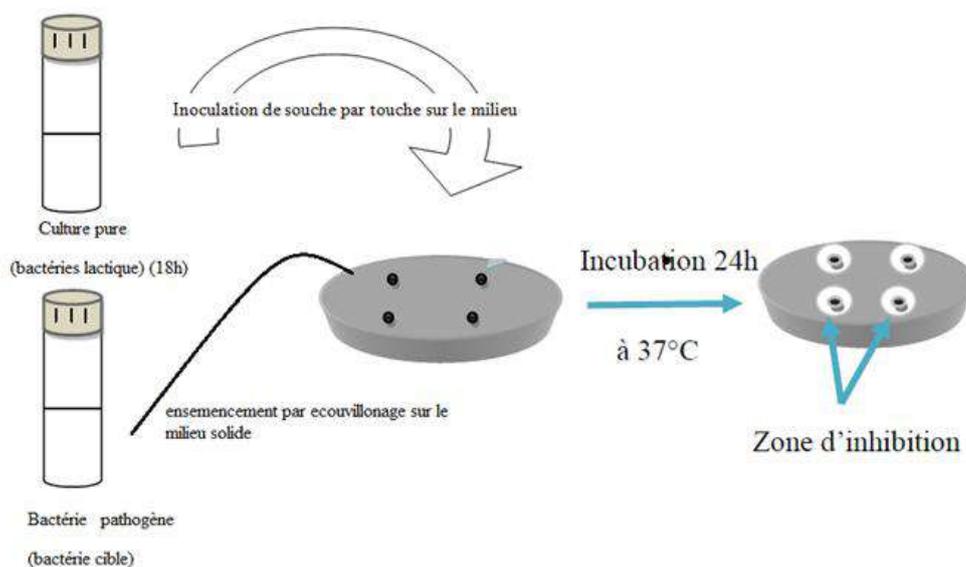


Figure5 : Méthode des spots (Fleming *et al.*, 1975)

I.5.6.b.2.Méthode indirecte (well diffusion assays)

Décrite par (Barefoot *et al.*, 1983), cette méthode permet de mettre en contact le surnageant de la souche lactique productrice de substance antimicrobienne avec la souche test.

Les souches précédemment sélectionnées pour leur production de substance antimicrobienne sont concernées par ce test.

Les souches sont cultivées dans du milieu MRS liquide et incubées pendant 18 heures. Après incubation, le milieu est centrifugé (4000tr/10min) et le surnageant est conservé. Dans une boîte de pétri contenant du MH solide et ensemencé par la souche indicatrice, des puits

sont réalisées avec un emporte-pièce et celés par 10µl de gélose MRS. Les recevront 100µl du surnageant de la souche à tester et les boîtes sont incubée pendant 24 à 48 heures. Les colonies entourées d'une zone claire dans la nappe de culture de la souche test et ayant un diamètre supérieur à 2mm sont considérées comme positive.

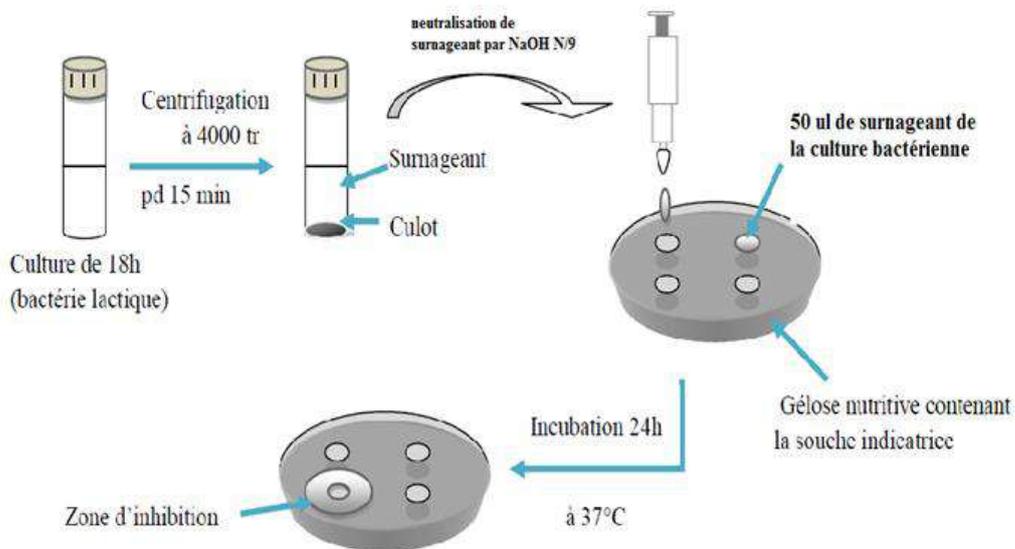


Figure 6: méthode des puits (Barefoot et Klaenhammer, 1983)

I.5.6.4. Mode d'action de la bactériocine

Dans le but d'explorer l'effet des bactériocines partiellement purifiées sur la croissance des germes témoins de l'activité antagoniste *Staphylococcus aureus*, deux cultures de la souche témoin de l'activité antagoniste sont inoculées sur bouillon nutritif, incubées à une température de 30°C avec agitation.

Un volume de 4 ml du surnageant des souches de bactéries lactiques sélectionnées antagonistes de dilutions décimales (10^{-1} - 10^{-6}) est ajouté aux cultures des germes témoins de l'activité antagoniste *Staphylococcus aureus*, inoculée dans un milieu de culture. Des prélèvements à des intervalles de temps réguliers sont effectués pour l'évaluation de la croissance bactérienne.



Chapitre II : Résultats et discussions

II. Résultats et discussions

II. 1. Isolement et purification

II. 1. 1. Isolement

L'isolement a été effectué sur gélose MRS additionné au 30 µg/ml de vancomycine, ceci nous a permis d'observer uniquement des colonies des *Leuconostocs* à cause de la sélectivité du milieu. L'étude de l'aspect macroscopique montre que toutes les souches cultivées donnent des colonies de petite taille, blanchâtre, ronde ou lenticulaire.

II. 1. 2. Caractérisation macroscopique

- **Sur milieu liquide**

Après 24h d'incubation, la croissance en milieu MRS liquide se traduit par l'apparition du trouble au fond du tube avec une zone transparente.



Figure7: Aspect des souches pures des *Leuconostoc* sur bouillon MRS.

- **Sur milieu solide**

L'observation directe des colonies sur milieu MRS solide après 24h d'incubation permet de déterminer les caractéristiques macroscopiques souches de *Leuconostoc* en montrant que toutes les colonies purifiées ont une petite taille, rondes, aussi elles ont la même couleur qui est blanchâtre.



Figure 8 : Aspect macroscopique des souches pures des *Leuconostoc* sur gélose MRS.

II.2. Caractérisation microscopique

II. 2 .1.Coloration de Gram

L'observation microscopique après une coloration de Gram a révélé que la plupart des cellules se présentent sous forme de petites coques, coccobacille et ovoïde .Elles sont positives à la coloration de Gram, et les tailles des cellules étaient différentes avec des structures en paire ou en chaînette.

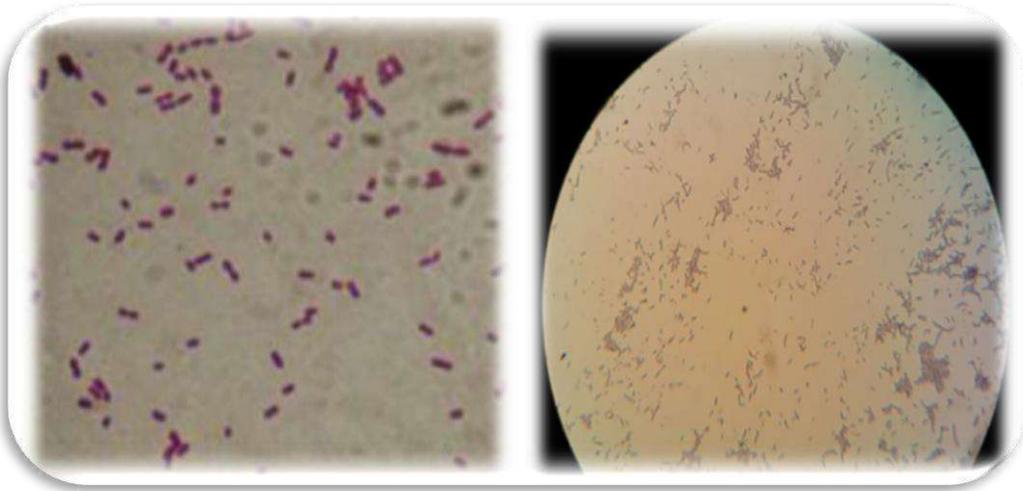


Figure9: Observations microscopiques des souches isolées après une coloration de Gram à grossissement x100.

II. 2 .2.Test de catalase

En vue de l'isolement de la flore lactique, on a effectué le test de la catalase. Seules les souches à catalase négative ont été retenues.

Et ceci est la cause de l'incapacité des bactéries lactiques de synthétiser les porphyrines (et donc des cytochromes et de la catalase) de ce fait elles ne dégradent pas le peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène qui se manifeste par la formation de bulles (**Whittenbury, 1978**).

Whittenbury (1978) a considéré que les bactéries lactiques comme des germes anaérobies facultatifs préfère qu'elles soient dans des conditions anaérobies et qu'apparemment, elles ne sont pas capables de former de l'ATP par la chaîne de transport des électrons (ou phosphorylation oxydative).

Si l'oxygène peut parfois leur être substrat affirma (**Davis, 1963**) , il conduit comme produit final au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui est toujours un produit toxique du fait que

dans la plupart des cas, ces bactéries ne peuvent pas normalement le décomposer, ne possédant pas de catalase fonctionnelle.

En plus de ces tests, nous avons effectué des tests biochimiques et physiologiques pour bien nous aider à déterminer le genre et l'espèce de nos 10 souches isolées.

