

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

Domaine : Sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Microbiologie appliquée

Thème

Etude d'une substance antimicrobienne produite par des
bactéries lactiques autochtones vis-à-vis des bactéries
multirésistantes

Présenté par : BOUAMEUR Nachoua

MOUKAR Sara Nesrine

Soutenu publiquement le : 28/09/2020

Devant le jury:

Melle HAMMOUDI Roukia M.C.A.	Présidente	UKM OUARGLA
Mr BOURICHA M'hamed M.A.A	Encadreur	UKM OUARGLA
Melle DAOUADJI Soumia M.A.A	Co-encadreur	UKM OUARGLA
Mr MOSBAH Said M.C.B	Examineur	UKM OUARGLA

Année universitaire 2019-2020

Remerciements

Au terme de ce travail de mémoire pour l'obtention de master, les mots justes sont difficiles à trouver pour exprimer nos remerciements.

À « Allah », le tout puissant, qui nous a accordés le courage et la patience pour élaborer ce modeste travail.

Nous rendons un vibrant hommage aux membres du jury de ce mémoire qui ont accepté d'évaluer ce travail :

*Nous adressons nos sincères remerciements à **Melle HAMMOUDI Roukia** d'avoir accepté la présidence du jury de notre travail.*

*Un merci particulier à **Mr MOSBAH Said** pour avoir accepté d'examiner et évaluer notre travail.*

*Un très grand merci à notre co-encadreur **Melle DAOUADJI Soumia** pour l'effort fournis, sa gentillesse, ses précieux conseils, sa bienveillance et son soutien tout au long de la réalisation de notre mémoire.*

*Nous tenons à exprimer notre vifs remerciements et notre profondes gratitude à notre encadreur **Mr BOURICHA M'hamed** pour son encadrement, pour ces précieux conseils, son suivi et son disponibilité.*

Nous adressons aussi nos remerciements à tous les ingénieurs du laboratoire de la faculté des sciences de la nature et de la vie pour leurs aides.

A toute personne qui a participé de près ou de loin pour l'accomplissement de ce modeste travail.

Dédicace

A mes parents

En hommage à tous les sacrifices que vous avez consentis pour moi. Je vous remercie pour tous les précieux conseils que vous m'avez donnés.

Grace à votre présence constante à mes côtés, j'ai pu forger ma personnalité, pousser mes ambitions encore plus loin, et encore merci d'avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

Aucune dédicace, ne saurait exprimer réellement mon profond amour, mon respect et ma vive gratitude. Que le Tout Puissant vous donne longue vie et vous protège pour moi.

Veillez trouver dans ce travail le fruit de vos sacrifices, et j'espère être à la hauteur de vos espérances et votre fierté.

A mon frère, mes sœurs, mon neveu et mes nièces, je dédie ce travail dont le grand plaisir leurs revient en premier lieu pour leurs conseils, aides, et encouragements.

Nachoua

Dédicace

A Allah, Tout puissant Qui m'a inspiré, Qui m'a guidé dans le bon chemin. Louanges et remerciements pour votre clémence et miséricorde.

*A ma très chère mère **Fatima**, je ne saurais pas comment exprimer mon grand chagrin en ton absence. J'aurais aimé que tu sois à mes côtés à ce jour, que ce travail soit une prière pour le repos de ton âme.*

*A mon très cher Grand-père **Abdelhamid***

*A mon très cher père **Mohammed***

*A mes très chères tantes **Amel et Ilhem***

*A mon très cher fiancé **Benseghier Rafik***

Par vos sacrifices et vos bons soins, vous m'avez donné le courage pour affronter tous les obstacles et supporter toutes les difficultés. Nulle dédicace ne pourrait refléter ma profonde reconnaissance. Je vous dois tout, puisse dieu vous préserver et vous accorder, santé et bonheur.

*A mes chers oncles : **Riad, Liesse, Khaled et Walid***

J'espère que ce travail sera le témoignage de mon amour profond et mon respect.

A mes chères sœurs et mes frères

*A toute la famille **MOUKAR***



Sara Nesrine

Résumé

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

L'étude des interactions de 33 souches lactiques isolées à partir d'un fromage traditionnel, lait de vache et de chèvre ; a révélé une activité antimicrobienne vis-à-vis des bactéries multirésistantes (*StaphylococcusSp107*, *EscherichiaSp19*, *KlebsiellaSp23*, *SerratiaSp29*, *MorganellaSp30Z* et *ProteusSp29*). L'effet antagonique a été évalué par la technique de diffusion sur gélose (méthode de double gélose) par la production de bactériocine remarquée par l'apparition des zones d'inhibition.

Selon la caractérisation physico-chimique réalisée par Zergoune, 2019 : les substances antimicrobiennes étudiées présentent une forte thermorésistance. Ces substances sont entièrement détruites sous l'action des enzymes protéolytiques. Ces propriétés suggèrent que cette bactériocine appartient à la classe II. La cinétique de croissance des bactéries multirésistantes en présence et en absence de la bactériocine produite par (*Lactococcus raffinolactis* et *Leuconostoc cremoris*) a montré que la biomasse bactérienne a diminué progressivement après l'ajout des bactériocines.

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

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

Abstract

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

The study of the interactions of 33 lactic acid strains isolated from traditional cheese, cow's milk and goat's milk; revealed antimicrobial activity against multidrug resistant bacteria (*StaphylococcusSp107*, *EscherechiaSp19*, *KlebseillaSp23*, *SerratiaSp29*, *MorganellaSp30Z*, and *ProteusSp29*). The antagonistic effect was evaluated by the agar diffusion technique (double agar method) by the production of bacteriocin noticed by the appearance of zones of inhibition.

According to the physicochemical characterization carried out by Zergoune, 2019: the antimicrobial substances studied exhibit high thermoresistance. These substances are completely destroyed by the action of proteolytic enzymes. These properties suggest that this bacteriocin belongs to class II. The growth kinetics of BMRs in the presence and absence of the bacteriocin produced by (*Lactococcus raffinolactis* and *Leuconostoc cremoris*) showed that the bacterial biomass gradually decreased after the addition of bacteriocins.

The results of this study allowed us to indicate that these lactic acid strains are satisfactory for medical use with regard to multidrug resistant bacteria because they have good antimicrobial power.

Keywords : lactic acid bacteria, inhibitory substances, bacteriocin, multidrug resistant bacteria, antimicrobial activity.

الملخص

في السنوات الأخيرة ، لوحظ اهتمام متزايد باستخدام بكتيريا حمض اللبن لخصائصها البروبيوتيك والمضادة للميكروبات. الهدف من هذا العمل هو اختيار بكتيريا حمض اللبن المنتجة للمواد المضادة للميكروبات.

دراسة تفاعلات 33 سلالة من بكتيريا حمض اللبن معزولة من الجبن التقليدي وحليب البقر وحليب الماعز ؛ أظهرت نشاطاً مضاداً للميكروبات ضد البكتيريا المتعددة المقاومة (*StaphylococcusSp107*, *EscherechiaSp19*, *KlebseillaSp23* *SerratiaSp29*, *MorganellaSp30Z*, *ProteusSp29*)

تم تقييم التأثير المضاد بتقنية انتشار الأجار (طريقة الأجار المزدوج) عن طريق إنتاج *bactériocines* التي لوحظت من خلال ظهور مناطق التثبيط.

وفقاً للتوصيف الفيزيائي والكيميائي الذي أجرته (زرقون، 2019) : أظهرت المواد المضادة للميكروبات التي تمت دراستها مقاومة عالية للحرارة. يتم تدمير هذه المواد تماماً بفعل عمل الإنزيمات المحللة للبروتين. تشير هذه الخصائص إلى أن هذه *bactériocine* تنتمي إلى الفئة الثانية. أظهرت حركيات نمو البكتيريا المتعددة المقاومة في وجود و غياب *bactériocine* التي تنتجها *Lactococcus raffinolactis* و *Leuconostoc cremoris* أن الكتلة الحيوية البكتيرية انخفضت تدريجياً بعد إضافة *bactériocine*.

سمحت لنا نتائج هذه الدراسة بالإشارة إلى أن سلالات بكتيريا حمض اللبن هذه مناسبة للاستخدام الطبي فيما يتعلق بالبكتيريا المتعددة المقاومة لأنها تمتلك قوة جيدة مضادة للميكروبات.

الكلمات المفتاحية : بكتيريا حمض اللبن ، المواد المثبطة ، *bactériocine* ، بكتيريا متعددة المقاومة ، نشاط مضاد للميكروبات.

Table de matières

Remerciements

Dédicaces

Résumés

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des photos

Liste des tableaux

Introduction 01

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Bactéries lactiques

I.1. Historique et généralités	02
I.2. Caractéristiques	02
I.3.Habitat.....	02
I.4.Taxonomie	02
I.4.1. Principaux genres de bactéries lactiques	03
I.4.1.1. Genre <i>Lactobacillus</i>	03
I.4.1.2. Genre <i>Lactococcus</i>	03
I.4.1.3. Genre <i>Streptococcus</i>	04
I. 4.1.4. Genre <i>Bifidobacterium</i>	04
I.4.1.5. Genre <i>Leuconostoc</i>	05
I.5.Caractères biotechnologique.....	05
I.5.1.Dans le domaine alimentaire.....	05
I.5.2.Dans le domaine thérapeutique.....	06
I.5.3.Probiotiques.....	06
I.6.Substances antimicrobiennes	07
I.6.1. Acides organiques	07

I.6.2. Peroxyde d'hydrogène	07
I.6.3. Dioxyde de carbone	07
I.6.4. Diacétyl	08
I.6.5. Reutérine	08
I.6.6. Bactériocines.....	08

Chapitre II : Bactériocines

II.1. Définition	09
II.2. Classification	09
II.2.1. Bactériocine de classe I	09
II.2.2. Bactériocine de classe II	10
II.2.2.1. Sous-classe IIa.....	11
II.2.2.2. Sous-classe IIb.....	11
II.2.2.3. Sous-classe IIc.....	11
II.2.3. Bactériocine de classe III	11
II.2.4. Bactériocine de classe IV	12
II.3. Mécanisme d'action.....	12
II.4. Méthodes de purification.....	14
II.5. Application médicale	16
II.6. Possibilité d'utilisation des BL dans le domaine médicale	17

Chapitre III : Résistances bactérienne aux antibiotiques

III.1. Antibiotiques.....	19
III.1.1. Définition	19
III.1.2. Classification.....	19
III.1.2.1. Principales familles des antibiotiques	20
III.1.3. Mode d'action.....	21
III.2. Résistance bactérienne aux antibiotiques	23
III.2.1. Définition	23
III.2.2. Types de la résistance	23
III.2.2.1. Résistance naturelle	24
III.2.2.2. Résistance acquise.....	24

III.2.2.2. Mécanismes de la résistance acquise.....	24
III.2.2.2. Mécanismes génétiques de la résistance acquise	24
III.2.2.2. Mécanismes biochimiques de la résistance acquise	25

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

I. Matériels et méthodes	27
I.1. Revivification et purification des bactéries lactiques	29
I.2. Revivification des bactéries pathogènes	29
I.3. Détermination de la substance antimicrobienne produite par les bactéries lactiques	29
I.3.1. Méthode directe de double couche (méthode de Fleming <i>et al.</i> , 1975)	29
I.3.2. Méthode de détection indirecte / Méthode des puits (Barefoot et Klaenhammer, 1983)	31
I.3.2.1. Précipitation des protéines	32
I.3.2.1.A. Précipitation avec le sulfate d'ammonium	32
I.3.2.1.B. Précipitation par l'éthanol	32
I.4. Cinétique de croissance en présence et en absence de surnageant	33

Résultats et discussion

II. Résultats et discussion	35
II.1. Revivification des bactéries lactiques	35
II.2. Revivification des bactéries pathogènes	35
II.3. Détermination de la substance antimicrobienne produite par les bactéries lactiques	35
II.3.1. Méthode directe de double couche (méthode de Fleming <i>et al.</i> , 1975)	35

II.3.2. Méthode de détection indirecte / Méthode des puits (Barefoot et Klaenhammer, 1983)	40
II.3.2.1. Précipitation des protéines	42
II.4. Cinétique de croissance en présence et en absence de surnageant	43
Conclusion et perspectives	45
Références bibliographiques	
Annexes	

Liste des abréviations

°C: Degré Celsius

µg : micro gramme

µl : micro litre

ADN: Acide désoxyribonucléique

ARN: Acide Ribonucléique

ATP : Adinosine triphosphate

BL/LAB : Bactéries Lactiques/Lactic Acid Bacteria

BMR : Bactérie multirésistante

BN : Bouillon nutritif

CA-SFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

CO₂ : dioxyde de carbone

Do : Densité optique

EPS: exopolysaccharides

ERV : Entérocoque Vancomycine Résistant

EtOH : éthanol

FAO : Food and Agriculture Organization

FPM : Force Proton Motrice

g : gramme

G+C : Le ratio guanine+ cytosine /Coefficient de Chargaff

GN : gélose nutritive

GRAS : Generally recognized as safe

H : heure

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

KDa: kilo dalton

mg : milli gramme

MH : Muller-Hinton

min : minutes

ml : milli litre

mm : Millimètre

MRS : Mayeux, Sandine et Elliker

NaOH : hydroxyde de sodium

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

pH : potentiel Hydrogène

PLP : Protéines liant les pénicillines

ppm : Partie Par Million

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la métilcilline

sp: espèce

ssp/ subsp : sous-espèce

Zi : Zone d'inhibition

Liste des figures

Titre	Page
Figure 01 : Séquence et structure de lantibiotiques de type A (Nisine), B (Mersacidine) et d'un lantibiotique « two-peptides » (Lacticine 3147 A1 et A2) — Sequence and structure of a type A lantibiotic (Nisin), a type B lantibiotic (Mersacidin) and a « two-peptides » lantibiotic (Lacticin 3147 A1 and A2) (Nigutova et al., 2007)	10
Figure 02 : Différents modèles proposés pour la formation de pore par la nisine. A : le modèle "douves de tonneau" (Brogden, 2005) ; B : le modèle "wedge" (Driessen et al., 1995) ; C : interaction avec le lipide II (Breukink et al., 1999).	13
Figure 03 : Mécanisme d'action des bactériocines de classe IIa (Kjos et al., 2011).	13
Figure 04 : Effet de l'extrait cellulaire (CE) et de la fraction extracellulaire (FEC) d' <i>Enterococcus faecium</i> (B13) sur les souches de <i>H. pylori</i> par la méthode de diffusion sur gélose: A:TN2GF4, B: J99 C: HSA3068, D: 26695. (Guetarni, 2018).	18
Figure 05 : Mode d'action des antibiotiques sur une bactérie (Afssa, 2006)	23
Figure 06 : Les principaux mécanismes d'échange d'ADN entre les bactéries (Carroll et al., 2013)	25
Figure 07 : Les principaux mécanismes de la résistance aux antibiotiques (Meriah, 2017)	26
Figure 08 : Méthode des spots (Fleming et al., 1975)	30
Figure 09 : Méthode de puits (Barefoot et Klaenhammer, 1983)	33
Figure 10 : Cinétique de croissance de <i>Staphylococcus aureus</i> en fonction du temps, en présence et en absence de surnagent (SS : sans l'ajout de surnageant, 86 : en présence de surnageant de la souche lactique S86, 14 : en présence de surnageant de la souche lactique S14). (Zergoune, 2019)	44

Liste des photos

Titre	Page
Photo 01 : Test de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques à l'égard de <i>SerratiaSp29</i> , Méthode de spot (FLEMING et al., 1975)	35
Photo 02 : Test de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques à l'égard de <i>StaphylococcusSp107</i> , Méthode de spot (FLEMING et al., 1975)	36
Photo 03 : Test de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques à l'égard de <i>EscherechiaSp19</i> , Méthode de spot (FLEMING et al., 1975)	36
Photo 04 : Test de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques à l'égard de <i>klebsiellaSp23</i> , Méthode de spot (FLEMING et al., 1975)	36
Photo 05 : Test de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques à l'égard de <i>MorganellaSp30z</i> , Méthode de spot (FLEMING et al., 1975)	37
Photo 06 : Test de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques à l'égard de <i>ProteusSp29</i> , Méthode de spot (FLEMING et al., 1975)	37
Photo 07 : Activité antibactérienne de <i>Leuconostoc cremoris</i> vis-à-vis E. coli, Par méthode de diffusion (puits) (Zergoune, 2019)	40
Photo 08 : Activité antibactérienne de <i>Lactococcus raffinolactis</i> vis-à-vis d' <i>Enterococcus faecalis</i> , Par méthode de diffusion (puits) (Zergoune, 2019)	40
Photo 09 : Activité antibactérienne de <i>Lactococcus raffinolactis</i> vis-à-vis <i>Bacillus subtilitus</i> , Par méthode de diffusion (puits) (Zergoune, 2019)	41
Photo 10 : Activité antibactérienne de bactéries lactiques vis-à-vis <i>S. aureus</i> , Par la méthode de precipitation (Zergoune, 2019)	43

Liste des tableaux

Titre	Page
Tableau 01 : Les espèces des bactéries lactiques utilisées comme des souches tests	27
Tableau 02 : l'action des souches lactiques sur les souches multirésistantes	38
Tableau 03 : Résultat de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques vis-à-vis <i>E.coli</i> , <i>E.faecalis</i> , <i>Bacillus Sublitus</i> . (Zergoune, 2019)	41

Introduction

Introduction

Depuis l'antiquité, les bactéries lactiques ont été utilisées pour la fabrication et la conservation des aliments. La découverte de leur action sur le lait fut probablement accidentelle mais leur utilisation fut perpétuée sous forme de levains naturels (**Chammas et al., 2006**).

Les bactéries lactiques sont un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme. Elles colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, la viande, les végétaux et les céréales et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale. Elles sont impliquées dans un grand nombre de fermentations spontanées de produits alimentaires (**Stiles et al., 1997**). Elles sont principalement utilisées en tant que starter dans les produits alimentaires fermentés où elles permettent de développer certaines caractéristiques organoleptiques et d'augmenter la durée de conservation (**Abee, 1995**).

Les bactéries lactiques assurent non seulement des caractéristiques particulières d'arômes et de texture mais aussi une bonne sécurité sanitaire alimentaire. Elles sont connues pour leur capacité à produire lors de leur croissance des composés actifs (substances inhibitrices) (**Klaenhammer, 1988**).

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

Les bactéries pathogènes sont à l'origine de diverses pathologies et intoxication alimentaires, c'est pourquoi les antibiotiques ont été utilisés pour les éliminer. Ceci a conduit à l'émergence du phénomène d'antibiorésistance menaçant la santé publique. Pour faire face à ce problème les études sont actuellement orientées vers la recherche de substances naturelles entre autres les bactériocines des bactéries lactiques (**Ababsa, 2012**).

L'objectif de ce travail consiste à étudier l'activité antibactérienne de certaines souches de bactéries lactiques autochtones à l'égard de quelques bactéries multirésistantes. Pour ce faire, on a articulé ce travail autour de quatre parties. La première consacrée à un rappel sur les bactéries lactiques. Dans la seconde partie, un rappel sur les bactériocines. La résistance bactérienne fait l'objet de la troisième partie, suivie à une partie expérimentale par l'utilisation de protocoles simples et réalisables afin de pouvoir obtenir les résultats nécessaires pour cette étude.

Synthèse

bibliographique

Chapitre I-

Les bactéries

lactiques

I. Bactéries lactiques

I.1. Historique et Généralités

Les bactéries lactiques sont décrites pour la première fois par Orla Jenson au début du vingtième siècle. Elles sont des microorganismes utiles à l'homme lui participant à l'élaboration de nombreux produits alimentaires fermentés. Elles jouent plusieurs rôles relatifs aux caractéristiques organoleptiques, nutritionnelles et sanitaires de l'aliment (**Pilet et al., 1998**).

Les bactéries lactiques sont considérées comme non pathogènes et se voient attribuer le qualificatif anglo-saxon d'organismes GRAS (Generally Regarded As Safe) (**Adams et Marteau, 1995 ; Aguirre et Collins, 1993**). Cependant, quelques membres du genre *Streptococcus* et *Enterococcus* ainsi que d'autres bactéries lactiques sont considérées comme pathogènes opportunistes (**Aguirre et Collins, 1993**).

I.2. Caractéristiques

Les bactéries lactiques sont un groupe de bacille ou coccobacille à Gram-positif qui ont moins de 55 % de contenu G+C dans leur ADN (à l'exception des *Bifidobacterium*). Elles sont asporulées, généralement non mobiles, anaérobies mais aéro-tolérantes (**Dellaglio et al., 1994 ; Ganzalez et al., 2000**). Elles ne possèdent pas de catalase (certaines souches possèdent une pseudocatalase), ni de nitrate réductase, ni de cytochrome oxydase. Elles ont des exigences nutritionnelles nombreuses (acides aminés, peptides, sels, acides gras et glucides) (**Holzappel et al., 2001**).

I.3. Habitat

Les bactéries lactiques sont ubiquistes, elles ont pour habitat de nombreux milieux naturels. Elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples. Elles peuvent être isolées du lait, du fromage, de la viande et des végétaux (plantes et fruits) (**König et Fröhlich, 2009**). Elles se développent avec la levure dans le vin, la bière et le pain. Quelques espèces colonisent le tube digestif et on peut les trouver aussi dans les cavités buccales, vaginales et dans les fèces (**Leveau et Bouix, 1993 ; Hassen et Frank, 2001**).

I.4. Taxonomie

Selon la dernière édition de Bergey's manual of systematic bacteriology (2009), les bactéries lactiques sont classées dans le phylum des Firmicutes, la Classe des Bacilli et l'ordre des Lactobacillales renfermant trente-cinq genres répartis sur six familles. Parmi

Chapitre I : les bactéries lactiques

ces genres , seulement treize sont utilisés dans la biotechnologie alimentaire, il s'agit de : *Aerococcus* , *Carnobacterium* , *Enterococcus* , *Lactobacillus* , *Lactococcus* , *Leuconostoc* , *Oenococcus* , *Pediococcus* , *Streptococcus* , *Vagococcus* , *Tetragenococcus* , *Weissella* (Drider et Privost, 2009) et *Bifidobacterium* (Leveau et Bouix, 1993).

I.4.1.Principaux genres des bactéries lactiques

I.4.1.1. Genre *lactobacillus*

Les *lactobacilles* sont des bactéries lactiques ubiquitaires qui colonisent beaucoup d'habitats. Ce sont des bactéries Gram+ asporulées, immobiles, en forme bacille isolé ou groupées en paires ou en chaînette. Elles forment des colonies de petites tailles, lisses, brillantes non pigmentées et souvent opaques. Ce sont des anaérobies facultatifs ayant un pH optimum de croissance de 5,5 avec une température optimale de croissance comprise entre 30 et 40°C (Hammes *et al.*, 2009). Les lactobacilles ont un métabolisme énergétique saccharolytique où le lactate est l'acide organique majoritaire (De Vuyst *et al.* ,1994). Les *Lactobacillus* sont très exigeantes en matière nutritive (Euze'by, 1997).

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

I.4.1.2. Genre *Lactococcus*

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

Ce sont des coques présentent en chaînette, thermosensibles, homofermentaires produisant que de l'acide lactique L(+) (Dellaglio *et al.*, 1994). Elles se caractérisent par la production de diacétyle à partir du citrate (citrate+), certaines espèces utilisent l'arginine (ARG+) (Guiraud, 2003)

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

I.4.1.3. Genre *Streptococcus*

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

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

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

Streptococcus thermophilus étant connue comme une espèce type, une bactérie alimentaire (**Delorme et al., 2010**). Les *Streptococcus thermophilus* sont des bactéries lactiques à grande importance dans les industries laitières précisément dans la fabrication de yaourt et du fromage en collaboration avec d'autres espèces des bactéries lactiques : *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* (**Hols et al., 2005**).

I.4.1.4. Genre *Bifidobacterium*

Le genre *Bifidobacterium* est considéré comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques grâce à la similarité de ses propriétés physiologiques et biochimiques et à sa présence dans le même habitat écologique, tel que le tube gastro intestinal (**Pilet et al., 2005**). C'est le genre le plus connu et le mieux étudié dans l'ordre des bifidobactériales. Les *Bifidobacterium* se sont des bâtonnets, Gram positives, asporulées, immobiles, ont des formes variées (incurvées, rarement ramifiées) celles de formes bâtonnets peuvent généralement être isolées ou en amas et en paires ou en forme de V (**Lansing et al., 2003**). Les *Bifidobacterium* sont anaérobies (**Lansing et al., 2003**), saccharolytiques (**Scardovi, 1986**), fermentent les glucides en donnant de l'acide acétique et l'acide lactique sans production de dioxyde de carbone (**Lansing et al., 2003**). Pas de production d'ammoniaque ou de H₂S à partir des acides aminés et elles ne réduisent pas les nitrites nitrates.

Le métabolisme des hydrates de carbone par des *bifidobactéries* est différente de bactéries homofermentaires et hétérofermentaires. En effet, le fructose-6-phosphocétolase, une

enzyme typique du genre *Bifidobacterium*, est responsable de la dégradation du glucose. La détermination de cette enzyme est un test crucial pour l'identification de ces micro-organismes (Shah, 2000).

I.4.1.5. Genre *Leuconostoc*

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

Le développement des *Leuconostoc* entraîne souvent l'apparition d'une viscosité dans le milieu grâce à la production des exopolysaccharides. Les *leuconostoc* principalement *Ln. Mesenteroides ssp. Cremoris* et *Ln. Lactis* sont utilisés en association avec les *lactocoques* dans l'industrie laitière pour produire en plus de l'acide lactique et le CO₂, des substances aromatiques telles que le diacétyle et l'acétoïne à partir des citrates du lait (Hassan et Frank, 2001 ; Guiraud, 2003).

I.5. Caractères biotechnologiques

I.5.1. Dans le domaine alimentaire

Du point de vue de leurs caractéristiques physiologiques, les bactéries lactiques sont utilisées dans l'industrie alimentaire et génèrent un ensemble de propriétés, résumé, selon Monnet *et al.*, (2008) comme suit :

- Production d'acide lactique à partir du glucose, ce qui entraîne une acidification qui, selon le produit considéré, a de nombreuses répercussions : coagulation du lait, synérèse des caillés fromagères, saveur acide, inhibition des flores d'altération.
- Génération d'un large éventail de composés d'arômes qui contribuent à l'établissement des propriétés organoleptiques.
- Production d'exopolysaccharides qui agissent comme des agents de texture et sont particulièrement recherchés dans l'industrie alimentaire.
- Production de CO₂ contribuant à la formation d'ouvertures dans les fromages et au caractère pétillant des aliments fermentés.

I.5.2. Dans le domaine thérapeutique

L'intérêt des bactéries lactiques en matière de santé humaine a été initialement proposé au début du XX^{ème} siècle, en 1907 par le Russe Metchnikoff, selon lui les *Lactobacillus.sp* pouvaient réduire la putréfaction intestinale en modifiant sa flore. Le rôle des bactéries lactiques sur la santé était dans le cadre des probiotiques. Les bienfaits des bactéries lactiques sont de plus en plus étudiés, certains sont bien établis d'autres restent encore contre versés (**Langella et al., 2001 ; Calvez et al., 2009**).