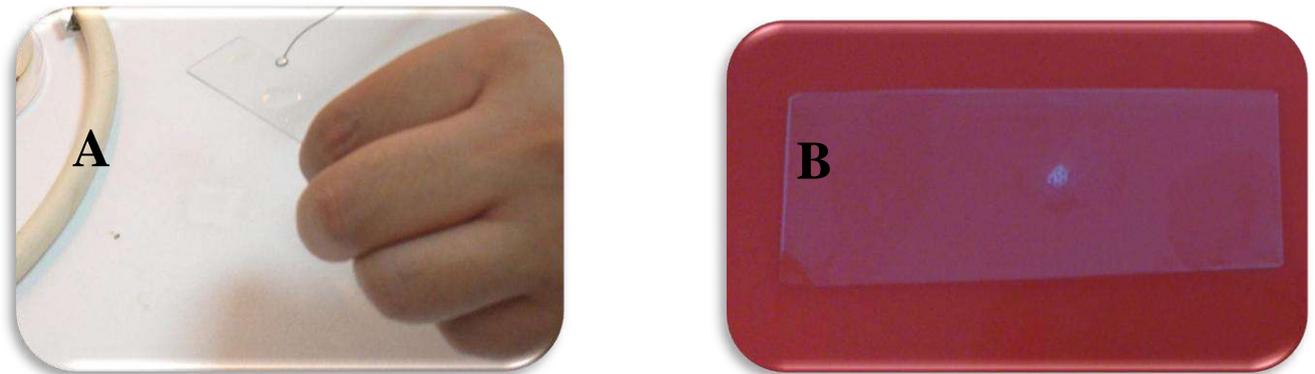


Figure 10: Test de catalase (A : test négative ; B : test positive)

II. 3 .Tests physiologiques

II. 3.1.Croissance à différentes températures

Les souches isolées ont été testées à différentes températures : 4 °C, 10 °C, 37 °C, 42°C, selon les résultats obtenu la plupart des isolats peuvent pousser entre 10 °C et 37°C ceci montre que ces bactéries sont des mésophile, et on a remarqué l'absence de croissance à 4 °C ni à 42°C sauf quelques souches qui sont positif (LB1, LB2, LB10, LB16, LB21) dans le tableau (04). la thermorésistante a était aussi testé à 63C° pendant 30 min dont la croissance de nos souches a resté négatives .Toute les souches ne sont pas thermorésistantes, où nous observons qu'il n'ya pas de croissance sur le bouillon MRS après un traitement thermique pendant 30 minutes à 63°C (**Badis et al., 2005**).

Nos résultats sont identiques à ceux trouvés par (**Garive ,1984**) et (**Dellaglio et al.1994**) les leuconostokes sont généralement mésophiles avec une température optimale de croissance de 25 à 30°C.

II. 3.2. Résistance à la salinité

Les souches qui ont été testées pour mettre en évidence leur résistance aux différentes concentrations de sel a montré une résistance à la concentration de 03% de NaCl mais elles n'ont pas poussées en présence de 6.5% de NaCl à l'exception de 3souches (LB1, LB2, LB21)ont été résisté à cette concentration de 6.5% de NaCl.

II. 3.1. Croissance à différents pH

Après une incubation à 30°C, les résultats qui ont été obtenus montrent que toute les souches supportent le pH 6.8 et plus de la moitié des isolats ont montré une croissance sur milieu MRS à pH 9.6 et la plupart elles n'y a pas se croitre dans un milieu MRS à pH 4.8 à l'exception pour tous les souches.

Les résultats des tests physiologiques qui ont été réalisés sur les isolats sont représentés dans le tableau suivant:

Tableau 0 4: Tableau représentant les résultats des tests physiologiques.

| Souches | Croissance à différentes T° | | | | | Croissance à différentes [Na Cl] (%) | | Croissance à différentes Ph | | |
|---------|-----------------------------|-----|------|-------|------------|--------------------------------------|------|-----------------------------|-----|-----|
| | 4°C | 10° | C37° | C42°C | 63°C/30min | 3% | 6.5% | 4.8 | 6.8 | 9.6 |
| LB1 | - | + | + | + | - | + | + | - | + | + |
| LB2 | + | + | + | + | - | + | + | - | + | + |
| LB10 | + | + | + | - | - | + | - | - | + | - |
| LB12 | - | + | - | - | - | + | - | - | + | - |
| LB13 | - | + | + | - | - | + | - | - | + | - |
| LB15 | - | + | - | - | - | + | - | - | + | + |
| LB16 | + | + | - | - | - | + | - | - | + | + |
| LB18 | - | + | - | - | - | + | - | - | + | - |
| LB21 | + | + | - | - | - | + | + | - | + | + |
| LB23 | - | + | - | - | - | + | - | - | + | + |

+ : croissance

- : pas de croissance

II.5. Tests biochimiques

II.4.1. Recherche de type fermentaire

Ce test constitue la première clé d'identification phénotypique des bactéries lactiques leur objectif est de faire différencier entre les souches hétéro fermentaire et les souches homofermentaire (**Hansal, 2015**).

Après une incubation à 30°C, les résultats montre qu'il y a l'apparition d'un trouble au fond des tubes ensemencés avec un dégagement de gaz de CO₂ lors de fermentation du glucose (bouillon MRS glucosé) au niveau de la cloche de durham et flottement de cette dernière dans le milieu, ce qu' indique que 23 des isolats choisis ont révélé un métabolisme hétéro fermentaire (Figure 11) ce qui caractérise le genre de *Leuconostoc* mais cette probabilité à été confirmé par le test de l'ADH qui est négatif chez les leuconostokes ce qui les différenciées des lactobacilles hétéro fermentaires(**Mathotet al., 1994; Badis et al., 2005**).

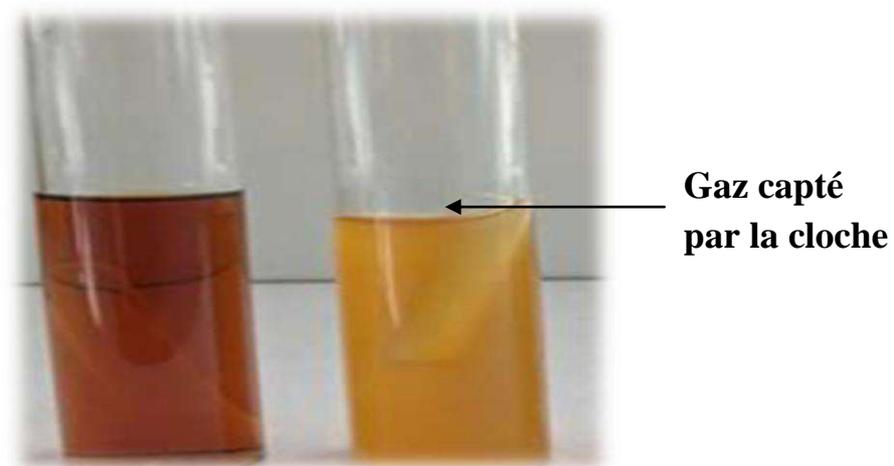


Figure11 : Type fermentaire des souches *Ln. mesenteroides subsp mesenteroides* isolées sur bouillon MRS.

II.4.2. Hydrolyse de l'arginine

Après 48h d'incubation sur gélose M16.BCP à 30°C, 23 souches isolées métabolisent le lactose en produisant de l'acide lactique, ce dernier va diminuer le pH en changeant la couleur de l'indicateur de pH du vert au jaune, mais elles sont incapables d'hydrolyser l'arginine contenu dans le milieu M16 BCP, car les *Leuconostokes* ne possèdent pas l'ADH (arginine déshydrogénase) donc ADH(-)(**KHEDID et al., 2006**).Ce caractère est recherché dans l'industrie

alimentaire, elle empêche l'émergence d'un goût amer due à l'ammoniac lors de la fermentation du lait.

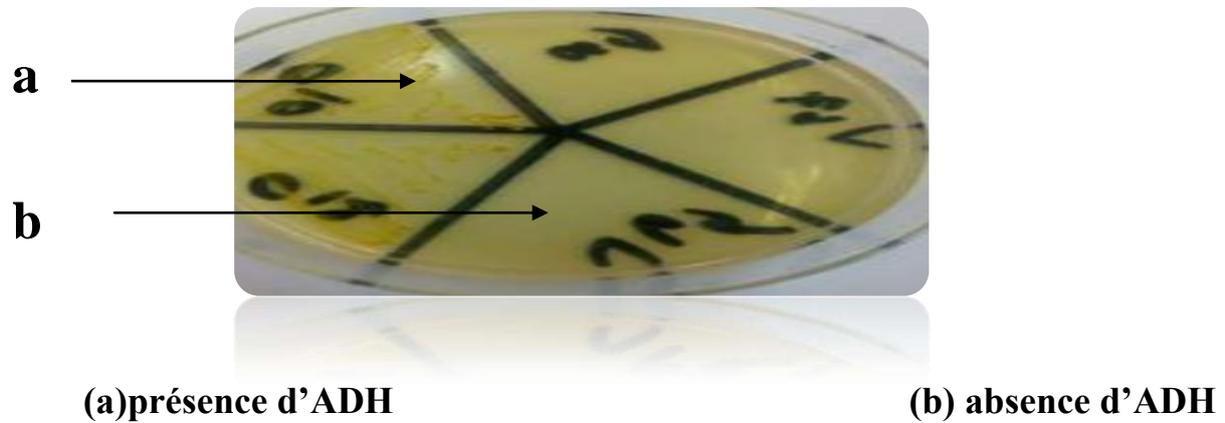


Figure 12 : Résultat de test ADH (Hydrolyse de l'arginine)

II.4.3. Test des sucres

Pour mieux identifier les isolats en espèce et sous espèce on a établi leur profil fermentaire d'onze sucres pour vingt-trois souches isolées. En utilisant le milieu MRS BCP qui contient le bromothymol qui est un indicateur de pH, le virage au jaune révèle la fermentation des carbohydrates qui provoque une acidification du milieu. Le sucre arabinose c'est le sucre clé pour différencier entre les espèces du genre *Leuconostoc*. L'utilisation de ces critères phénotypiques permet de conclure la pré-identification et de mieux identifier les isolats au niveau de l'espèce. Les résultats obtenus sont représentés sur le Tableau (05), Figure (13) partir différents source de carbone.

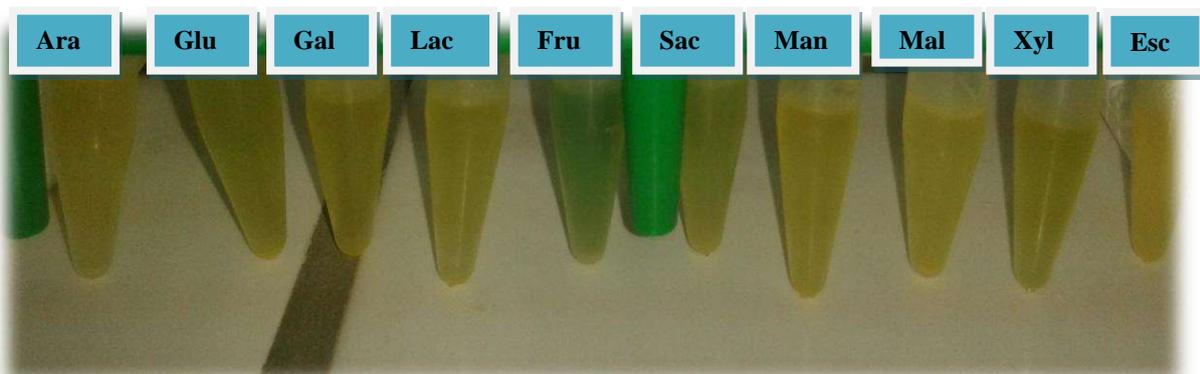


Figure13 : La dégradation des sucres par les souches de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Mesenteroides*.

- **Jaune** : fermentation du sucre résultat (+)

- Vert : pas fermentations du sucre résultat(-)

Tableau05:Résultats du profil fermentaire des souches isolées

| Souches | Arabinose | Glucose | Galactose | Lactose | Fructose | Saccharose | Mannitol | Maltose | Xylose | Mannose | Esculine |
|---------|-----------|---------|-----------|---------|----------|------------|----------|---------|--------|---------|----------|
| LB1 | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + |
| LB2 | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + |
| LB10 | - | + | + | + | + | - | - | + | + | + | +/- |
| LB12 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| LB13 | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | - |
| LB15 | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | - |
| LB16 | - | + | - | + | - | + | - | + | - | - | +/- |
| LB18 | - | + | - | + | - | + | - | + | - | - | - |
| LB21 | - | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + |
| LB23 | - | + | - | + | - | + | - | + | - | - | - |

(+)Dégradation du sucre

(-) Pas de dégradation

D'après les critères phénotypique apportées par différents auteurs (Carr et al., 2002;Badis et al ., 2005; Hammes et Hertal, 2006; Khedid et al., 2006), nous avons pu conclure que les leuconostokes sont capable d'utilisés plusieurs sucres, le virage de couleur bleu de bromothymol contenant dans le milieu MRS BCP confirme l'identification microbiologique a révélé que 4 souches (LB1, LB2, LB13 et LB15) isolées de lait de chèvre appartiennent à la sous espèce *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Mesenteroides*.

II.5. Tests biotechnologique

II. 5. 1.Production d'exopolysaccharides

L'incorporation de dextrane dans les produits de boulangeries en industrie alimentaire améliore la texture et le volume de pain et il est aussi utilisé comme un additif dans des plusieurs produits (Vettoriet al., 2012).Sur milieu MSE qui est un milieu sélectif permettant la recherche et le dénombrement des Leuconostokes dans le lait, les produits laitiers et les

aliments sucrés. La production de dextrane a été vérifiée sur milieu MSE dont lequel ce genre de bactéries utilisent le saccharose de milieu pour synthétiser des exo polysaccharides (dextrane) qui donnent aux colonies un aspect gélatineux (**Hansal, 2015**). On a obtenu après 48h d'incubation des colonies larges, visqueuses, gluantes et transparentes sous deux formes: (Figure 14)

- 1) De grosses colonies gluantes, devenant rapidement confluentes au fur et à mesure que l'incubation se prolonge; Représentent l'aspect macroscopique de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Mesenteroides*.
- 2) De petites colonies (2 mm environ de diamètre) bombées et adhérant fortement à la surface de la gélose. Représentent l'aspect macroscopique de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*.

Ce caractère important nous a permis de différencier entre les espèces de *Leuconostoc* et de supposer leur appartenance à une des deux espèces productrices de dextrane: *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Mesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*. Ce, ce qui a été montré par (**Mayeux et Elliker, 1962; Garvie, 1984; Carr et al., 2002; Badis et al., 2005**).



Figure 14 :L'aspect des colonies productrices de dextrane sur gélose MSE

II. 5. 2. Production des substances aromatiques

Le milieu KMK différencie entre les bactéries qui utilisent le citrate pour donner des produits aromatiques et les bactéries qui n'utilisent pas le citrate. Dans le premier cas les résultats se manifestent par des colonies de couleur bleu contrairement les résultats négatifs donnent des colonies de couleur blanche Figure(15)

Les *Leuconostocs* ont été utilisées dans l'industrie laitière pour leur capacité à produire le CO₂ et des substances aromatiques tel que le diacétyle et cela grâce au Co-métabolisme sucre/citrate (**Bourel et al., 2001**), cette propriété augmente leur taux de croissance et leur rendement dans des conditions acides. (**Hemme et Foucaud-Scheunemann et, 2004**).

La plupart des souches utilisent le citrate et d'autres sont incapables. Cette perte de la capacité d'utiliser le citrate, peut être due à une perte de plasmide codant pour la citrate perméase (**Kihal et al., 1996**). L'utilisation du citrate est un facteur indispensable de la production des composés aromatiques chez les espèces aromatisant de *Leuconostoc* dans les produits laitiers (**Sanchez et al., 2006**). Ce caractère peut être variable même chez les souches appartenant à la même espèce (**Khedid et al., 2006**).

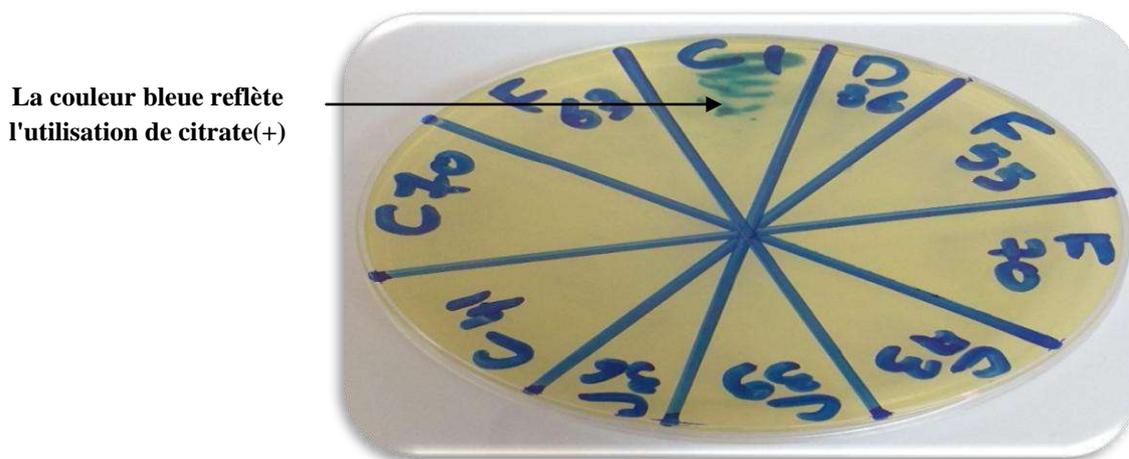


Figure 15: Révélation de l'utilisation de citrate par l'apparition de contour bleu sur gélose KMK d'espèces *Ln. mesenteroide*

II. 5. 3. Production des substances antimicrobiennes

II. 5. 3.1. Interaction microbienne

Après répétitions 07 fois et après avoir ensemencé les 10 souches par touches sur le milieu MRS solide dans le but de sélectionner celles qui possèdent une activité antimicrobienne, nous avons obtenu quatre souches isolées à partir de milieu MRS (LB1, LB2, LB10, LB12).

II. 5. 3.1.a. Méthode de détection directe (Méthode des spots) (**Fleming et al., 1975**)

Après l'ensemencement de 24 souches lactiques par touche sur le milieu MH solide dans le but de cribler et de sélectionner celles qui possèdent une activité antimicrobienne.

Méthode directe de double couche est une méthode de criblage des bactéries lactiques ayant une activité antimicrobienne (**méthode de Fleming et al., 1975**). La souche testée et la souche cible vont être en contact directe à 30 C° pendant 18h à montrer que 10 souches des bactéries lactiques testées ont le pouvoir d'inhiber les bactéries multi résistantes. Le contact entre eux nous permet d'observer un halo clair sur la zone de répulsion dite une zone d'inhibition. La zone claire est l'indice de l'inhibition qui est due à différentes facteurs (les Acides organiques, le diacétyle, le peroxyde d'hydrogène et/ou les bactériocines) (**Schillinger et al., 1996**).

Les 10 souches de *Leuconostoc* ont l'activité antimicrobienne contre les bactéries pathogènes à testées cette activité est apparu comme des zones avec des différents diamètres.

Tableau 6 : Tableau représentent le diamètre des zones d'inhibition (**méthode direct Fleming et al. 1975**).

| Souches | <i>Listeria monocytogenes</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>Staphylococcus thermophilus</i> | <i>Echerichiacoli</i> |
|---------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|-----------------------|
| LB1 | 14mm | 15mm | 15mm | 15mm |
| LB2 | 11mm | 14mm | 14mm | 12mm |
| LB10 | 15mm | 12mm | 12mm | 14mm |
| LB12 | 13mm | 13mm | 13mm | 13mm |

On observe que les valeurs des zones d'inhibitions convergents des souches ont représenté une meilleure activité selon l'histogramme on peut dire que (LB1, LB2, LB3, LB10, LB12) sont les souches de *Leuconostoc* qui ont la capacité à défendre contre les bactéries indésirables par leur différents moyen.

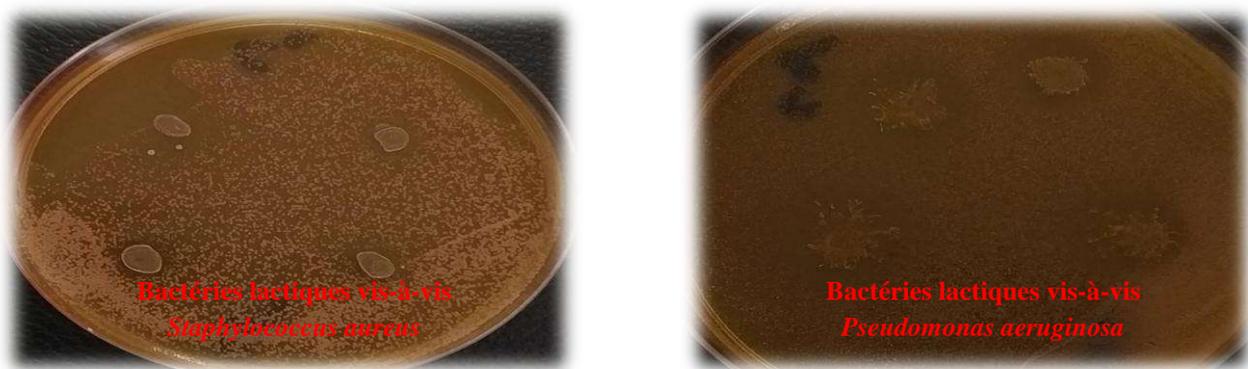


Figure17 : Test de l'activité antimicrobiennes de *Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides* par méthode direct (**Fleming et al. 1975**).