L'extraordinaire diversité de structures des exopolysaccharides en fait une classe de molécules dont les applications directes ou indirectes dans le domaine médical sont en plein essor. Le dextrane et ses dérivés sont utilisés en laboratoire pour la purification de composés d'intérêt médical comme certaines enzymes, mais aussi comme outil thérapeutique en tant que « plasma artificiel ». Ils peuvent servir pour l'encapsulation de médicaments dans le but d'un relargage contrôlé ou en exploitation des propriétés biologiques de ces polymères. La préparation de vaccins à partir d'EPS évite l'utilisation d'extrait cellulaires et donc les effets secondaires provoqués par les métabolites tels que les lipopolysaccharides et les protéines (**Benasla, 2012**).

Il a été montré qu'un certain nombre d'exopolysaccharides possédaient des activités biologiques innovantes comparables à celles des héparinomimétiques, propriétés antitumorales ou antivirales par exemple. L'extrême diversité des EPS a rendu possible l'identification d'homologies de structures avec des polysaccharides provenant de cellules eucaryotes. Ces analogues structuraux pourront être utilisés en substitut ou en complément des produits naturels (**Benasla, 2012**).

I.5.3. Probiotiques

Il est actuellement accepté la définition formulée pour les probiotiques " des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates confèrent un avantage pour la santé de l'hôte." (**FAO, 2001 ; Lee, 2009**).

Pour qu'un micro-organisme soit considéré comme étant potentiellement probiotique, il doit présenter les caractéristiques suivantes (**Isolauri et Salminen, 2004**) :

- être un hôte naturel de l'intestin.
- être capable de persister dans le milieu intestinal.
- adhérer aux cellules épithéliales intestinales et exclure ou réduire l'adhérence des pathogènes.

Chapitre I : les bactéries lactiques

- avoir un métabolisme actif et produire des substances inhibant les pathogènes (acides, H₂O₂, bactériocines...).
- être non invasif, non carcinogène et non pathogène.
- être capable de co-agrégation pour former une flore normale équilibrée.
- survivre aux différents procédés technologiques de production.
- demeurer vivant dans la préparation alimentaire.

Plusieurs genres de bactéries lactiques sont utilisés comme probiotique. Les plus couramment rencontrés sont les *Lactobacillus* (*acidophilus* ou *bulgaricus*), *Streptococcus* (*latis* ou *faecium*), *Bifidobacterium* (**Giovanna et al., 2016**).

I.6. Substances antimicrobiennes

I.6.1. Les acides organiques

Ils sont excrétés par les bactéries lactiques assurant deux importantes fonctions antimicrobiennes. Sous leur forme indissociée, ils traversent passivement la membrane cytoplasmique et pour de fortes concentrations d'acides, le milieu intracellulaire peut s'acidifier à un point tel que les fonctions cellulaires sont inhibées et le potentiel membranaire est annulé (**Klaenhammer et al., 1994**).

I.6.2. Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Les bactéries lactiques ne produisent pas de catalase à cause de l'absence d'une source hème, cela permet l'accumulation du peroxyde d'hydrogène, mais pas dans des quantités significatives, parce qu'il est quand même décomposé par des peroxydases et pseudocatalases. Son effet bactéricide a été attribué à son pouvoir oxydant (**Salminen et al., 1998**). En effet, **Juven et Pierson (1996)** ont démontrés son effet cytotoxique sur la cellule bactérienne qui génère des espèces hautement toxiques, telles que le radical hydroxyle qui est à la base de l'oxydation des biomolécules (**Taylor, 2005**). De plus certaines réactions produisant H₂O₂ font disparaître l'oxygène, créant un environnement anaérobie non favorable à certains micro-organismes (**Salminen et al., 1998**).

I.6.3. Le dioxyde de carbone

Le dioxyde de carbone est produit principalement par les bactéries lactiques hétérofermentaires. Il peut jouer un rôle en créant un environnement anaérobie qui inhibe les décarboxylations enzymatiques, et l'accumulation de CO₂ dans la bicouche lipidique de la membrane peuvent provoquer un dysfonctionnement de la perméabilité (**Ammor et al., 2006**). Le CO₂ peut effectivement inhiber la croissance de micro-organismes colonisant de

nombreux produits alimentaires, notamment des bactéries psychrotrophes Gram-négatives (Farber, 1991).

I.6.4. Le diacétyl

Le diacétyl est un composant aromatique essentiel du beurre et de quelques autres produits laitiers fermentés. Il est produit par des souches de *Lc. Lactis* subsp. *Lactis* biovar. *Diacetylactis* par la fermentation du citrate (Mathotet *et al.*, 1996).

Les concentrations nécessaires à l'obtention d'une inhibition sont de l'ordre de 100 ppm, et sont supérieures à celles présentes dans le beurre et susceptibles de provoquer son arôme (2 à 7 ppm) (Caplice et Fitzgerald, 1999).

I.6.5. Reutéline

Axelsson *et al.*, (1989) ont mis en évidence l'action inhibitrice d'une substance produite par *Lactobacillus reuteri*. Cette substance (reutéline) a été purifiée et identifiée. La reutéline (ou 3-hydroxypropionaldehyde) est une substance antimicrobienne qui est produite comme métabolite intermédiaire pendant la fermentation anaérobique du glycérol. La reutéline a un large spectre d'activité. Elle a une action contre les procaryotes (Gram-positif ou Gram-négatif), les eucaryotes, les virus, les champignons et les protozoaires. Elle interfère avec la réplication de l'ADN. Elle a des applications aussi bien dans le domaine médical que dans le domaine alimentaire (Vollenweider, 2004).

I.6.6. Les bactériocines

Différentes définitions des bactériocines ont été données au cours du temps. Cependant, la définition qui reste la plus largement acceptée est celle de Klaenhammer (1988) qui définit les bactériocines comme des protéines, ou complexes de protéines, avec une activité bactéricide contre des espèces proches de la souche productrice. Les bactériocines représentent une large classe de substances antagonistes qui varient considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leur spectre d'action et de leur mode d'action (Klaenhammer, 1988).

Chapitre II-
Les bactériocines

II. Bactériocines

II.1. Définition

Les bactériocines sont des peptides avec une activité bactéricide contre les espèces proches de la souche productrice. Elles 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**).

La première découverte des bactériocines a été signalée il y a presque un siècle, lorsque **Gratia (1925)** a démontré l'inhibition de souches d'*Escherichia coli* S par une substance thermostable provenant d'une culture d'*E. coli* V. Ces substances inhibitrices ont été appelées colicines en références à l'espèce productrice (**Frederiq, 1946**). L'inhibition de la croissance de différentes bactéries lactiques par un métabolite produit par *S. lactis*, aujourd'hui classifié comme *L. lactis* (**McAuliffe et al., 2001**), est à la base de la découverte de la première bactériocine produite par une bactérie lactique, et ceci en 1928 (**Rogers, 1928**). Celle-ci a été décrite par Whitehead cinq ans plus tard et en 1947, elle a été nommée nisine (**Mattick & Hirsch, 1947**). En 1951, d'autres travaux ont prouvé qu'au cours de l'affinage d'un fromage, les clostridies étaient inhibées par la nisine (**Hirsch et al., 1951**). C'est à partir de cette date que l'usage des bactériocines a été recommandé dans la lutte contre les contaminations alimentaires. Selon **Klaenhammer (1988)**, 99% des espèces bactériennes peuvent produire au moins une bactériocine.

II.2. Classification des bactériocines

Les bactériocines sont classées sur la base de leur structure primaire, leur poids moléculaire, leur modification post traductionnelle ou non et leurs caractéristiques génétiques. Plusieurs classifications ont été proposées pour les bactériocines, selon **Liu et al., (2014)**, les bactériocines sont divisées en trois classes : les lantibiotiques, les non-lantibiotiques thermostables et les non lantibiotiques thermolabiles et large molécules, d'autres classifications regroupent les bactériocines en quatre classes (**Nes et al., 1996**).

II.2.1. Bactériocine de classe I :

Les bactériocines de cette classe sont appelées aussi des lantibiotiques, elles subissent une modification post-traductionnelle marquée par la formation des acides aminés inhabituels. Il s'agit de la lanthionine et la méthyllanthionine (**parada et al., 2007**)

Chapitre II : les bactériocines

en plus des acides aminés 2,3-didéhydroalanine et (z)-2,3 didéhydrobutyrine. Les gènes de biosynthèse des lantibiotiques sont regroupés et localisés sur le chromosome bactérien ou sur de grands plasmides ou sur des transposons (**Klaenhammer, 1993**).

Le lantibiotique le plus connu est la nisine, un peptide contenant 34 acides aminés produit par de nombreuses espèces de *Lactococcus lactis* et la première bactériocine commercialisée pour la bio-conservation des aliments (Additive E234) (**Delves-Broughton et al., 1996**). Elle est aussi utilisée pour la prévention et le traitement des mammites bovines (**Cao et al., 2007**). Les séquences et structures d'un lantibiotique de chaque type se trouvent à la figure 01.

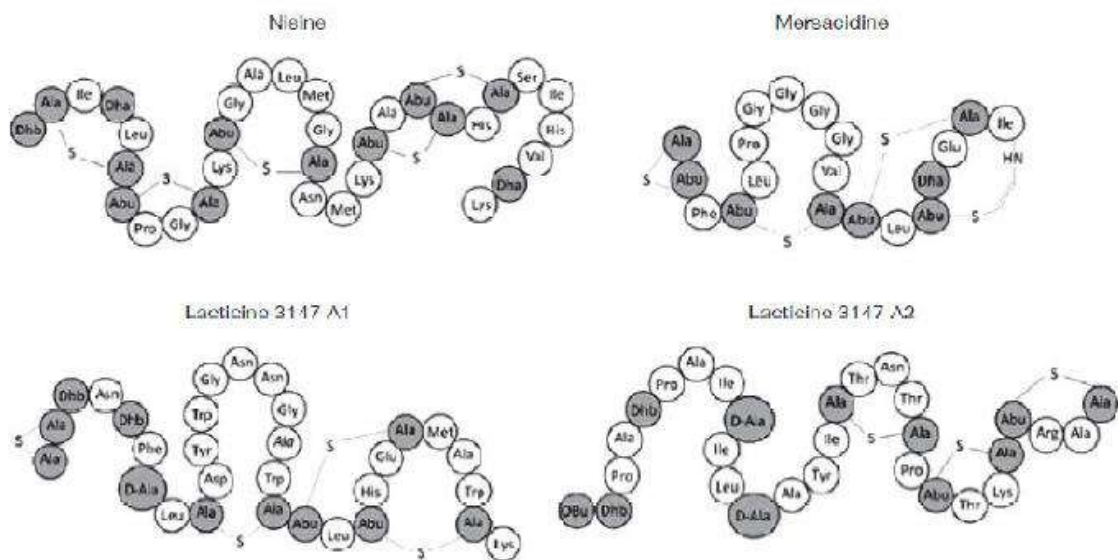


Figure 01 : Séquence et structure de lantibiotiques de type A (Nisine), B (Mersacidine) et d'un lantibiotique « two-peptides » (Lacticine 3147 A1 et A2) — Sequence and structure of a type A lantibiotic (Nisin), a type B lantibiotic (Mersacidin) and a « two-peptides » lantibiotic (Lacticin 3147 A1 and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

II.2.2. Bactériocine de classe II :

Ce sont des petites molécules de poids moléculaire <10 kDa, thermostables, contenant des peptides cationiques non modifiés et des peptides hydrophobes. Cette classe est subdivisée en trois sous-classes, une sous-classe IIa, sous-classe IIb et sous-classe IIc. Tous les gènes sont portés par des plasmides ou chromosomes et parfois sur les deux, ils sont constitués de gène de structure et du gène d'immunité correspondant. Ces gènes peuvent être regroupés avec d'autres gènes de transport de la bactériocine.

Chapitre II : les bactériocines

Tout comme les antibiotiques, la formation du peptide actif nécessite le clivage de la séquence N-terminale suivie par son transport de la cellule. La cible d'action principale est la membrane cytoplasmique, via sa perméabilité et les fuites en cause, sans preuve expérimentale de la présence de récepteur de bactériocine (Nes et Holo, 2000).

II.2.2.1. Sous-classe IIa :

Ce sont des peptides Anti-*Listeria*, ils ont attiré l'attention des chercheurs pour une utilisation comme bio-conservateurs, comme la pédiocine PA1 et la leucocine A (Perez *et al.*, 2014). Près de 50 bactériocines de cette sous classe sont produites par des bactéries isolées à partir des aliments fermentés, des produits laitiers, du saumon fumé et du tube digestif humain (Mokoena, 2017).

II.2.2.2. Sous-classe IIb :

L'activité antimicrobienne des bactériocines de cette sous classe requière la synergie de deux peptides complémentaires, comme la plantaricine A et l'entérocin X (Hu *et al.*, 2010). L'activité de certains peptides de cette sous-classe exhibe une inhibition individuellement, cependant l'ajout du peptide complémentaire améliore l'activité inhibitrice. Les bactériocines de cette sous-classe contiennent des régions, amphiphiles et hydrophobes et sont souvent cationiques. Les gènes qui codent pour les deux peptides complémentaires se situent sur le même opéron (Diep *et al.*, 2009).

II.2.2.3. Sous-classe IIc :

Les bactériocines de cette sous classe possèdent une séquence signal N-terminale de type "sec" et sont sécrétées via la voie générale de sécrétion alors que pour les autres sous-classes, les bactériocines sont biosynthétisées sous forme inactive contenant un peptide leader et un site protéolytique de type double Glycine. Quelques peptides cycliques dont le N et C terminal sont liés de manière covalente font partie de cette sous-classe (Cotter *et al.*, 2005).

II.2.3. Bactériocines de classe III :

Ce sont des protéines de haut poids moléculaire > 30 kDa, thermolabile, comme l'helvéticine J (Parada *et al.*, 2007).