II. V. 3.1.b.Méthode indirect (méthode des puits (Barefoot et Kaenhammer, 1983)

L'objectif de ce teste est de déterminer la nature des substances active; Le principe était de chercher l'effet inhibiteur des souches productrices dans leur surnageant de culture. Nous avons remarqué que cette activité inhibitrice est présente dans le surnageant. Dans ce test, aucune zone d'inhibition n'a été observée autour des puits lorsqu'on a utilisé le surnageant des souches sélectionnée malgré de nombreuses répétitions. Sauf quatre souches LB1, LB2, LB10, LB12 (isolée de milieu MRS) ont une activité contre *Listeria monocytogenes*.

Ce test a été réalisé sur toute les bactéries testées en fonction de leur inhibition remarquable dans les testes précédents. Les bactéries lactiques peuvent produire des substances inhibitrices déférentes 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 cause d'inhibition; l'acidité 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 sont libérés dans le milieu de culture de 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. Une inhibition remarquable même après le chauffage (70C°, 90C°, 110C°) qui veut dire que la substance résiste à la température (Lachance, 2000). Une disparition de la zone d'inhibition après le traitement du surnageant avec le pepsine, ceci indique que l'agent inhibiteur est sensible aux enzymes protéolytiques.

(Savadojo *et al.*, 2004, Hernandez 2005 et Mami 2013) ont rapporté des résultats similaires à ceux obtenus dans ce travail. En fin, d'après les résultats de la recherche de pouvoir antimicrobien des bactéries lactiques; on suggère que cette bactériocine sécrétée par les genres testés, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus* appartient à la classe 2 qui renferme les bactériocines thermorésistantes (Klaenhammer, 1988)



Figure 18: Activité antibactérienne de *Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides* vis-à-vis *Listeria monocytogenes* par méthode de diffusion (indirect).

Tableau 7 : tableau représentés le diamètre des zones d'inhibition par Méthode de diffusion.

| Surnageant | Diamètre |
|------------|----------|
| LB1 | 10mm |
| LB2 | 09 mm |

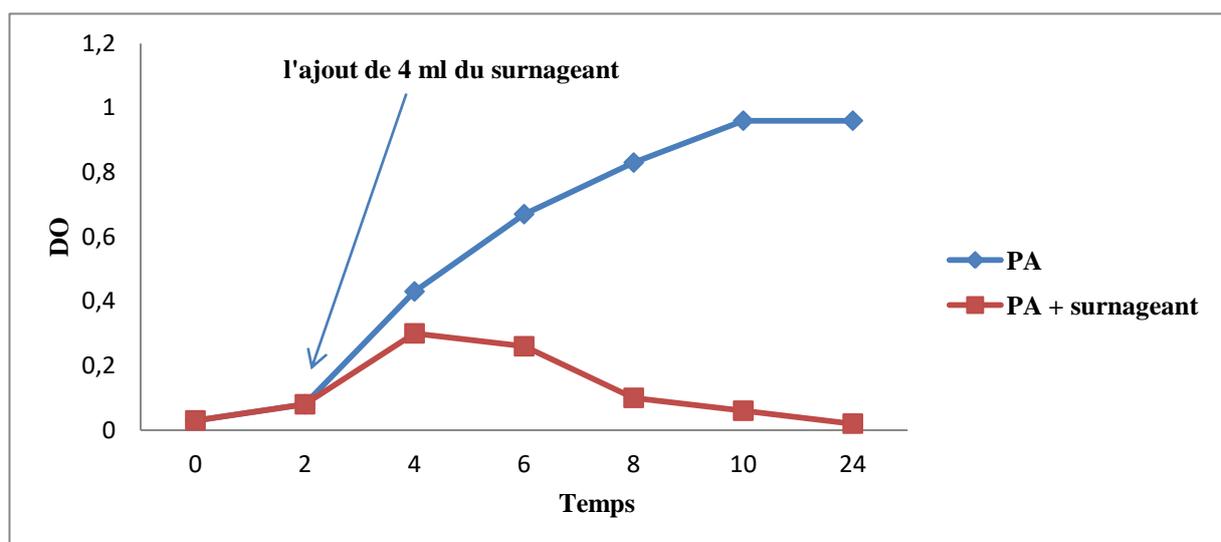
| | |
|------|-------|
| LB10 | 11 mm |
| LB12 | 08 mm |

II. 5.4. Mode d'action des bactériocine

L'effet de la bactériocine de bactéries lactiques isolée, sélectionnée (LB1) vis-à-vis d'*E. coli* ATCC25992, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027, *Listeria monocytogene* ATCC 14028 est évalué par la production de la biomasse bactérienne.

A cet effet, la bactérie pathogène (*E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogene*) est évalué par la production de la biomasse est inoculée dans le milieu de culture liquide MRS, avec une densité optique initiale de 0,5 mesurée à une longueur d'onde de 600 nm, incubée à une température de 37 ° C pendant 24 heures, un volume de 4ml de surnageant de bactérie lactique isolée, sélectionnée *Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides* (LB1) est ajouté 5 heures après le début de la croissance bactérienne.

Les résultats obtenus (**Figure 20**) ont montré une inhibition considérable de la croissance de (*E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogene*), après l'ajout d'un volume de 4 ml de surnageant de bactérie lactique isolés, sélectionnée (LB1). Cette inhibition est expliquée par l'arrêt du cycle cellulaire de *P. aeruginosa* (une croissance déséquilibrée), en comparaison avec la biomasse non traitée (croissance équilibrée).



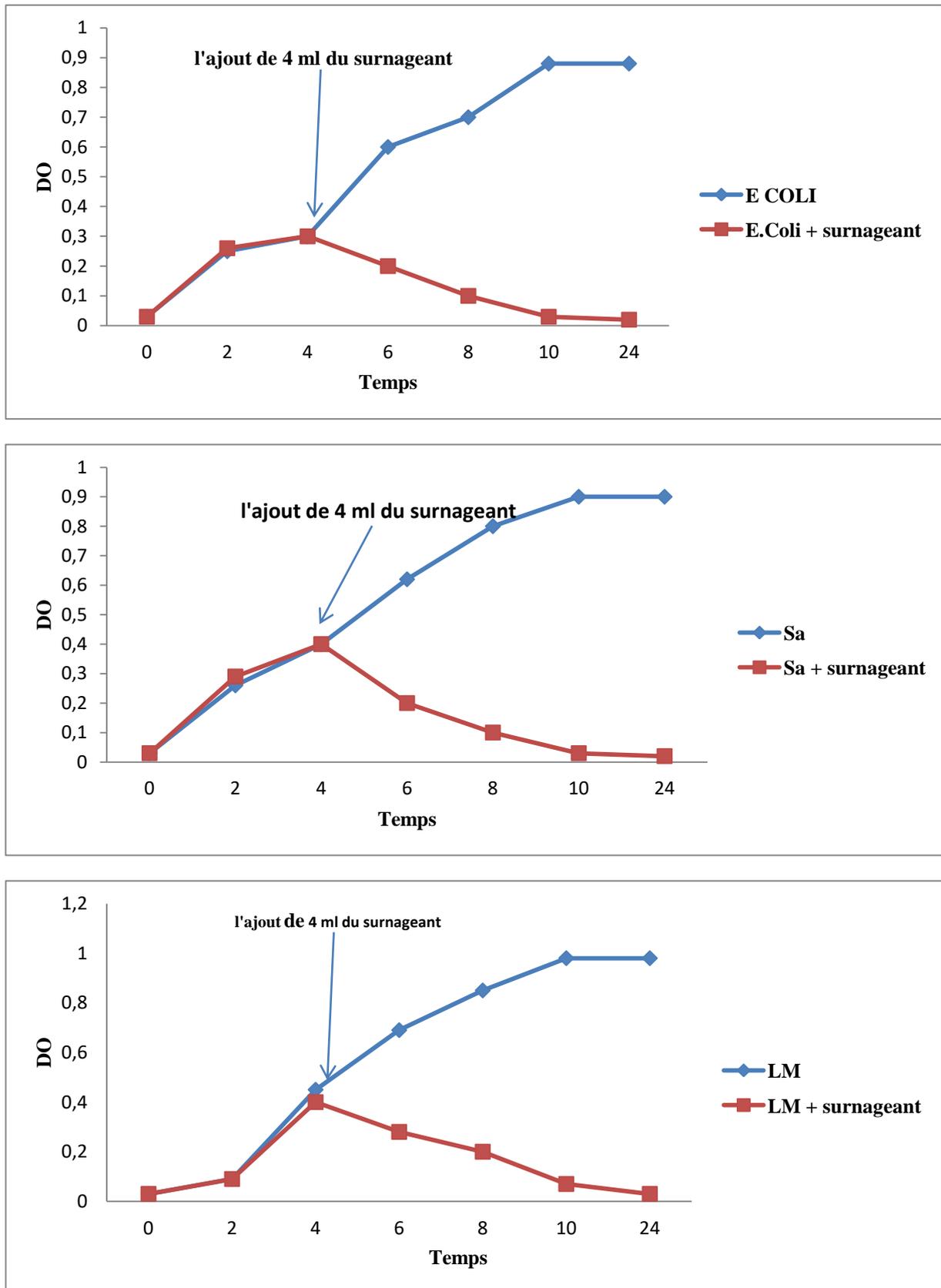


Figure 20: L'étude du suivi de la cinétique de croissance de (*Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Sretaphylococcus aureus*, *Listeria monocytogene*) en présence et en l'absence de

surnageant de LB1, inoculée dans le milieu de culture liquide MRS, incubée à une température de 30°C pendant 24 heures.

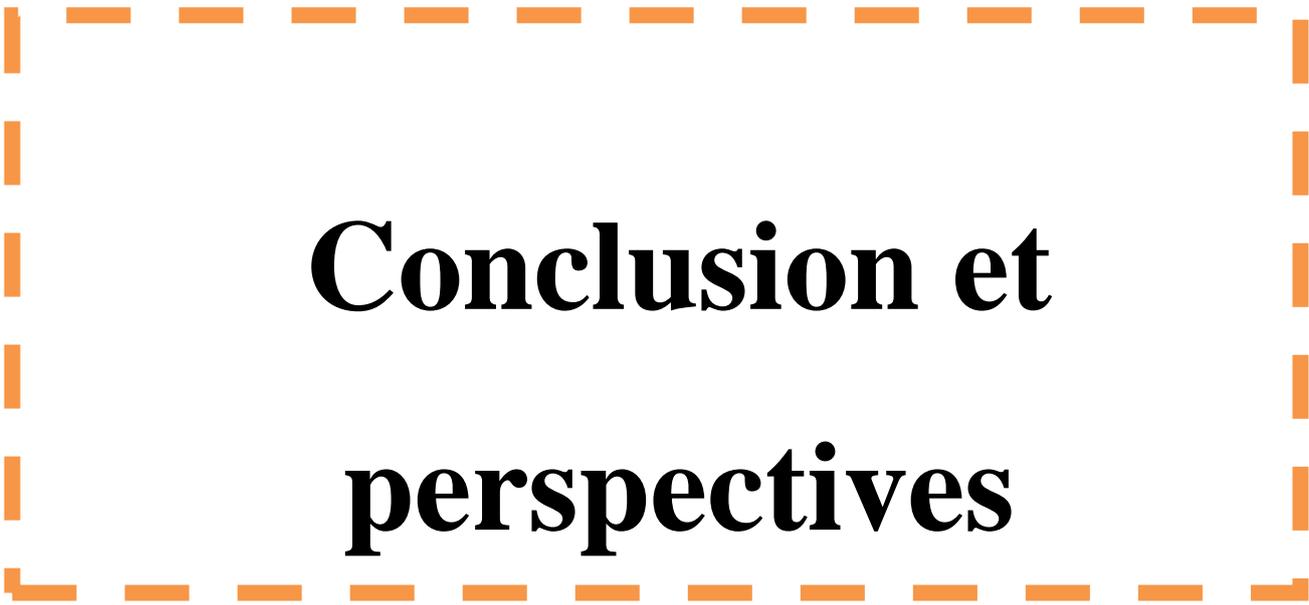
Pendant les premières 6 heures, la croissance de *Staphylocoque* est stable dans le milieu de culture utilisé, et une augmentation considérable de la biomasse la culture non traitée (contrôle). Ensuite, la biomasse de *Staphylocoque* a diminué dans la culture traitée avec le surnageant de *Leuconostoc*.

Les résultats obtenus ont montré une importante activité bactéricide de molécule antibactérienne produite par les souches isolées (LB1) vis-à-vis de *Pseudomonas* et activité bactériostatique vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*.

Le mode d'action des bactériocines dépend des bactéries cibles utilisées et leur concentration.

Nos résultats sont similaire à celle de **Li et al., (2021)**. Qui ont testé la leucocine C de *L. lactis* NZ9000 vis-à-vis *Listeria monocytogenes*

Lahiri et al., (2020) ont montré que l'ajout de bactériocine purifiée de *Leuconostoc lactis* SM-2 à différentes phases de la croissance de *E. coli* a montré que le meilleur effet inhibiteur était au début de la phase de latence tardive (0-2h) mais a l'effet inhibiteur été progressivement réduit lorsque la souche cible atteint la phase stationnaire, à la 8ème heure de croissance. Ce la indiquait que les protéines pouvaient exercer son effet antimicrobien le plus élevé dans la phase précoce de croissance de l'organisme cible *Leuconostoc lactis* SM-2, généralement reconnu sûr (**Fu et al., 2018**) a été isolé à partir d'échantillons de lait de vache a été utilisé pour sa puissance de produisant de la leucocine (**Fu et al., 2018**) Les résultats obtenus à partir de la HPLC a confirmé la production de leucocine par la souche SM-2 (**Hastingset al., 1991**).



Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Les *Leuconostocs* sont susceptibles de jouer de nombreux rôles positifs en technologie laitière, beurrière ou fromagère. Mais une certaine méconnaissance de leur physiologie a pour conséquence, très souvent, une mauvaise utilisation de ces microorganismes. On peut qualifier les *Leuconostocs* des microorganismes «associatifs stricts» quelque soit le rôle qui leur est demandé, il s'agit d'un rôle complémentaire. Des interactions entre les *Leuconostocs* et les levains lactiques vont dépendre le rendement, la réussite de l'utilisation des *Leuconostocs*.

Actuellement, on dispose d'un ensemble de souches des bactéries lactiques productrices de bactériocines possédant des caractéristiques différentes notamment au niveau de leur spectre d'action.

Le but de cette recherche était d'étudier et caractériser les substances antimicrobiennes des bactéries lactiques en se basant surtout sur la recherche des bactériocines par la méthode des interactions de ces souches productrices et les germes pathogènes (*E. coli* ATCC25992, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027, *Listeria monocytogene* ATCC 14028).

Les souches des bactéries lactiques utilisées dans cette étude ont été isolées à partir de du lait cru de chèvre et ont été identifiées en s'appuyant sur les caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques.

Nous avons essayé de montrer que les 10 bactéries lactiques isolées à partir du lait cru de chèvre produisent une activité antimicrobienne contre les bactéries pathogènes sur le milieu solide. Nous avons criblé 04 souches lactiques pures appartiennent au genre *Leuconostoc* qui sont capables de produire des substances antimicrobiennes permettant d'éliminer la croissance des germes cibles pathogènes.

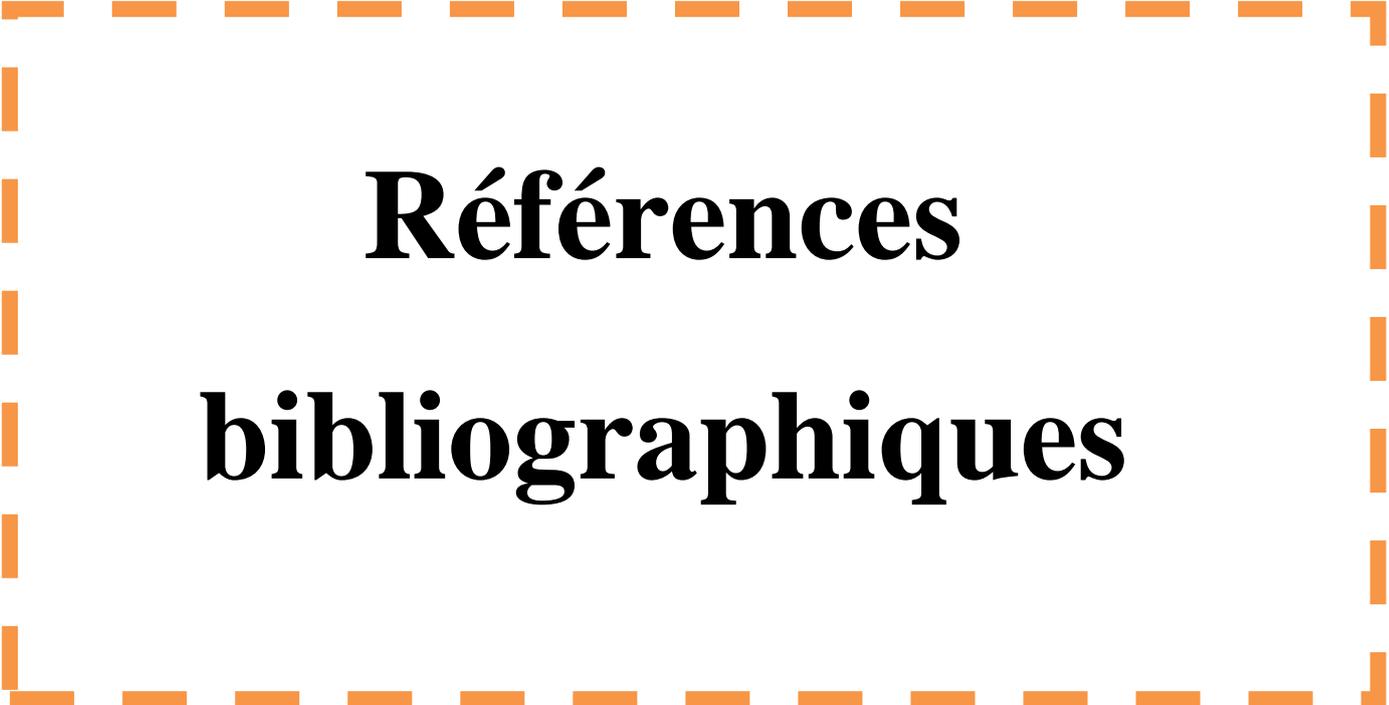
L'importance de ce travail est d'employer les bactériocines des bactéries lactiques comme un bio conservateur au lieu des additifs chimiques utilisés dans les industries agro-alimentaire et de montrer l'efficacité de ces composés vis-à-vis les bactéries pathogènes.

Conclusion et perspectives

D'autres études seront nécessaires pour en savoir plus sur l'action des bactériocines sur les champignons, les protozoaires et ainsi sur les bactéries à Gram négatif qui sera intéressant de fonder une recherche approfondie sur ce point.

Aussi des perspectives peuvent être proposées ce travail :

- Détermination de poids moléculaire, composition en acides aminés
- L'étude de leur spectre d'inhibition
- Action du pH sur la stabilité de la bactériocine
- L'analyse de leurs structures chimiques
- La purification de bactériocines
- Leur utilisation dans le domaine médical et biotechnologique.



Références bibliographiques

Références bibliographiques

Abid, Z. (2015). Étude de l'activité antimicrobienne des souches de bactéries lactiques isolées d'un produit laitier traditionnel Algérien Jben (Doctoral dissertation) p20-77.

Ayadi, H., Djebbas, A., & Bouricha, M. (2018). Caractérisation du dextrane produit par des souches de *Leuconostoc* isolées des produits laitiers (Doctoral dissertation) p40-66.

Aissaoui Zitoun, O., Pediliggieri, C., Benatallah, L., Lortal, S., Licitra, G., Zidoune, M.N., et Carpino, S. (2012). Bouhezza, a traditional Algerian raw milk cheese, made and ripened in goatskin bags. *Journal of Food, Agriculture & Environment* Vol. 10 (2): p289-295.

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.

Axelsson, L. (1998). Lactic acid bacteria: Classification and physiology. *In: Lactic acid bacteria*. Ed. S. Salminen and A. von Wright. Marcel Decker. p. 1-72.

Badis, A., Guetarni, D., Kihal, M. et Ouzrout, R. (2005). Caractérisation phénotypique des Bactéries lactiques isolées à partir de lait de chèvre de deux populations locales "Arabia et Kabyle». *Scien &Tech*, **23** : p 30-37.

Badis, A., Guetarnib, D., Moussa Boudjemaa, B., Hennic, D.E., Kihal, M. (2004). Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiology*, **21**:p 579–588.

Badis-Mostaganem, I. Interactions des bactéries lactiques vis-à-vis à des bactéries pathogènes p20-60.

Bendanou. (1981). L'industrie beurrière chez les pasteurs nomades du sud-Algérien. Communication faite à l'Office Colonial de l'Algérie, p570-580.

Belarbi, F. (2011). Isolement et sélection des souches de bactéries lactiques productrices des métabolites antibactériens (Doctoral dissertation, Université d'Oran1-Ahmed Ben Bella) p30-75.

Benkerroum, N., et Tamime, A Y., (2004). Technology transfer of some Moroccan traditional dairy products (Iben, Jben and smen) to small industrial scale. *Journal of Food Microbiology* **21**: p 399-413.