II.2.4. Bactériocines de classe IV :

Constituées de protéines complexes associées à d'autres macromolécules telles que des sucres ou des lipides, ces bactériocines sont reclassées comme des bactériolysines qui sont des polypeptides hydrolytiques ; ramenant la classification des bactériocines à trois classes, basées sur des caractéristiques biochimiques et génétiques (**Güllüce, 2013**).

II.3. Mécanismes d'action

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques, agissent en général par le même mécanisme d'action, en perturbant le fonctionnement de la membrane cytoplasmique (**Nes et al., 2007**).

C'est le mode d'action le plus répandu, surtout chez les bactériocines de la classe II. La première étape est une interaction initiale de la bactériocine avec des récepteurs cellulaires spécifiques (reconnaissance d'une cible), c'est le cas notamment de la mersacidine (**Brotz et al., 1998**) et de la nisine (**Van de Venet et al., 1991**) ou non spécifiques (interactions électrostatiques ou hydrophobes) (**Brogden, 2005**).

Les bactériocines vont par la suite s'adsorber sur la membrane cytoplasmique et la perméabiliser par formation de pores conduisant à la mort de la cellule cible (**Brogden, 2005**).

Ainsi, l'action de la bactériocine se traduit, d'une part par l'augmentation de la perméabilité membranaire, provoquant un déséquilibre ionique et une fuite de phosphate inorganique (**Klaenhammer, 1993**) et d'autre part par une perte de la Force Proton Motrice (FPM) qui implique la dissipation totale du potentiel transmembranaire et du gradient de pH. Cette FPM joue un rôle central dans la synthèse de l'ATP, le transport actif et la mobilité bactérienne (**Nicholls et Ferguson, 1992**).

Chapitre II : les bactériocines

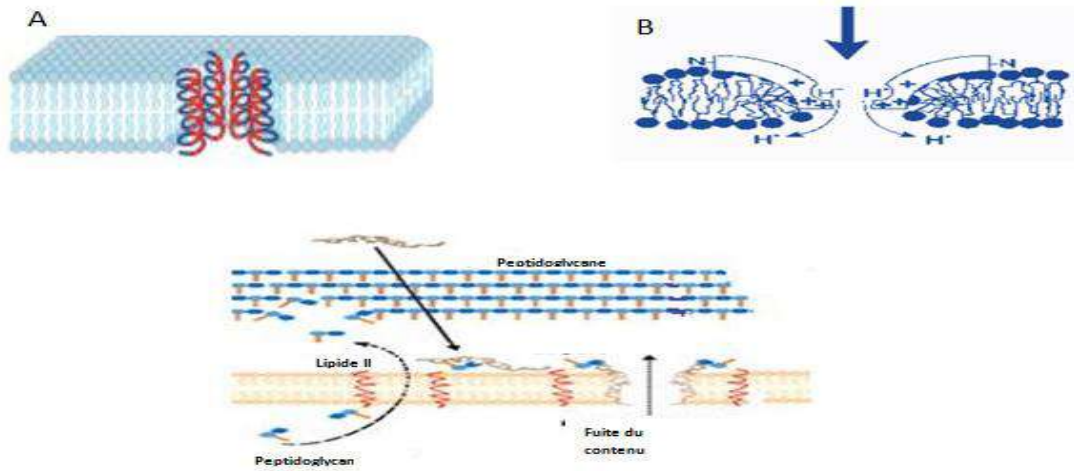


Figure 02 : Différents modèles proposés pour la formation de pore par la nisine. A : le modèle "douve de tonneau" (Brogden, 2005) ; B : le modèle "wedge" (Driessen *et al.*, 1995) ; C : interaction avec le lipide II (Breukink *et al.*, 1999).

D'autres bactériocines ont un autre mode d'action : la perturbation du fonctionnement de la cellule. (Koo *et al.*, 2001) ont montré que la perméabilisation seule de la membrane de *S. aureus* par la gramicidine D et la protamine ne conduisait pas à la mort de la cellule. Différentes cibles peuvent être attaquées, ce qui contribue à perturber le fonctionnement cellulaire. L'épidermine, la mersacidine, ainsi que la nisine (Brotz *et al.*, 1998) se lient au lipide II et inhibent la transglycosylation, étape clé de la biosynthèse de la paroi bactérienne (Brotz *et al.*, 1998). La pédiocine PA-1, une bactériocine de classe IIa, se fixe sur l'unité D du mannose phospho-transférase (enzyme transmembranaire multimérique). Le mécanisme d'action des bactériocines de classe IIa est montré dans la figure ci-dessous :

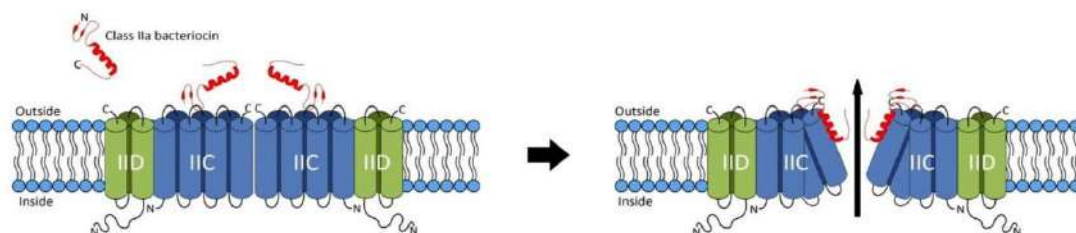


Figure 03 : Mécanisme d'action des bactériocines de classe IIa (Kjos *et al.*, 2011).

D'autres peptides antimicrobiens peuvent inhiber la synthèse des acides nucléiques, comme la pleurocidine et la dermaseptine S1 (Patrzykat *et al.*, 2002), ou inhiber la synthèse protéique ou encore inhiber certaines fonctions enzymatiques (Brogden, 2005).

II.4. Méthodes de purification des bactériocines :

Vu le rendement relativement faible de bactériocines dans les cultures de bactéries lactiques, il est recommandé d'utiliser de grands volumes de milieu de culture quant à leur purification. L'extrait de bactériocines obtenu doit être d'abord concentré. De plus, la production de certaines bactériocines ne peut être détectée qu'en milieu solide, leur récupération se fait alors par élution à partir de l'agar (**Tagg et al., 1976**).

La purification des bactériocines de bactéries lactiques est une tâche particulièrement difficile (**Muriana et al., 1991 ; Carolissen-Mackay et al., 1997**). Les problèmes rencontrés sont tout d'abord liés au fait que les molécules à purifier sont sécrétées dans un milieu de culture complexe comme le milieu MRS contenant 20 g.L⁻¹ de peptides. Pour cette raison, des auteurs ont eu recours à des milieux chimiquement définis (**Hécharde et al., 1992**). D'autres bactériocines ont tendance à s'associer entre elles ou avec d'autres espèces moléculaires. Dans ce cas, il est nécessaire d'utiliser des agents dissociants tels que l'urée ou le dodécylsulfate de sodium (**Joerger et al., 1986 ; Muriana et al., 1991**). De plus, des pertes importantes d'activité sont souvent observées pendant la purification (**Rammelsberg et al., 1990 ; Henderson et al., 1992**). Ces pertes peuvent être dues à des phénomènes d'adsorption irréversible des bactériocines sur des supports non spécifiques tels que les membranes de filtration, les supports de chromatographie ou le matériel standard de laboratoire. Dans ce cas, l'utilisation de matériels siliconés est préconisée. La perte d'activité peut être due à la dégradation des peptides d'intérêt par des protéases présentes dans l'extrait brut ; il est donc préférable de pasteuriser les préparations contenant les bactériocines, en général thermostables (**Piard et al., 1992**).

Dans la plupart des cas, la purification des bactériocines se déroule en deux étapes. La première consiste en une pré-purification par précipitation des protéines par du sulfate d'ammonium, par acidification ou encore par partition différentielle dans des solvants organiques. Lors d'une deuxième étape, les protéines précipitées sont solubilisées et purifiées par une succession de techniques plus fines incluant des chromatographies d'exclusion de taille (tamisage moléculaire), d'échanges d'ions, d'interactions hydrophobes et liquides hautes performances en phase inverse (RP-HPLC) (**Jack et al., 1995 ; Jack et al., 1996 ; Parente et al., 1999**). Les chromatographies d'échanges de cations ou d'interactions hydrophobes sont souvent plus efficaces de par la nature cationique et hydrophobe des bactériocines (**De Vuyst et al., 1992 ; Parente et al., 1999 ; De Vuyst et al., 2007**). Cependant, il n'existe pas de généralités et les techniques de purification utilisées sont nombreuses et variées.

Chapitre II : les bactériocines

Un protocole commun a cependant pu être établi. Ce protocole a été utilisé pour la purification de nombreuses bactériocines (**Holo *et al.*, 1991 ; Nieto Lozano *et al.*, 1992 ; Nissen-Meyer *et al.*, 1992**). Ce protocole, réadapté dans certains cas, est composé de quatre étapes : une précipitation au sulfate d'ammonium, une chromatographie échangeuse de cations, une chromatographie d'interactions hydrophobes et une chromatographie en phase inverse utilisant le méthanol ou l'acétonitrile comme solvant d'élution.

Une méthode rapide et spécifique de purification partielle de peptides antibactériens, fondée sur les phénomènes d'adsorption/désorption des bactériocines sur les membranes des cellules productrices en fonction du pH, a également été mise au point (**Yang *et al.*, 1992**). Cette méthode a notamment permis d'obtenir des préparations concentrées de bactériocines partiellement purifiées contenant peu de protéines contaminantes malgré des rendements relativement faibles. Ces préparations, soumises à une chromatographie liquide haute performance, permettent l'obtention de bactériocines avec un degré de purification élevé. Certains auteurs proposent des modifications à ce protocole en utilisant des supports d'adsorption non cellulaires, comme des silices hydrophiles ou hydrophobes (**Daeschel *et al.*, 1992 ; Wan *et al.*, 1996**) ou de silicate de calcium (**Coventry *et al.*, 1996 ; Revol-Junelles *et al.*, 1996**).

Une autre méthode de purification de bactériocines en deux étapes a été développée pour une bactériocine de la sous-classe IIa produite par *C. divergens* (**Metivier *et al.*, 2000**).

La première étape consiste en une partition de solvant (Triton X-114) et la deuxième en une chromatographie échangeuse de cations. Les rendements de cette méthode restent faibles, de l'ordre de 10 mg par litre de culture. Enfin, une méthode de purification en trois étapes a été mise au point pour purifier les bactériocines de la sous-classe IIa avec un meilleur rendement (environ 60 %) (**Guyonnet *et al.*, 2000**). Dans ce protocole, la première étape de précipitation des protéines par le sulfate d'ammonium est remplacée par une étape d'autoclavage (12 min, 110 °C) et une chromatographie échangeuse de cations. Les deux étapes suivantes ne diffèrent pas des autres protocoles de purification déjà développés et comportent une chromatographie d'interactions hydrophobes suivie d'une chromatographie liquide haute performance. (**Jasniewski, 2008**).

II.5. Applications médicales

Bien que la principale application des bactériocines a toujours été dans la conservation des aliments, le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques conventionnels présente de nouvelles opportunités pour l'exploitation des bactériocines dans des lieux hospitaliers et les produits de soins de santé où les microorganismes non désirés et potentiellement résistants doivent être contrôlés (**Field et al., 2015**). L'Institut national de la santé (USA) a récemment encouragé une approche complémentaire dans la recherche de nouvelles formulations médicamenteuses, où l'activité des antimicrobiens conventionnels peut être améliorée en combinaison avec des antimicrobiens nouveaux et souvent dérivés de la nature (**Cavera et al., 2015**)

Les domaines d'intérêt médicaux comprennent les soins buccaux et cutanés et les infections respiratoires, gastro-intestinales, urogénitales et autres infections. En plus de l'activité antivirale, les bactériocines pourraient potentiellement être utilisées dans le contrôle post-chirurgical des bactéries infectieuses (**Van Staden et al., 2012**).

La nisine étant la bactériocine la plus ancienne et la plus étudiée, elle présente un intérêt particulier pour diverses applications liées à la santé humaine. En raison de sa capacité à contrôler de nombreux agents pathogènes à Gram positif et de son action accrue lorsqu'elle est combinée avec divers antimicrobiens, agissant en particulier sur la membrane externe des bactéries Gram négatives (**Shin et al., 2016**).

En ce qui concerne la santé bucco-dentaire, il a été démontré qu'une souche de *Streptococcus salivarius* produisant de la salivaricine A (un lantibiotique) réduit les bactéries impliquées dans l'halitose (**Burton et al., 2006**), tandis que des produits laitiers supplémentés avec une souche produisant de la salivaricine A, ont montré leur efficacité à protéger contre l'infection par *Streptococcus pyogenes*, bactérie responsable de la pharyngite buccale (**Dierksen et al., 2007**). En outre, des souches de *Streptococcus mutans*, qui produisent la mutacine 1140 (un lantibiotique) et qui ont été mutées pour diminuer leur phénotype acidogène, ont été utilisées avec succès pour inhiber de manière compétitive *Streptococcus mutans* formant des plaques (**Hillman et al., 2007**). En plus d'inhiber une large gamme de bactéries pathogènes, il convient de noter que certains lantibiotiques sont capables d'inhiber des bactéries virulentes telles que SARM (*Staphylococcus aureus* Résistante à la Méthicilline), ERV (Entérocoque Vancomycine Résistant) et *C. difficile* (**Rea et al., 2007**).

Chapitre II : les bactériocines

L'un des nouveaux champs d'investigation les plus intrigants est l'étude des bactériocines en tant qu'agents anticancéreux potentiels, en effet certaines bactériocines sont capables d'agir sélectivement contre les cellules cancéreuses, probablement en raison des différences distinctives dans les membranes (Kaur et Kaur, 2015). La nisine a été signalée pour augmenter la fragmentation de l'ADN ou l'apoptose et diminuer la prolifération cellulaire en arrêtant le cycle cellulaire dans les cellules cancéreuses.

Des essais *in vivo* de l'effet de la nisine ont indiqué que cet agent antimicrobien peut être utilisé dans une thérapie nouvelle et sûre pour le traitement du carcinome épidermoïde de la tête et du cou (HNSCC) (Joo *et al.*, 2012). L'utilisation de la bactériocine pour le traitement du cancer pourrait également réduire le risque d'infections secondaires car, au cours du traitement, plusieurs bactéries non pathogènes deviennent pathogènes pour des patients, à cause de la suppression de leur système immunitaire.

II.6. Possibilité d'utilisation des bactéries lactiques dans le domaine médical :

D'après les travaux de Guetarni Hassina, 2018 intitulé : les probiotiques et leur métabolites : une alternative de traitement des pathologies gastro-intestinales.

- Les bactéries lactiques ont démontré un net effet inhibiteur des souches pathogènes responsables des maladies diarrhéiques tels que *Escherichia coli* et *Salmonella typhi* et de la maladie ulcéreuse due à *H. pylori*. Ces bactéries produisent des quantités d'acide lactique varient entre 0,069 g / L et 0,077 g / L détectées par la chromatographie en phase liquide CLHP. Une protéine extracellulaire sensible aux enzymes protéolytique, stable à l'effet de la chaleur et du pH a permet d'inhiber *in vitro* et *in vivo* des souches de références, cliniques et de wildtype de *Helicobacter pylori*.

Les bactéries lactiques ou leurs métabolites pourraient être utilisées comme une alternative de traitement des maladies causées par ses pathogènes.

Chapitre II : les bactériocines













Souche Effet	TN2GF4	J99	HSA3086	26695
Effet du pH 4 et 8				
Effet de enzymes (Amy: Amylase Try: Trypsine, Pep: Pepsine)				
Effet du traitement thermique (60 ° C pendant 30min, 80 ° C pendant 10min et 100 ° C pendant 5 min)				

Figure 04 : Effet de l'extrait cellulaire (CE) et de la fraction extracellulaire (FEC) d'*Enterococcus faecium* (B13) sur les souches de *H. pylori* par la méthode de diffusion sur gélose: A:TN2GF4, B: J99 C: HSA3068, D: 26695. (Guertarni, 2018).

Chapitre III-

La résistance

bactérienne aux

antibiotiques

Chapitre III : la résistance bactérienne aux antibiotiques

III. Résistance bactérienne aux antibiotiques

III.1. Antibiotiques

III.1.1. Définition

Un antibiotique (du grec anti : « contre », et bios : « la vie ») sont des produits du métabolisme des moisissures ou des bactéries ou leurs dérivés, obtenus par synthèse chimique, qui inhibent ou détruisent, même à très faible concentration (d'ordre de $\mu\text{g}/\text{cm}^3$) d'autres microorganismes (**Canu et Peter, 2001**).

Les antibiotiques sont définis comme toute substance antibactérienne d'origine biologique, synthétique ou semi synthétique (**Lavigne, 2007**), capable d'inhiber sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries, sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieurs (**Perronne, 1999**). Un grand nombre d'antibiotiques a été identifié en milieu naturel, mais moins de 1% sont médicalement utiles. Cependant, ceux qui le sont ont eu un impact déterminant sur le traitement des maladies infectieuses. Beaucoup d'antibiotiques naturels ont été structurellement modifiés en laboratoire, pour augmenter leur efficacité formant ainsi, la classe des antibiotiques semi- synthétiques (**Madigan et Martinko, 2007**).

Mais toutefois chaque antibiotique a une spécificité d'action. Ils n'agissent pas sur les virus (**Figarella, et al ., 2007**).

III.1.2. Classification

Les antibiotiques peuvent être classés en se basant sur différents critères tels que :

- Les antibiotiques ayant une même structure chimiques, à l'origine de leur mécanisme d'action, se classent dans une même famille ;
- Au sein d'une même famille, les antibiotiques peuvent se différencier par leur spectre d'activité et sont réunis alors dans des groupes ;
- Au sein d'un même groupe, l'activité antimicrobienne est identique mais les antibiotiques peuvent se différencier par leur propriété pharmacologique ou leur tolérance (**Talbert, et al ., 2009**).

Chapitre III : la résistance bactérienne aux antibiotiques

III.1.2.1. Les principales familles des antibiotiques

On a 5 grandes familles des antibiotiques :

- **β - lactamines :**

Les bêtalactamines constituent la famille d'antibiotiques la plus utilisée en antibiothérapie. Ils représentent une vaste famille d'antibiotiques bactéricides qui possèdent comme structure de base le cycle bêta-lactame qui regroupe :

Les pénams 1= S: Pénicilline qui comportent plusieurs groupes :

- Pénicilline G (voie parentérale) et V (voie orale)
- Pénicilline M (mécilline)
- Pénicilline A (aminopénicilline)
- Carboxy-pénicillines (ticarcilline) à usage hospitalier
- Uréido-pénicillines (pipéracilline)
- Amidino-pénicillines (pivmécillinam) (**Laurent, 2009**).

Les céphems 1=S : qui comportent plusieurs groupes :

- Céfaloine
- Céfuroxime, céfamandole
- Céfotaxime, ceftriaxone
- Céfépime, cefpirome

Les carbapénèmes : pénams 1= C

- Imipénème
- monobactams (**Archambaud, 2009**)

- **Glycopeptides :**

Les antibiotiques importants que renferme cette famille sont la Vancomycine et Teicoplanine. Ces deux molécules n'agissent que sur les bactéries à Gram positif en inhibant la synthèse du peptidoglycane et donc la croissance des bactéries (**Mouton et al ., 2000**) .

- **Aminosides**

Leur structure est à base de sucres aminés Les principales molécules sont : Streptomycine, Gentamicine, Netilmicine, Tobramycine, Amikacine. Est un antibiotique bactéricide. Ils se fixent de façon irréversible sur le ribosome des bactéries et inhibent la traduction en provoquant des erreurs de lecture de l'ARN messager (**Archambaud, 2009**).

Chapitre III : la résistance bactérienne aux antibiotiques

- **Macrolides**

Les antibiotiques macrolides sont caractérisés par le cycle lactone relié aux molécules de sucres. Il y a une grande variété d'antibiotiques macrolides, le plus connu est l'érythromycine. Il est un inhibiteur de synthèse de protéine au niveau de la sous-unité 50S du ribosome (bactériostatiques) (**Madigan et Martinko, 2007**).

- **Quinolones**

Les quinolones sont des antibiotiques bactéricides à large spectre, on distingue les antibiotiques de :

- 1ère génération : Acide nalidixique ;
- 2ème génération : fluoroquinolones : Norfloxacin, Ofloxacin, Ciprofloxacin ;
- 3ème génération : Lévofoxacin, Moxifloxacin.

Ils sont très efficaces contre les bactéries entériques comme *E. coli* et *Klebsiella pneumoniae* et contre *Haemophilus*, *Neisseria*, *Pseudomonas aeruginosa* et d'autres bactéries pathogènes Gram négatives, ainsi que les Gram positives telles que *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* et *Mycobacterium tuberculosis*. Ils sont utilisés dans le traitement des infections du système urinaire (**Prescott et al., 2007**).

III.1.3. Mode d'action

Les antibiotiques se différencient des antiseptiques par leur mécanismes d'action, ils agissent à un niveau précis des structures bactériennes, dénommé site d'action.

L'action d'un antibiotique est le résultat des interactions organisme-antibiotique d'une part et antibiotique-bactéries d'autre part. Pour résumer ces dernières, on peut dire que pour être actif, un antibiotique doit :

- Pénétrer jusqu'à sa cible bactérienne ;
- Ne pas être inactivé ;
- Être capable de se lier à sa cible.

Ce sont les conditions nécessaires à l'activité antibactérienne.

L'antibiotique exercera son action qui pourra être de deux types de modalité:

- bactériostatique, s'il n'y a qu'une simple inhibition de la croissance bactérienne ;
- ou bactéricide, s'il y a mort de la bactérie (**Gaudy et Buxeraud, 2005**).

Chapitre III : la résistance bactérienne aux antibiotiques

Les quatre cibles principales sont :

1. La paroi : inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne (bêtalactamines, glycopeptides, fosfomycine) (Talbert, et al., 2009).

La pénicilline et les antibiotiques chimiquement apparentés empêchent la réaction de transpeptidation qui est une étape importante dans l'assemblage du peptidoglycane, le polymère de la paroi cellulaire. Ceci entraîne la fragilisation de la paroi cellulaire, notamment chez les micro-organismes Gram positif. Les micro-organismes vivant généralement dans un environnement osmotiquement hostile, et ceux qui auront une paroi défectueuse, pourront absorber de l'eau et éclater ou se lyser. Les bactéries Gram négatives ont tendance à être moins sensibles à la pénicilline car leur enveloppe externe empêche l'antibiotique d'atteindre la couche de peptidoglycane de la cellule (Perry, et al., 2002).

2. La membrane cytoplasmique : inhibition de la synthèse de la membrane (polymyxines) (Talbert et al., 2009).

La polymyxine et la tyrocidine sont tous deux, des antibiotiques polypeptidiques qui altèrent les membranes cellulaires. Les deux sont produites par des bactéries du genre *Bacillus*. La tyrocidine est un ionophore, qui perturbe la perméabilité sélective en formant des canaux à travers la membrane cellulaire, entraînant la perte de cations monovalents. Par conséquent, le microorganisme ne peut établir de force proton motrice, et le transport vers l'intérieur ou l'extérieur de la cellule est altéré. La polymyxine provoque des dommages similaires à la membrane cytoplasmique. Les antibiotiques peptidiques ne sont pas ingérés mais sont appliqués par voie externe pour traiter des infections de la peau. Les enzymes présentes dans le tractus intestinal sont capables de dégrader ce type d'antibiotiques (Perry, et al., 2002).

3. Le chromosome : inhibition de la synthèse de l'ADN (quinolones) (Talbert et al., 2009) Les quinolones inhibent l'ADN gyrase et interfèrent ainsi avec la réplication, la réparation et la transcription de l'ADN (Prescott et al., 2007).

4. Le ribosome : inhibition de la synthèse protéique (cyclines, aminosides, macrolides) (Talbert et al., 2009). Les antibiotiques antibactériens qui inhibent la synthèse protéique, le font par fixation au ribosome bactérien (Perry, et al., 2002).

Dans certaines situations cliniques, l'association de deux antibiotiques ayant des sites d'action distincts sur la bactérie permet d'obtenir une meilleure efficacité thérapeutique (Talbert et al., 2009)

Chapitre III : la résistance bactérienne aux antibiotiques

Les antibiotiques les plus sélectifs sont ceux qui interfèrent avec la synthèse des parois bactériennes (les pénicillines, les céphalosporines, la vancomycine et la bacitracine). Ces produits ont un indice thérapeutique élevé parce que les parois bactériennes possèdent une structure unique inexistante dans les cellules eucaryotes (Prescott *et al.*, 2007).

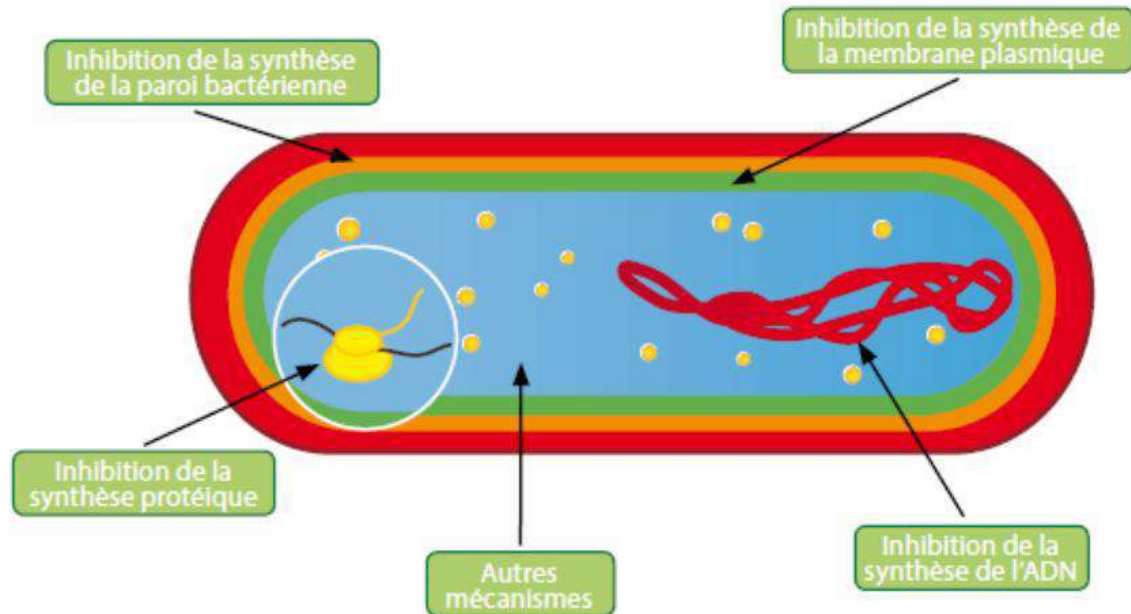


Figure 05 : Mode d'action des antibiotiques sur une bactérie (Afssa, 2006)

III.2. La résistance bactérienne aux antibiotiques :

III.2.1. Définition :

La résistance aux antibiotiques constitue aujourd'hui l'une des plus graves menaces pesant sur la santé mondiale, la sécurité alimentaire et le développement (OMS, 2018).