Références bibliographiques

Bouferroum, I., Boulahia, M., Brinet, S., & Moussaoui, S. E. (2020). La multi-résistance bactérienne: Effet antibactérien de *Lactobacillus plantarum* (Doctoral dissertation, Université de Jijel).p40-77.

Chakou, R., & BESSEDIK, K. Etude de quelques caractères technologiques des souches de *Leuconostoc* isolées à partir du lait de chèvre et de chamelle p 18-44.

Chemchem, A., Merabet, I., Haddad, S., & Boubezari, M. T. E. (2020). Bactériocines: nouvelles approches d'alternatives aux antimicrobiens conventionnels (Doctoral dissertation, Université de Jijel) p15-55.

Cherrad, Z., Tazegouaret, I., & Chekara Bouziani, M. (2020). Isolement, identification et diversité génétique par les marqueurs moléculaires des bactéries lactiques qui présentent l'activité protéolytique isolées du lait de Chèvre p28-34.

Cholakov R., Denkova Z., Yanakieva V., Tumbarski Y., Urshev Z. and Dobrev I. (2016). Biochemical and molecular identification of a strain *Leuconostoc lactis* BT17, isolated from spontaneously fermented cereal beverage. Academic Food Journal (Akademik Gida); 14(3): 230 – 234.

Cholakov, R., Tumbarski, Y., Yanakieva, V., Dobrev, I., Salim, Y., & Denkova, Z. (2021). Antimicrobial activity of *Leuconostoc lactis* strain BT17, isolated from a spontaneously fermented cereal beverage (Boza). Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 2021, 47-49.

Djelloul Daouaji , S. (2021). Isolement et identification des bactéries antagonistes vis-à-vis des souches pathogènes multirésistantes (Doctoral dissertation) p 34-40.

Djermane, I., & Medjoudj, H. (2020). Dénombrement, isolement et identification de bactéries lactiques à activité antibactérienne isolées à partir de lait et de fromage traditionnel de chèvre p22-45.

DAOUDI, H., & KHELEF, C. (2018). Contribution à l'étude de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques isolées à partir du lait cru P19-44.

De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K-H. et Whitman W. B. (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second Edition, Volume 3: the Firmicutes, Springer USA, p543.

Références bibliographiques

- De Vuyst, L et Vandamme. J.(1994).** Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: properties, biosynthesis, fermentation and application. 151-221 In L. De Vuyst and E. J. Vandamme (eds.), *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and applications*. Blackie Académie and Professional. London, UK.
- El-Baradei, G., Delacroix-Buchet, A. et Ogier, J.C. (2008).** Bacterial biodiversity of traditional Zabady fermented milk. *Int. J. Food Microbiol.* 121: p295–301.
- Ennahar, S., Deschamps, N et Richard, J. (2000).** Natural variation in susceptibility of *Listeria* strains to class IIa bacteriocins. *Curr. Microbiol.* **41**: 1-4.
- Ercolini, D., Russo, F., Ferrocino, I. et Villani, F. (2009).** Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. *Food Microbiol*, **26**:p 228–231
- Euzéby, J.P., (1997).** List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature. *International Journal of Systematic Bacteriology* 7: 590-592.
- F 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.
- Fox, P.F., et Mc Sweeney,P.L.H., (2004).** Cheese an overview. In *Cheese: Chemistry Physics and Microbiology*, general aspects, third edition. 1: 1-8.
- Fox P.F., Guinee T.P., Cogan T.M et Mcsweeney P.L.H.,(2000).** Fundamentals of cheese science. Gaithersburg, MD:Aspen Publishers Inc.
- Fregeau Gallagher, N. L., Sailer, M., Niemczura, W. P., Nakashima, T. T., Stiles, M. E., et Vederas, J. C. (1997)** Three-dimensional structure of leucocin A in trifluoroethanol and dodecylphosphocholine micelles: spatial location of residues critical for biological activity in type IIa bacteriocins from lactic acid bacteria. *Biochemistry*.**36**: 15062- 15072.
- Frédériq P. (1948)** Actions antibiotiques réciproques chez les Enterobacteriaceae. *Rev. Belg. Pathol. Med. Exp.* 19: 1-17
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R. L., BenOmar, N. (2007).** Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* , **120**: 51-70.
- Giraffa, G. (2003).** Functionality of Enterococci in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* **88**: p215–222.
- 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.
- Hallel A. (2001).** Fromages traditionnels algériens. Quel avenir *Revue Agroligne.*, 14: p43-47.

Références bibliographiques

- Hancock, R. E. (2000):** Cationic antimicrobial peptides: towards clinical applications. *Expert Opin Investig Drugs*.**9**:p 1723-1729.
- Haugen, H. S., Fimland, G., Nissen-Meyer, J., et Kristiansen, P. E. (2005)** Threedimensional structure in lipid micelles of the pediocin-like antimicrobial peptide curvacin A. *Biochemistry*.**44**: 16149-16157.
- Héchar, 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.
- Heng, N. C. K., Wescombe, P. A., Burton, J. P., Jack, R. W., and Tagg, J. R. (2007)** The Diversity of Bacteriocins in Gram-Positive Bacteria. In: Riley, M. A., and Chavan, M. A. (Eds). *Bacteriocins: Ecology and Evolution*. Springer Verlag. Berlin Germany. Pp 45-92.
- Hermier, J., Lenoir, J., Weber, F. (1997).**Rôle des bactéries lactiques dans la production des facteurs anti microbien, les groupes microbien d'intérêt laitier. Ed. Cepil. Paris, p 9-60.
- Idder, Z.** étude du pouvoir acidifiant des bactéries lactiques appartenant au genre *Leuconostoc* (Doctoral dissertation) p34-55
- Jacobsen, T., Budde, B.B., Hornbaek, T.,, Barkholt, V. and Koch, A.G. (2003)** *Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for use as a protective culture for vacuum-packed meats: culture isolation, bacteriocin identification, and meat application experiments. *International Journal of Food Microbiology* p 83, 171–184.
- Jacob F., Lwoff A. , Siminovitch A. & Wollman E.L. (1953)** Définition de quelques termes relatifs à la lysogénie. *Ann. Int. Pasteur* **84** : 222-4
- Jorger MC, Klaenhammer TR (1986)** Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *J Bacterio*/167, 439-446
- Klaenhammer, T.R. (1993),** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, **12**(1-3): 39-85.
- Kempler, G.M. et Mc Kay, L.L., (1980),** “Improved medium for detection of citrate-fermenting *Streptococcus lactis* subsp *diacetylactis*”, *J. Appl. Environ. Microbiol.* **39**pp. 956-927
- Khoudja, B. (2018).** Caractérisation phénotypique et moléculaire des souches des bactéries lactiques productrices de bactériocine (Doctoral dissertation) p25-54.
- Kleerebezem M., (2004).** Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis. *Peptides*, **25**, 1405-1414.

Références bibliographiques

- Kostinek, M., Specht, I., Vinod, A., Edward., Ulrich Schillinger, U., Hertel, C., Wilhelm, H., Holzapfel, Charles, M. A. P., Franza. (2005).** Diversity and technological properties of predominant lactic acid bacteria from fermented cassava used for the preparation of Gari, a traditional African food. *Systematic and Applied Microbiology*, **28**: 527–540.
- Lahiri, D., Chakraborti, S., Jasu, A., Nag, M., Dutta, B., Dash, S., & Ray, R. R. (2020).** Production and purification of bacteriocin from *Leuconostoc lactis* SM 2 strain. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, **30**, 101845.
- Lemouchi, L, 2008.** Le fromage traditionnel bouhezza: enquête dans la wilaya de Tébessa et suivie de l'évolution des caractéristiques physico-chimiques de deux fabrications. Mémoire d'ingénieur, INATAA, Constantine, Algérie, p 65.
- Leveau J.Y., Boiux M. et De Roissart H.B., (1991).** La flore lactique : technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro alimentaires. 2e Ed., Tec & Doc, Lavoisier. Paris. **3** : 2-40.
- Linnett, P. E., et Strominger, J. L. (1973)** Additional antibiotic inhibitors of peptidoglycan synthesis. *Antimicrob Agents Chemother.***4**: 231-236.
- Li, R., Wan, X., Takala, T. M., & Saris, P. E. (2021).** Heterologous Expression of the *Leuconostoc* Bacteriocin Leucocin C in Probiotic Yeast *Saccharomyces boulardii*. *Probiotics and antimicrobial proteins*, **13**(1), 229-237.
- Lubelski J., (2008).** Biosynthesis, immunity, regulation, mode of action and engineering of the model lantibiotic nisin. *Cell. Mol. Life Sci.*, **65**, 455-476.
- Luquet, F.M. et Corrieu, G. (2005).** Bactéries lactiques et probiotiques. Edition Lavoisier, Paris. 307 pages.
- Mami, A., Henni, J. E., Kihal, M. (2008).** Antimicrobial activity of *Lactobacillus* species isolated from Algerian raw goat's milk against *Staphylococcus aureus* . *World J. Dairy & Sci* ., **3**: 39-49.
- Marchal, N., Bourdon, J.L. et Richard, CL. (1991).** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries .3 ème Ed. , Doin éditeurs, Paris.
- McAuliffe, O., Ross, R.P et Hill, C. (2001).** Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS. Microbiol Rev*, **25**: 285-308.
- Mechai A. et Kirane D., (2008).**Antimicrobial activity of autochthonous lactic acid bacteria isolated from Algerian traditional fermented milk “Raïb”. *African Journal of Biotechnology*, **7** (16):p 2908-2914.