Par définition, l'antibiorésistance ou la résistance aux antibiotiques est la capacité d'une bactérie à résister à l'action d'un antibiotique. C'est-à-dire sa capacité de croître, ce multiplier malgré la présence de l'antibiotique, et ceci du fait que le lieu d'action de l'antibiotique sur la bactérie est naturellement absent chez celle-ci (David *et al.*, 2014).

Un micro-organisme est considéré résistant lorsque sa concentration minimale inhibitrice est plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce (Carl, 2009).

III.2.2. Types de résistance :

Il existe deux grands types de résistance aux antibiotiques, la résistance naturelle (intrinsèque) et la résistance acquise.

Chapitre III : la résistance bactérienne aux antibiotiques

III.2.2.1. Résistance naturelle :

La résistance naturelle ou intrinsèque est un caractère présent chez toutes les souches appartenant à la même espèce (CA-SFM, 2012). Elle est permanente et d'origine Chromosomique, stable et transmise à la descendance (transmission verticale) lors de la division cellulaire, mais elle n'est généralement pas transférable d'une bactérie à l'autre (transmission Horizontale) (Sylvie, 2009).

III.2.2.2. Résistance acquise :

Ce terme est utilisé pour désigner des processus permettant à des bactéries appartenant à une espèce originellement sensible de devenir résistante à un ou plusieurs antibiotiques (Chopra et al., 2003). Elle est moins stable, mais elle se propage souvent de façon importante dans le monde bactérien, par l'acquisition des nouveaux gènes capables de rendre la bactérie insensible à un antibiotique ou à un groupe d'antibiotique. Ce nouveau gène peut être obtenu soit par mutation au niveau du chromosome, soit par transfert d'ADN de plasmide conjugatif ou de transposons (Yala et al., 2001).

III.2.2.2.1. Les Mécanismes de la résistance acquise

III.2.2.2.1.1. Les mécanismes génétiques de la résistance acquise

Le transfert horizontal de gènes est un phénomène d'échange d'information génétique entre bactéries par l'acquisition d'ADN étranger. Ce phénomène représente 80% des cas de résistance aux antibiotiques (Samine, 2011).

La première mise en évidence de transfert de gènes a été réalisée par l'étude de déterminants de la virulence chez *Staphylococcus pneumoniae* par Griffith, en 1928. Ses études ont montré qu'on vivo, chez la souris, un facteur de virulence était transféré entre des bactéries virulentes mortes et des réceptrices avirulentes (Georges et François-Marie, 2007).

Griffith mettait en évidence qu'il existait un principe thermostable, capable de modifier durablement l'hérédité. Il sera identifié quelques années plus tard comme étant l'ADN.

Il existe des mécanismes spécifiques qui permettent à de l'ADN étranger d'accéder au génome, dont les trois principaux sont la transformation, la conjugaison et la transduction (Figure 06) (Lefevre et al., 2016).

Chapitre III : la résistance bactérienne aux antibiotiques

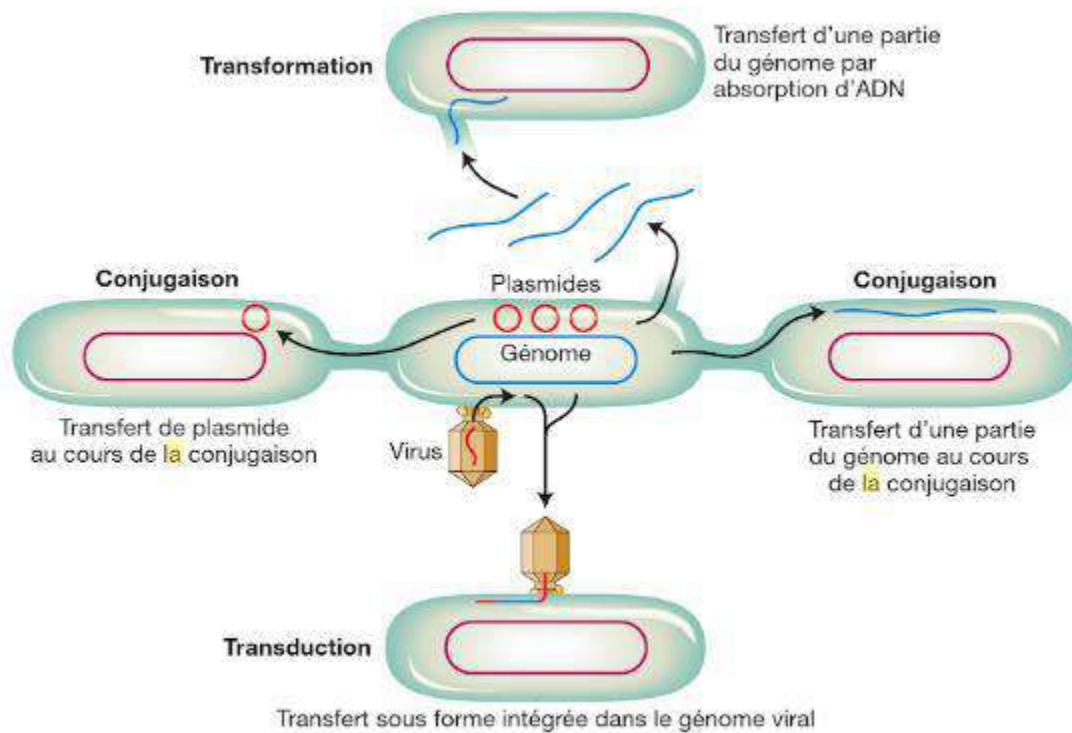


Figure 06 : Les principaux mécanismes d'échange d'ADN entre les bactéries (Carroll *et al.*, 2013)

III.2.2.1.2. Les mécanismes biochimiques de la résistance acquise

Ils peuvent être regroupés en quatre grands types de mécanismes :

- Diminution de la perméabilité (mutation affectant la structure des porines ou diminuant la synthèse des porines par lesquelles l'antibiotique peut pénétrer dans la bactérie) et efflux actif: l'efflux repose sur une pompe insérée, dans la membrane et capable d'éjecter l'antibiotique hors de la bactérie grâce un canal, cet efflux conduit à une diminution de la concentration intracellulaire de l'antibiotique.
- Modification de la cible des antibiotiques par modification des protéines liant les pénicillines (PLP), qui sont des enzymes qui catalysent l'étape finale de la biosynthèse du peptidoglycane (paroi bactérienne), et qui sont la cible des bêta-lactamines (en se fixant aux PLP les bêtalactamines les empêchent de jouer leur rôle, la synthèse du peptidoglycane est donc entravée).
- Production d'enzymes inactivant les antibiotiques par production de bêta-lactamases codées par des plasmides ou des éléments génétiques transposables. Le nombre des bêta-lactamases plasmidique est très élevé et elles sont classées selon leurs vitesses d'hydrolyse,

Chapitre III : la résistance bactérienne aux antibiotiques

leurs constantes d'affinité pour les bêta-lactamines, leur faculté à être inhibée par les inhibiteurs tel que l'acide clavulanique (Lozniewski *et al.*, 2010).

- Pompe à efflux : l'antibiotique ne peut atteindre son site d'action par pompage actif de l'antibiotique à l'extérieur de la bactérie (efflux). Les transporteurs d'efflux de plusieurs médicaments sont des composants normaux des cellules bactériennes et contribuent pour une large part à la résistance intrinsèque des bactéries à de nombreux agents antibactériens, ces pompes ont besoin d'énergie. L'exposition aux antibiotiques favorise une surexpression par mutation de transporteurs entraînant une hausse de la résistance bactérienne, il est également possible qu'une résistance par efflux apparaisse à cause de l'exposition à un antibiotique d'une autre classe. Parmi les bactéries d'importance clinique munies d'une pompe à efflux comme mécanisme de résistance, on trouve l'*E. coli* et le *Shigella*. Le *Staphylococcus aureus* peut également comporter une pompe à efflux lui permettant d'acquérir une résistance au macrolide (Sylvie, 2009).

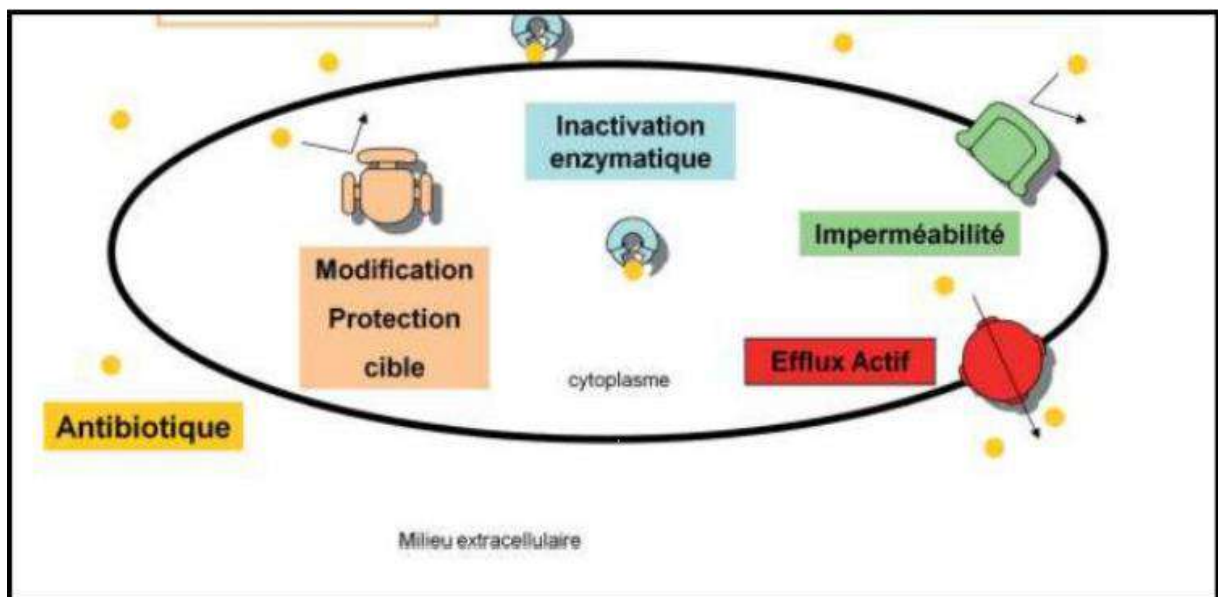


Figure 07 : Les principaux mécanismes de la résistance aux antibiotiques (Meriah, 2017)

Partie

expérimentale

Matériel et
méthodes

I. Matériel et méthodes

Ce travail consiste à étudier l'activité antibactérienne de certaines souches de bactéries lactiques isolées à partir de différents produits laitiers à l'égard de quelques bactéries pathogènes au niveau des laboratoires de microbiologie et de biochimie de la faculté des sciences de la nature et de la vie (Université Kasdi Merbah Ouargla), à partir du 02/02/2020 jusqu'à 12/03/2020.

Donc cette étude est basée sur :

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

Les bactéries utilisées dans ce travail

Les espèces des bactéries lactiques proviennent de la collection du laboratoire de microbiologie appliquée à partir de différents produits laitiers (lait de vache, lait de chèvre, fromage traditionnel), isolés et identifiés par **DJOUHRI khadra et MADANI Sabrina** et par **AYADI Hana et DJEBBAS Assia** du département de biologie de la faculté des sciences, de l'université d'Ouargla, Algérie utilisées comme des souches tests dans le tableau suivant.

Tableau 01 : Les espèces des bactéries lactiques utilisées comme des souches tests

Les souches	Souches identifiées
Souche C18	<i>Ln.fallax</i>
Souche C16	<i>Ln.fallax</i>
Souche C21	<i>Ln.mesenteroides subsp cremoris</i>
Souche V67	<i>Ln.mesenteroides subsp dextranicum</i>
Souche 31	<i>Ln.mesonterioide subsp crémoris</i>
Souche C41	<i>Ln.carnosum</i>
Souche C43	<i>Ln.citreum</i>
Souche C10	<i>Ln.gelidum</i>
Souche C1	<i>Ln.mesenteroides subsp mesenteroides</i>
Souche F65	<i>Ln.mesenteroides subsp mesenteroides</i>
Souche F55	<i>Ln.fallax</i>
Souche F63	<i>Ln.fallax</i>
Souche F70	<i>Ln.mesenteroides subsp mesenteroides</i>

Matériel et méthodes

Souche C39	<i>Ln.mesenteroides subsp cremoris</i>
Souche C12	<i>Ln.fallax</i>
Souche 14	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
Souche C13	<i>Ln.mesenteroides subsp mesenteroides</i>
Souche F49	<i>Ln.mesenteroides subsp dextransicum</i>
Souche C15	<i>Ln.mesenteroides subsp mesenteroides</i>
Souche C23	<i>Ln.fallax</i>
Souche 115	<i>Entérocooccus durans</i>
Souche 133	<i>Lactococcus lactis subsp crémoris</i>
Souche 19	<i>Lactococcus lactis subsp lactis</i>
Souche 125	<i>Weissellasp</i>
Souche 24	<i>Lactococcus lactis subsp lactis</i>
Souche 63	<i>Pediococcus acidilactici</i>
Souche F69	<i>Ln.mesenteroides subsp dextransicum</i>
Souche 116	<i>Entérocooccusdurans</i>
Souche D36	<i>Leuconostoc Sp</i>
Souche 61	<i>Lactococcus diacelilactis</i>
Souche 49	<i>Leuconostoc Sp</i>
Souche C2	<i>Ln.mesenteroides subsp mesenteroides</i>
Souche 86	<i>Leuconostoc crémoris</i>

- Les bactéries pathogènes utilisées comme souches indicatrices sont des bactéries multirésistantes qui sont isolées et identifiées par **Mlle DAOUADJI Soumia** à partir des prélèvements biologiques des patients de différents services d'EPH MOHAMED BOUDIEF, Ouargla.

Les bactéries pathogènes (BMR) utilisées comme souches indicatrices sont les suivantes : *StaphylococcusSp107*, *StaphylococcusSp217*, *EscherichiaSp19*, *EscherichiaSp31*, *KlebsiellaSp23*, *SerratiaSp29*, *Morganella Sp30Z*, *Proteus Sp16*, *Proteus Sp29*.

I.1. Revivification et purification des bactéries lactiques

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

Après croissance, on les a ensemencées dans le milieu MRS solide, on réalise 03 repiquage au maximum pour confirmer la pureté de chaque souche.

I.2. Revivification des bactéries pathogènes

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

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

I.3. Etude de l'activité antimicrobienne produite par les bactéries lactiques

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

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

En premier lieu, il est nécessaire de mettre en évidence l'activité antibactérienne des souches de bactéries lactiques étudiées. La méthode de spot accordée à **Fleming et al., (1975)** et **Tagg et al., (1971)**, est utilisée pour la détection des inhibitions (**Schillinger et Lucke, 1989**). Ce test consiste à déposer un volume de spot de la culture fraîche de 18h de chaque souche lactique (33 souches) sur une gélose MRS. Les boîtes sont laissées à température ambiante pour permettre le séchage des spots, avant de les incuber à 37°C pendant 24h.

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

Matériel et méthodes

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

L'activité antibactérienne se révèle par l'apparition de zones claires autour des spots.

L'inhibition est considérée positive si la zone dépasse 2 mm de diamètre (**Hernandez et al., 2004**). Le diamètre des zones d'inhibition est mesuré en millimètre et le diamètre du spot n'est pas pris en compte dans l'expression des résultats. La figure 08A représente les étapes suivies pour la réalisation de la méthode de double couche (test des spots).

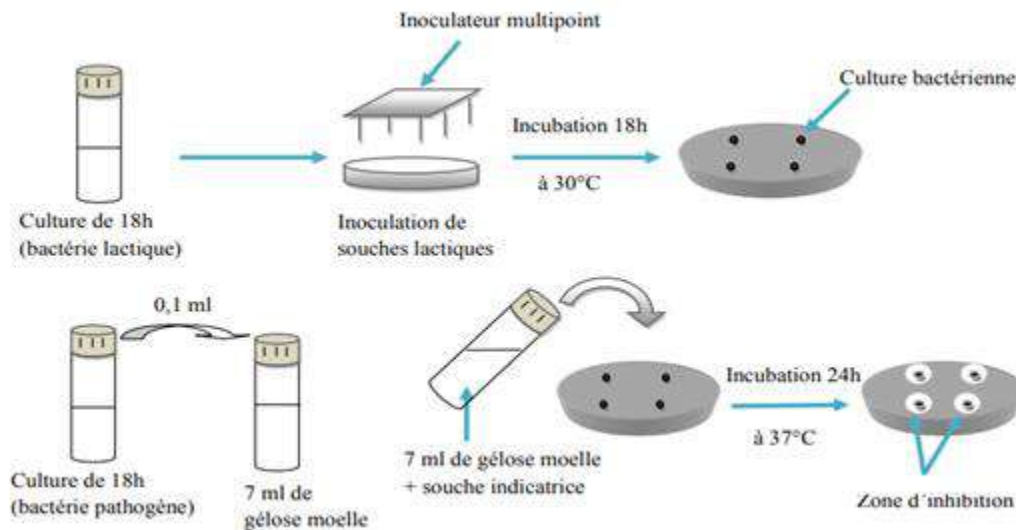


Figure 08A : Méthode des spots (Fleming et al., 1975)

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

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

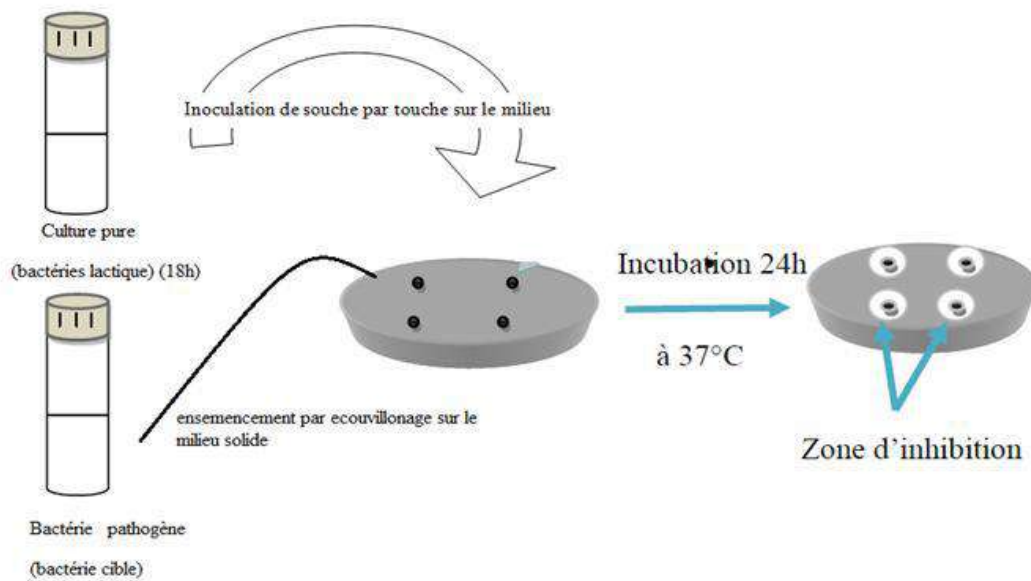


Figure 08B : Méthode des spots (Fleming et al., 1975)

I.3.2. Méthode de détection indirecte / Méthode des puits (Barefoot et Klaenhammer, 1983)

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

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

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

On réalise quatre à cinq puits par boîte de Pétri (selon le nombre de test à réaliser) de 8 mm de diamètre, ces puits sont remplis par 50 à 60 μ l de surnageant [Le premier surnageant est traité par la pepsine laissé incubé à 37°C/1h] (pour tester la nature protéique de la substance produite par les isolats on utilise l'enzyme protéolytique à raison de 0,1g dans 1ml d'eau distillée stérile. A l'aide de micropipette on prélève 100 μ l de ce mélange et on le dépose sur 1ml de surnageant). [Les trois autres surnageant sont traités à différentes

températures à 70°C, 90°C et à 110°C pendant 30min], le cinquième puits est remplis par le surnageant neutre. Après incubation 24 heures à 37°C, les diamètres des zones d'inhibition apparaissant autour des puits sont mesurés.

Une inhibition est considérée positive si le diamètre est supérieur à 2 mm (Thompson *et al.*, 1996). La mesure du diamètre d'inhibition (Zi) est effectuée selon la formule suivante:

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

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

I.3.2.1. Précipitation des protéines

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

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

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

I.3.2.1. B. Précipitation par l'éthanol

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

Matériel et méthodes

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

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

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

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

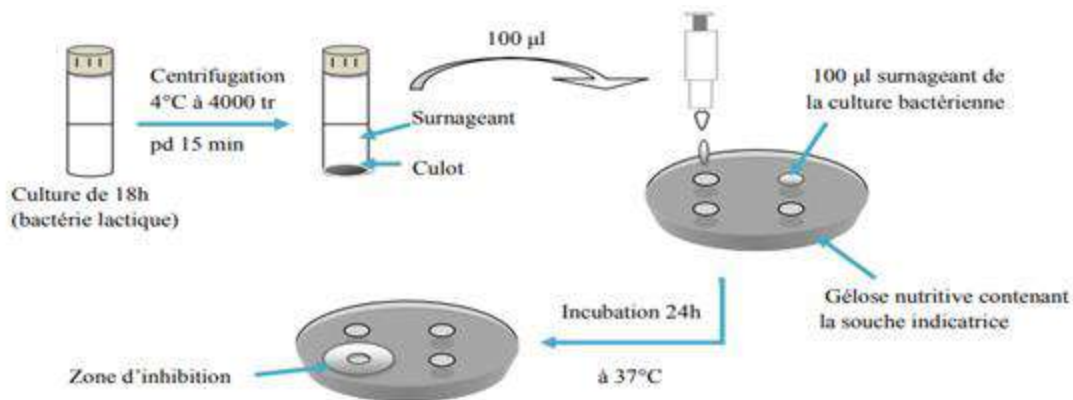


Figure 09 : Méthode des puits (Barefoot et Klaenhammer, 1983)

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

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

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

On divise le volume dans 2 flacons 50ml / 50ml, on ajoute dans l'un des deux un volume de 5ml de surnageant neutralisé de la bactérie lactique. La D_{600} a été mesuré chaque 1 h pendant 10h.

Résultats et
discussion

II. Résultats et discussion

II.1. Revivification des bactéries lactiques : L'observation d'un trouble homogène sur milieu liquide dues à la croissance des bactéries lactiques, et sur le milieu MRS solide elles apparaissent en petites colonies blanchâtres ou crémeuses sur milieu solide. La figure suivante représente l'aspect des souches de bactéries lactiques sur gélose et bouillon MRS après une culture fraîche.

II.2. Revivification des bactéries pathogènes : L'observation d'un trouble sur milieu liquide BN dues à la croissance des bactéries pathogènes, et leurs aspects macroscopiques sont présentés sur les figures suivantes (chacune sur son milieu approprié).

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

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

Après l'ensemencement des souches lactiques par touches sur le milieu MRS solide afin de cribler et de sélectionner celles qu'ont une activité antimicrobienne.

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

L'observation d'une zone d'inhibition (halot claire) autour des souches lactiques.

Les résultats de la méthode directe de double couche (l'interaction entre les souches lactiques et la souche pathogène) sont présentés dans les figures suivantes :



Photo 01 : Test de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques à l'égard de *Serratia Sp29*. Méthode de spot (Fleming *et al.*, 1975)

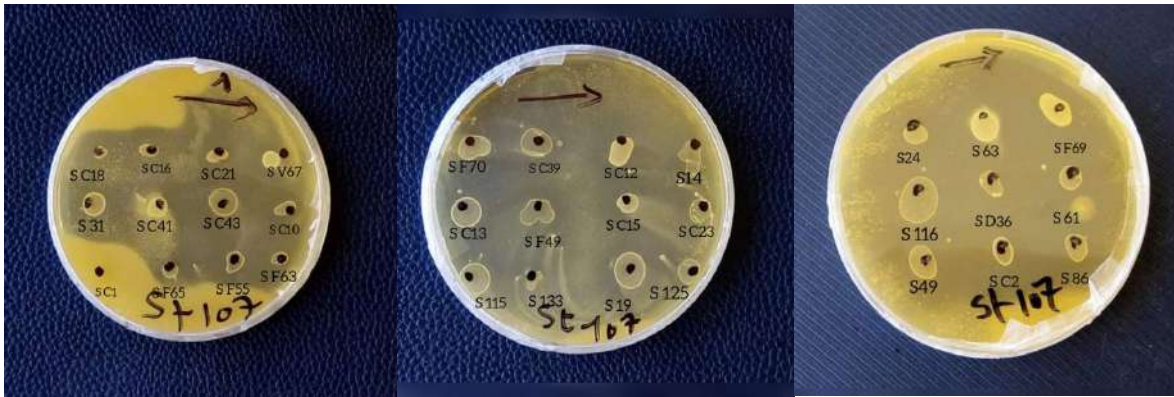


Photo 02 : Test de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques à l'égard de *staphylococcus Sp107*. Méthode de spot (Fleming *et al.*, 1975)

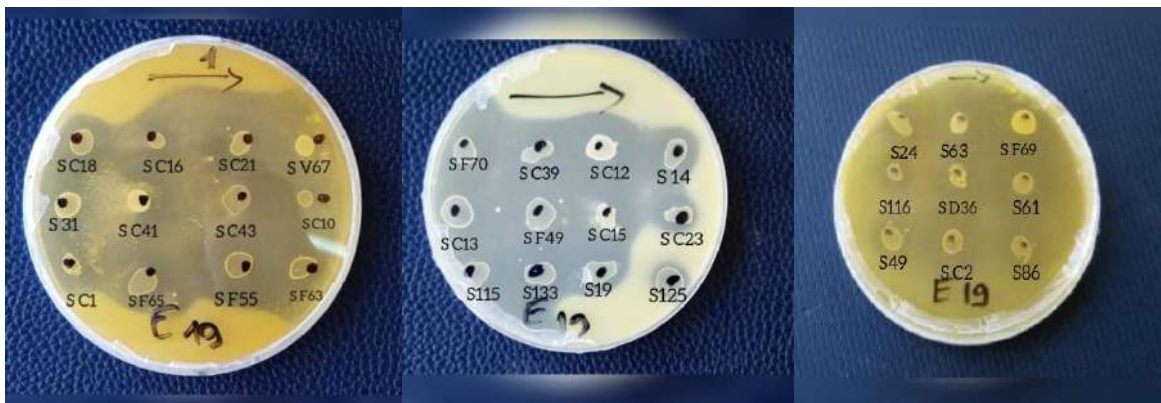


Photo 03 : Test de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques à l'égard d'*E. coli Sp19*. Méthode de spot (Fleming *et al.*, 1975)