Références bibliographiques

- Menard, J.L., Roussel, P., Masselin-Silvin, S., Puthod, R., Hetreau, T., Foret, A., Houssin, B., Aracil, C. and Le Guenic, M., (2004).**Contamination bactérienne d'une litière de stabulation libre paillée : effet de la fréquence de paillage et proposition d'une méthode pour son évaluation. In: Rencontres sur les Recherches autour des Ruminants. Institut de l'Élevage – INRA, Paris, **11** : p 333–336.
- Nigutova K.,(2007).** Production of enterolysin A by rumen *Enterococcus faecalis* strain and occurrence of enlA homologues among ruminal Gram+ cocci. *J. Appl. Microbiol.*, **102**(2), 563-569.
- Nilsen, T., Nes, I.F., Holo, H. (2003)** Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG2333. *Appl. Environ. Microbiol*, **69**(5): 2975-2984.
- O'sullivan L., Ross R.P. ET Hill C. (2002).** Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*,**84**, 593-604.
- 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.
- Patton G.C. & Van Der Donk W.A., (2005).** New developments in lantibiotic biosynthesis and mode of action. *Curr. Opin. Microbiol.*, **8**, 543-551.
- Piard J.C. , Desmazeaud M. (1991).** Inhibitions' factors produced by lactic acid bacteria: Bacteriocins and other antibacterial substances. *Le lait*, **72**, 113-142.
- Pilet M-F., Brillet A., Drider D., et Prevost H. (2005)** La biopréservation : une technologie innovante de conservation des aliments. *Revue Générale du Froid*, mai 2005, **1053** : 32-35.
- Poillot, (2010).**Transformer les produits laitiers frais à la ferme. **3^{ème}**Ed- Paris : édition p. 12
- Randazzo, C.L., Caggia, C. et Neviani, C.L.E. (2009) .**Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. *J. Microbiol. Methods*, 78:p1–9
- Roudaut, H., Lefrancq,É., (2005).** Alimentation théorique. **2^{ème}** Ed- Paris : p.115
- Ruiz-Moyano S., Martin A., Benito M.J., Nevado F.P., Cordoba M.G., *Meat Science*. **80** (2008) 715-721.**
- 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
- Sass, P., A. Jansen, C. Szekat, V. Sass, H.G. Sahl, et G. Bierbaum. (2008)** « The Lantibiotic Mersacidin Is a Strong Inducer of the Cell Wall Stress Response of *Staphylococcus Aureus* », *BMC Microbiol*, vol. 8, p. 186.

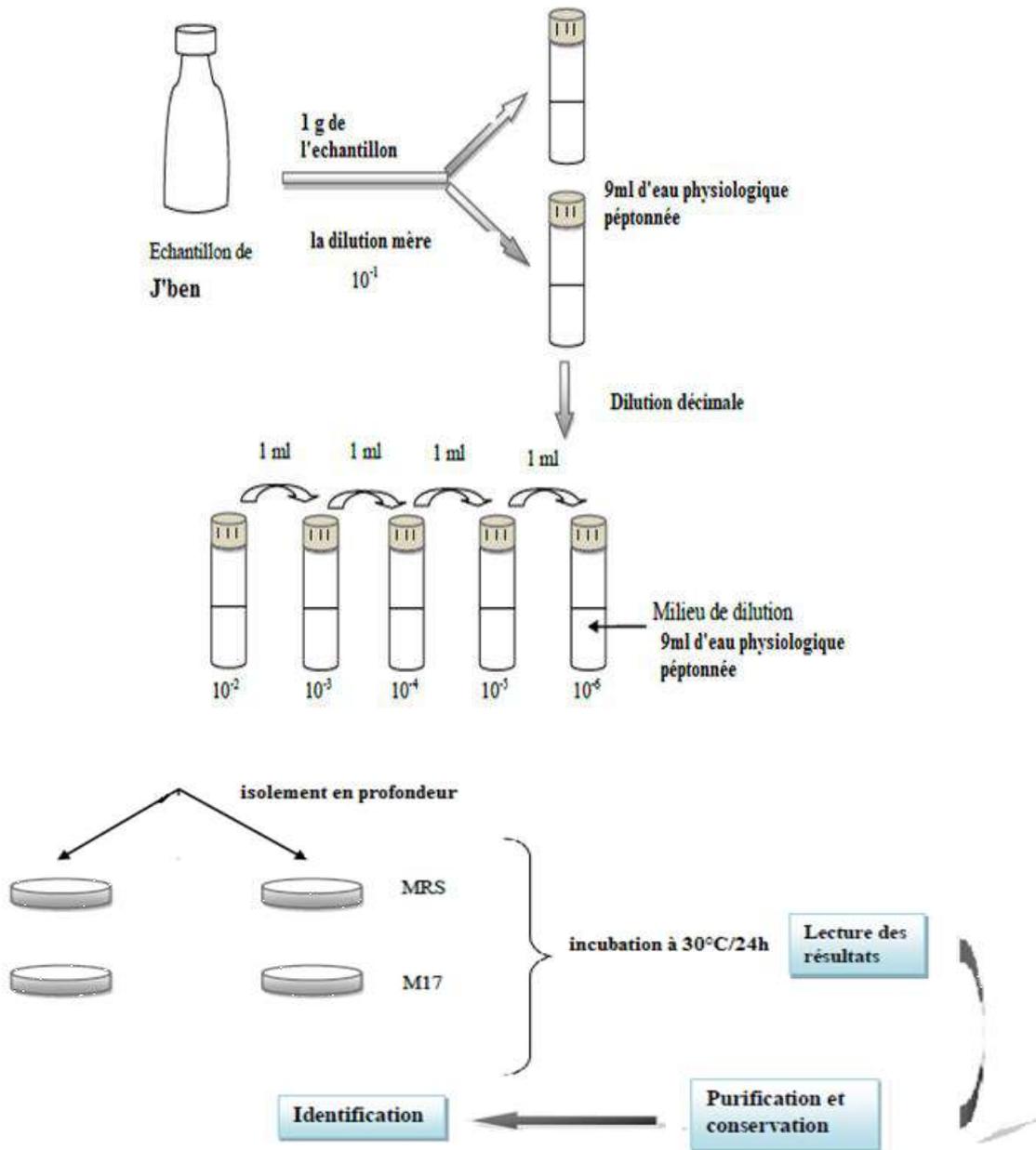
Références bibliographiques

- Savadogo, A. Traore, A.S.(2011).**La flore microbienne et les propriétés fonctionnelles des yaourts et laits fermentés. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 5(5): 2057-2075, October 2011 .ISSN 1991-8631 p 2063-2064
- Scardovi, V.,(1986).** Section15. 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.
- Sebti I. (2002).** Bio-emballage actif incorporant la nisine, diffusion de cette bactériocine en gel d'agarose. Thèse de doctorat .France.
- Shah, N.P. ,(2000) :** Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods, *Journal of Dairy Science*, ,**83**, 894-907
- Shan-na, L., Han, Y., Zhi-jiang, Z.(2011).** Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods. *Food Research International*, **44**:p 643–651
- Tagg, J.R. (2004)** « Prevention of Streptococcal Pharyngitis by Anti-*Streptococcus pyogenes* Bacteriocin-like Inhibitory Substances (BLIS) Produced by *Streptococcus salivarius* », *Indian J Med Res*, vol. 119, , p. 13-16.
- Tailliez, P., Quiberoni, A., Rezaiki, L., El Karoui, M., Biswas, I., and Gruss, A. (2001)** Distinctive features of homologous recombination in an 'old' microorganism, *Lactococcus lactis*. *Res Microbiol.***152**: 131-139.
- Takahiro, M., Nobuhiko, K. et Toshinao, G.(2007).** Milk consumption does not affect body mass index but may have an unfavorable effect on serum total cholesterol in Japanese adults. *Nutr. Res*, **27**: p 395–399.
- Tantaoui-Elaraki, A. et El Marrakchi, A.(1987).**Study of the Moroccan dairy products : Lben and smen. *Mircen J.3* : p 211–220.
- Willey J.M. & van der Donk W.A., (2007).** Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Annu. Rev. Microbiol.*, **61**, 477-501.
- Yang C., Wang D., Zhou Q. And Xu J. (2015).** Bacteremia Due to Vancomycin-Resistant *Leuconostoc lactis* in a Patient With Pneumonia and Abdominal Infection. *The American Journal of the Medical Sciences*, 349(3): 282 – 283.
- Zarour K.(2010).** Contribution à l'étude microbiologique et technologique des espèces *Leuconostoc mesenteroides* isolées de différents écosystèmes. Mémoire pour l'obtention de Magister. Université d'Oran. Algérie. Page56.

ANEXES

Annexes

Annexe01 : Préparation des dilutions décimales, isolement, conservation et identification

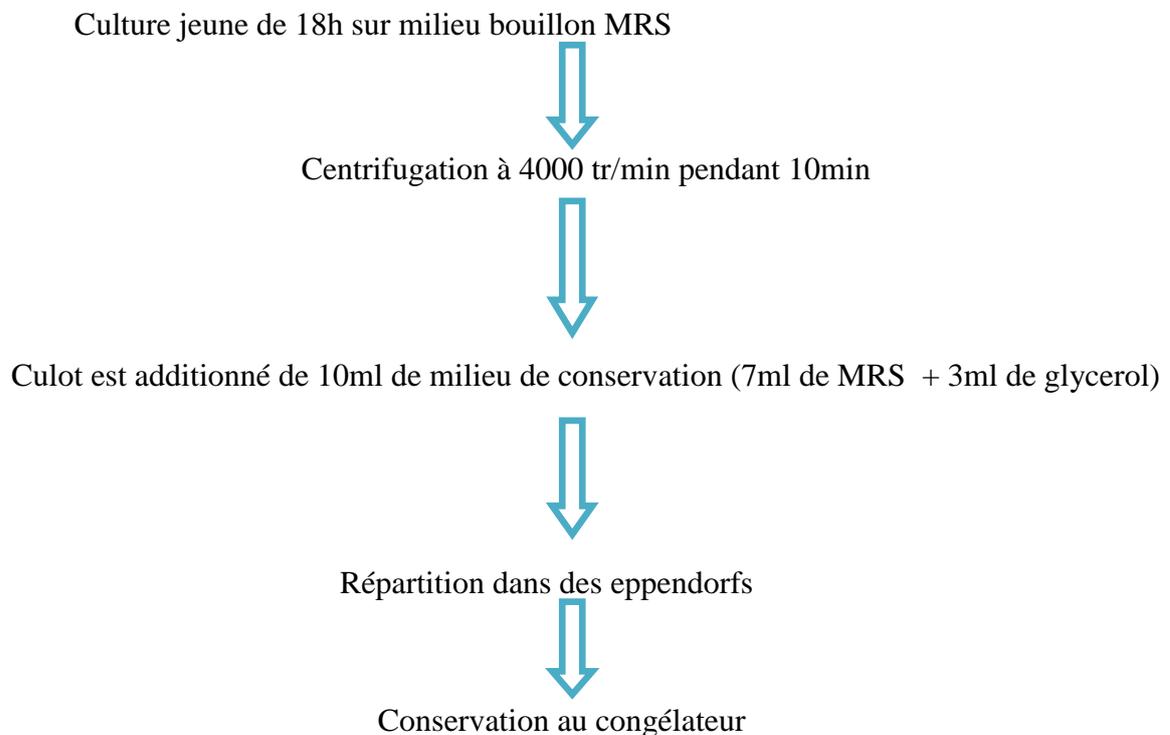


Annexe 02 : Protocole de coloration de Gram

Technique

1. Réaliser un frottis et fixer.
2. Plonger la lame dans le violet de gentiane (ou cristal violet) phéniqué pendant 1 minute.
3. laver la lame à l'eau distillée.
4. plonger la lame dans une solution de lugol pendant 1 minute
5. Laver à l'eau distillée
6. Décolorer dix secondes à l'alcool.
7. Rincer immédiatement a l'eau distillée
8. Plonger la lame dans la safranine (ou la fuchsine) phéniquée pendant 1 minute
9. Laver la lame à l'eau distillée.
10. Sécher la lame en la tamponnant avec du papier Joseph.
11. Observer à l'objectif x100 à l'immersion dans l'huile.

Annexe03 : Conservation longue durée des bactéries lactiques (**Badis et al., 2005**)



Annexes

Annexe04 : Tableau représentant le diamètre des zones d'inhibition (**méthode direct Fleming et al. 1975**).

| Souches | <i>Listeria monocytogenes</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>Staphylococcus thermophilus</i> | <i>Echerichiacoli</i> |
|---------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|-----------------------|
| LB1 | 14mm | 15mm | 15mm | 15mm |
| LB2 | 11mm | 14mm | 14mm | 12mm |
| LB10 | 15mm | 12mm | 12mm | 14mm |
| LB12 | 13mm | 13mm | 13mm | 13mm |

Annexe06 : Composition des diluants (g/l)

➤ Eau physiologique peptonée

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

➤ Eau physiologie 9 /ml

| | |
|---------------------|---------|
| Na Cl | 9g |
| Eau distillée | 1000 ml |

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

➤ Milieux solides

Milieu MRS (de Man Rogosa et Sharpe, 1960)

| | |
|---------------------------------------|---------|
| Extrait de levure | 5g |
| Extrait de viande | 5g |
| Peptone..... | 10g |
| Acétate de sodium | 5g |
| Citrate de sodium | 2g |
| Glucose | 20g |
| KH ₂ PO ₄ | 2g |
| MgSO ₄ | 0.1g |
| MnSO ₄ | 0.05 g |
| Agar | 12g |
| Tween80 | 1 ml |
| Agar | 7g |
| Eau distillée | 1000 ml |
| pH=6.5±0.2 à 37°C | |

Annexes

Autoclavage : 121°C /15min.

MRS semi solide :

Eau distillée . 1000 ml

pH=7.1±0.2 à 37°C Autoclavage : 121°C pendant 15min.

Milieu MSE (Mayeux, Sandine et Elliker, 1962)

Tryptone.....20 g
Gélatine.....2.5 g
Extrait de levure..... 5 g
Saccharose.....100 g
Glucose 5 g
Citrates de sodium..... 1 g
Azide de sodium 0.075 g
Agar-agar.....15 g
Eau distillée..... 1000 ml
pH 6,8Autoclavage 120°C/ 20 minute

Milieu KMK (Kempner et Mc Kay, 1980)

Extrait de levure3 g
Biopolytone2,5g
Glucose.....5 g
Agar15 g
Eau distillée1000 ml
pH 6.6

Le milieu est réparti à raison de 100 ml par flacon, puis autoclavé 15 minutes à 121°C.

Au moment de l'emploi on ajoute :

1 ml d'une solution aqueuse de ferricyanide de potassium 10 % (p/v)

1 ml d'une solution aqueuse à 2.5 % (p/v) de citrate ferrique et citrate de sodium (p/p)

Ces solutions sont stérilisées par filtration sur filtre millipore 0.22 µm et sont conservées à l'obscurité à 4°C.

Milieu Mueller-Hinton (Mueller et Hinton, 1941)

Infusion de viande de bœuf 3000 cm³
Peptone de caséine17,5 g
Amidon de maïs1,5 g
Agar-agar 17 g
pH 7.4Autoclavage 120°C/ 20 minutes

Gélose nutritive

Annexes

| | | |
|--------------------|-------|---------|
| Extrait de viande | | 1 g |
| Extrait de levure | | 2 g |
| Peptone | | 5 g |
| Chlorure de sodium | | 5 g |
| Agar-agar | | 15 g |
| Eau distillée | | 1000 ml |

pH 7,4 Autoclavage 120 °C pendant 20 minutes

➤ Milieux liquides

Milieu MRS BCP

| | | |
|--|-------|----------|
| MRS (milieu liquide) moins l'extrait de viande et sans sucre | | 1000 ml |
| Bromocrésol pourpre | | 0,025 mg |

pH7.0 Autoclavage 120°C/ 20 minutes

Bouillon nutritif

| | | |
|--------------------|-------|---------|
| Extrait de viande | | 1 g |
| Extrait de levure | | 2 g |
| Peptone | | 5 g |
| Chlorure de sodium | | 5 g |
| Eau distillée | | 1000 ml |

pH 7,4 Autoclavage 120 °C pendant 20 minutes

Annex 05: Matériels utilisé

- Agitateur magnétique à plaque chauffante
- Anse de platine
- Autoclave
- Bain marie
- Barreaux magnétique
- Bec benzène
- Balance
- Boites de pétri

Annexes

- Centrifugeuse
- Éprouvette
- Erlen mayer
- Etuve
- Four pasteur
- Micropipette
- Microplaquettes
- Mortier pH mètre
- Pipettes pasteurs
- Réfrigérateur
- Spectrophotomètre
- Tubes à essai
- Tubes eppendorf
- Tubes sec en plastique
- Tubes sec en verre
- Vortex électrique

Résumé

Les *Leuconostocs* sont des bactéries lactiques Gram positives, catalase négatif, non pathogènes, tolérant les milieux acides.

Le but de ce travail est l'isolement des souches de *Leuconostoc* productrices des substances antibactériennes vis à vis les bactéries pathogènes (*Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus thermophilus*, *Echerichiacoli*) et l'étude de sa nature. Ce travail nous a permis d'isoler 10 souches (LB1, LB2, LB10, LB12, LB13, LB15, LB16, LB18, LB21, LB23) lactiques qui ont été identifiées par les tests basiques jusqu'à l'atteindre aux souches des *Leuconostocs*.

Le criblage des souches *Leuconostocs* avec les souches pathogènes (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aerogenosa*, *Listeria monocytogene*,...) a donné des résultats positives avec une différence dans les diamètres d'inhibition pour les isolats même après les différents traitements effectués sur les surnagent des *Leuconostocs*, les substances secrètes dans ces surnagent contiennent des protéines « bactériocine ». La caractérisation physico-chimique des substances produites chez les souches isolées, sélectionnées antagonistes (LB1, LB2, LB10, LB12, LB13, LB15, LB16, LB18, LB21, LB23). L'étude du suivi de la cinétique de croissance a montré une inhibition considérable de la croissance (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aerogenosa*, *Listeria monocytogene*) après l'ajout d'un volume de 4 ml de surnageant de bactérie lactique isolée, sélectionnée (LB1).

Cette inhibition est expliquée par l'arrêt du cycle cellulaire de *P. aeruginosa* (une croissance déséquilibrée), en comparaison avec la biomasse non traitée (croissance équilibrée).

Mots clés : *Leuconostocs*, bactéries pathogènes, bactériocine, pouvoir antimicrobien, test d'antagonisme.

Abstract

Leuconostocs are gram-positive, catalase-negative, non-pathogenic lactic acid bacteria tolerant of acidic media.

The aim of this work is the isolation of strains of *Leuconostoc* producing antibacterial substances against pathogenic bacteria (*Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus thermophilus*, *Echerichia.coli*) and the study of this nature.

This work allowed us to isolate 10 lactic strains (LB1, LB2, LB10, LB12, LB13, LB15, LB16, LB18, LB21, LB23) and we identified them by basic tests until reaching the strains of *Leuconostocs*.

The screening of the *Leuconostocs* strains with the pathogenic strains (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aerogenosa*, *Listeria monocytogene*) gave positive results with a difference in the diameters of inhibition for the isolates even after the different treatments carried out on the isolates. Supernatant of *Leuconostocs*, the secret substances in these supernatants contain "bacteriocin" proteins.

The physicochemical characterization of the substances produced in the isolated strains, selected antagonists (LB1, LB2, LB10, LB12, LB13, LB15, LB16, LB18, LB21, and LB23).

The study of the monitoring of the growth kinetics showed a considerable inhibition of the growth (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aerogenosa*, *Listeria monocytogene*) after the addition of a volume of 4 ml of supernatant of isolated lactic bacteria, selected (LB1). This inhibition is explained by the arrest of the cell cycle of *P. aeruginosa* (unbalanced growth), in comparison with the untreated biomass (balanced growth).

Key words: *Leuconostocs*, pathogenic bacteria, bacteriocin, antimicrobial potency, antagonism test.

ملخص

Leuconostocs هي بكتيريا حمض اللاكتيك موجبة الجرام ، سلبية الكاتلاز ، غير مسببة للأمراض تتحمل الوسائط الحمضية.

الهدف من هذا العمل هو عزل سلالات *Leuconostoc* المنتجة لمواد مضادة للجراثيم ضد البكتيريا المسببة للأمراض (*Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus thermophilus*)

(*Echerichia.coli*) ودراسة هذه الطبيعة.

سمح لنا هذا العمل بعزل 10 سلالات لبنية (LB1 ، LB2 ، LB10 ، LB12 ، LB13 ، LB15 ، LB16 ، LB18 ، LB21 ، LB23) وحددناها من خلال الاختبارات الأساسية حتى الوصول إلى سلالات *Leuconostocs*. تليها تنقية.

أعطى فحص سلالات *Leuconostocs* مع السلالات المسببة للأمراض (*Staphylococcus aureus* ، *Escherichia coli* ، *Pseudomonas aerogenosa* ، *Listeria monocytogene*) ، نتائج إيجابية مع اختلاف أقطار التثبيط للعزلات حتى بعد العلاجات المختلفة التي أجريت على العزلات. المادة الطافية من *Leuconostocs* ، تحتوي المواد السرية في هذه المواد الطافية على بروتينات "جرثومية". كشف التوصيف الفيزيائي الكيميائي للمواد المنتجة في السلالات المعزولة ، والمضادات المختارة (LB1 ، LB2 ، LB10 ، LB12 ، LB13 ، LB15 ، LB16 ، LB18 ، LB21 ، LB23)

أظهرت دراسة مراقبة حركيات النمو تثبيطاً كبيراً للنمو (*Staphylococcus aureus* ، *Escherichia coli* ، *Pseudomonas aerogenosa* ، *Listeria monocytogene*) بعد إضافة حجم 4 مل من المادة الطافية لبكتيريا اللاكتيك المعزولة ، المختارة (LB1). يتم تفسير هذا التثبيط من خلال إيقاف دورة الخلية لـ *P. aeruginosa* (نمو غير متوازن) ، مقارنةً بالكتلة الحيوية غير المعالجة (النمو المتوازن).

الكلمات المفتاحية: *Leuconostocs* ، البكتيريا المسببة للأمراض ، البكتريوسين ، فاعلية مضادات الميكروبات ، اختبار العداء.