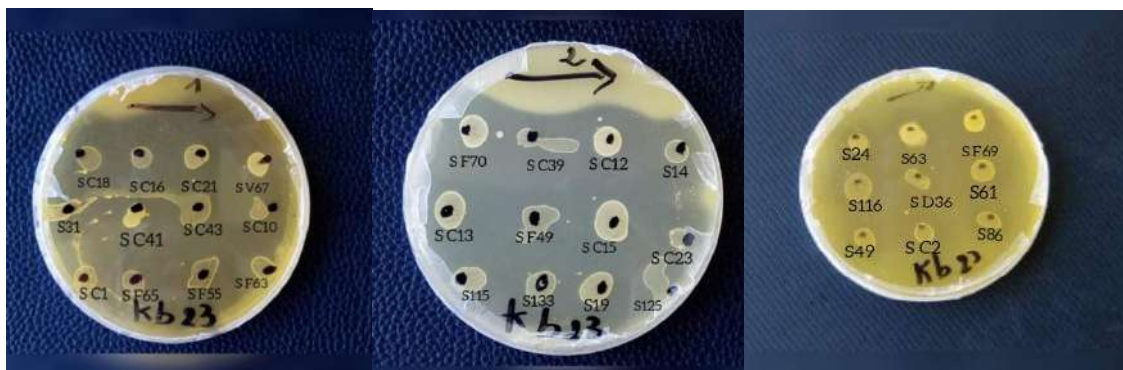


Photo 04 : Test de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques à l'égard de *Klebsiella Sp23*. Méthode de spot (Fleming *et al.*, 1975)

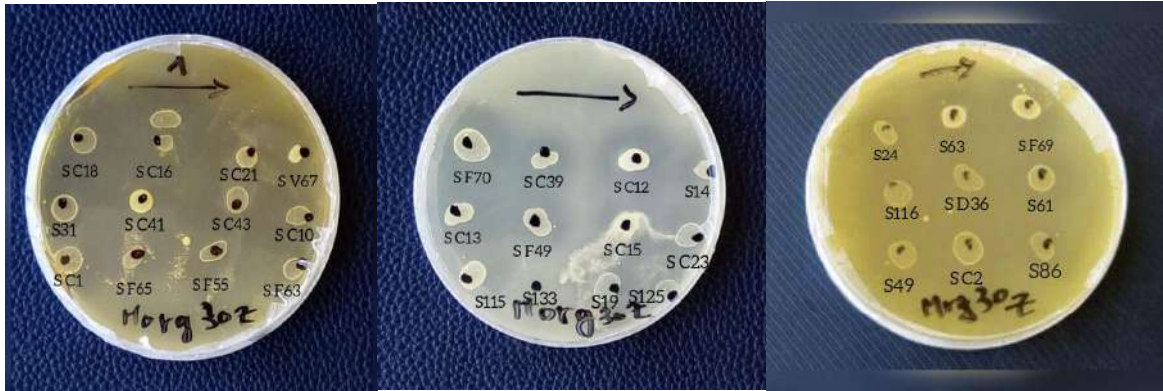


Photo 05 : Test de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques à l'égard de *Morganella Sp30Z*. Méthode de spot (Fleming *et al.*, 1975).

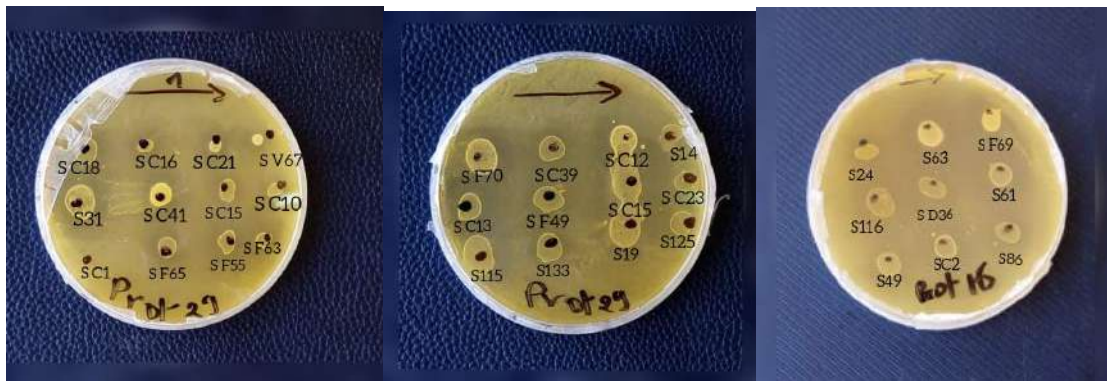


Photo 06 : Test de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques à l'égard de *proteus Sp16* et *Proteus Sp29*. Méthode de spot (Fleming *et al.*, 1975).

La zone d'inhibition (halot claire) due à l'action des BL sur la croissance des bactéries pathogènes multiresistantes.

Cette action peut être due à différents facteurs (Les acides organiques, le diacetyl, le peroxyde d'hydrogène et/ou les bactériocines) (Schillinger *et al.*, 1996).

Le tableau suivant résume l'effet antagoniste entre les bactéries lactiques et les bactéries multirésistantes.

Tableau 02 : l'action des souches lactiques sur les souches multirésistantes.

Souches lactiques	Staphylococcus Sp107	Klebssiella Sp23	Serratia Sp29	Morganella Sp30Z	Escherichia Sp19	Proteus Sp29
C18	+	+	+	+	+	+
C16	+	+	+	+	+	+
C21	+	+	+	+	+	+
V67	+	+	+	+	+	+
31	+	+	+	+	+	+
C41	+	+	+	+	+	+
C43	+	+	+	+	+	+
C10	+	+	+	+	+	+
C1	+	+	+	+	+	+
F65	+	+	+	+	+	+
F55	+	+	+	+	+	+
F63	+	+	+	+	+	+
F70	+	+	+	+	+	+
C39	+	+	+	+	+	+
C12	+	+	+	+	+	+
14	+	+	+	+	+	+
C13	+	+	+	+	+	+
F49	+	+	+	+	+	+
C15	+	+	+	+	+	+
C23	+	+	+	+	+	+
115	+	+	+	+	+	+
133	+	+	+	+	+	+
19	+	+	+	+	+	+
125	+	+	+	+	+	+
24	+	+	+	+	+	+
63	+	+	+	+	+	+
F69	+	+	+	+	+	+
116	+	+	+	+	+	+
D36	+	+	+	+	+	+
61	+	+	+	+	+	+
49	+	+	+	+	+	+
C2	+	+	+	+	+	+
86	+	+	+	+	+	+

Résultats et discussion

On remarque que 29 souches lactique ont une activité antimicrobienne à l'égard des toutes les BMR testés de GRAM + et GRAM - .La souche C16 a une activité antimicrobienne contre toutes les BMR de GRAM+ et GRAM- sauf Ser29 et Prot29, alors que la souche C1 n'a pas une activité antimicrobienne contre prot29 et st107 qui est de GRAM+ , ainsi que la souche C12 n'a pas montré une activité antimicrobienne juste conte Ser29,bien que la souche 133 a une activité antimicrobienne contre toutes les BMR de GRAM- hormis MorgSp30z et StSp107.

D'après ces résultats, les bactéries lactiques ont une action positive sur les BMR quel que soit de GRAM+ ou GRAM-, nos résultats se rapprochent de ceux cités par l'étude menée dans le même contexte, ou les BL montrent un spectre d'activité plus ou moins large affectant des espèces de bactéries lactiques, ainsi que des espèces potentiellement pathogènes appartenant aux genres *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Listeria* ou encore *Serratia* (Hammi, 2016) .

Plusieurs auteurs ont indiqué que les inhibitions exercées contre des bactéries Gram négatives sont plus prononcées par rapport aux bactéries Gram positives, ceci est dû à l'intolérance connue des bactéries Gram négatives à des acides produits par les bactéries lactiques par rapport aux bactéries Gram positives (Benmouna, 2019). En plus de la production d'acides organiques, les bactéries lactiques sont aussi productrices d'autres agents inhibiteurs tels que le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines (Helander *et al.*, 1997).

Dans une étude, Cizeikiene *et al.* (2013) ont évalué l'effet inhibiteur des bactéries lactiques sur les bactéries pathogènes et d'altération, ils ont constaté un effet inhibiteur contre des espèces pathogènes tels que *E. coli*, *Bacillus* et *Pseudomonas*. Plusieurs auteurs ont rapporté la capacité des bactéries lactiques du genre *Enterococcus* à inhiber aussi bien des bactéries Gram positives comme *Clostridium botulinum* que des bactéries Gram négatives (Shehata *et al.*, 2016).

- **Ce travail n'a pas été terminé à cause de la pandémie de Corona, donc on a utilisé les résultats des travaux antérieurs.**

L'évaluation des propriétés physico-chimiques de la substance antimicrobienne :

II.3.2. Méthode indirect/méthode de puits :

Selon les travaux de (Zergoune, 2019), les résultats d'inhibition par la méthode des puits sont montrés dans les photos suivantes

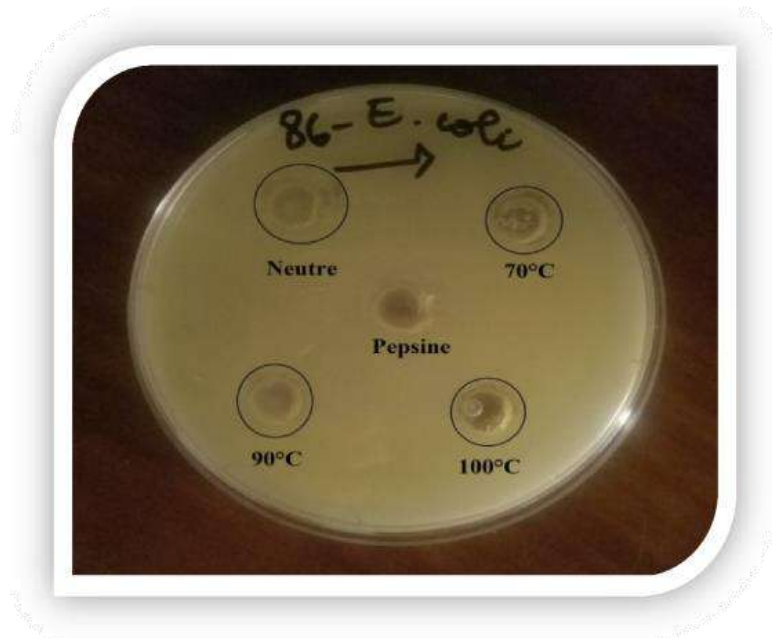


Photo 07 : Activité antibactérienne de *Leuconostoc cremoris* vis-à-vis *E.coli*, Par méthode de diffusion (puits).

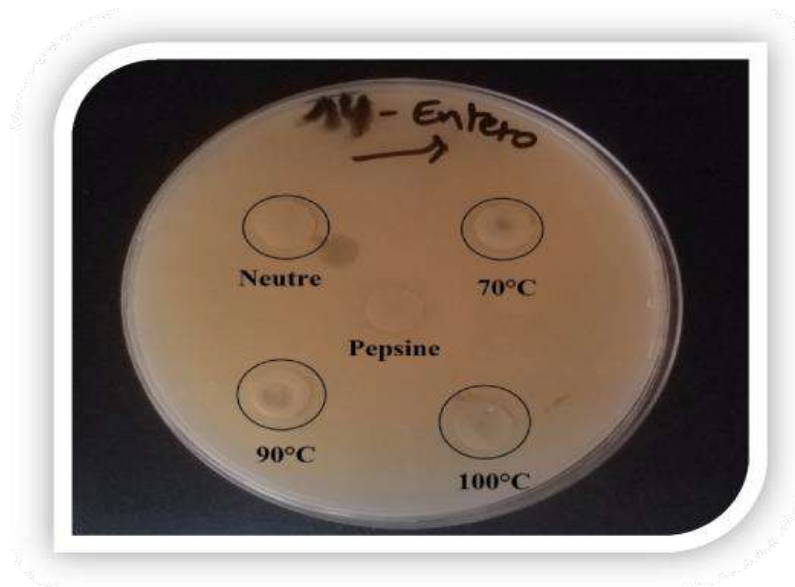


Photo 08 : Activité antibactérienne de *Lactococcus raffinolactis* vis-à-vis *E.faecalis*, Par méthode de diffusion (puits).

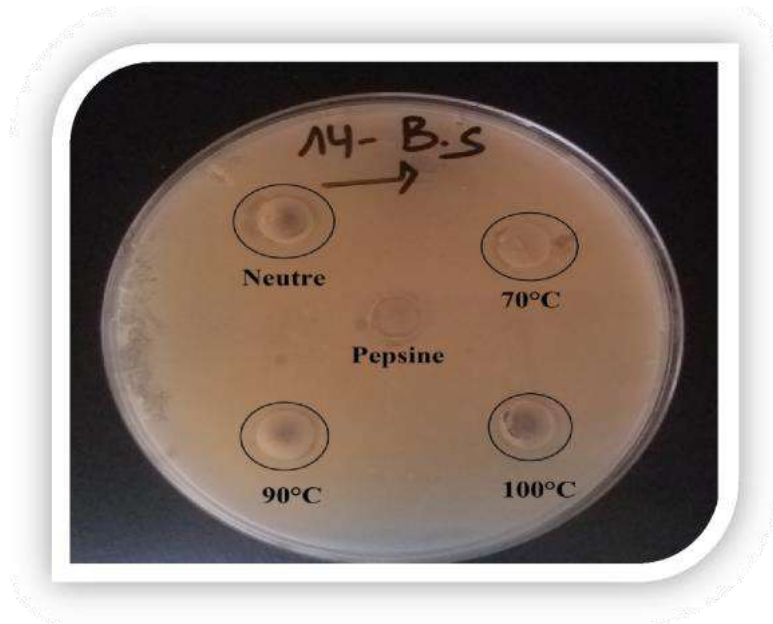


Photo 09 : Activité antibactérienne de *Lactococcus raffinolactis* vis-à-vis *Bacillus subtilis*, Par méthode de diffusion (puits)

Tableau 03: Résultat de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques vis-à-vis *E.coli*, *E.faecalis*, *Bacillus Sublitis*

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

Après la neutralisation du surnageant, leur traitement avec des différentes températures (70°C, 90°C et 110°C) et l'ajout de la pepsine, les résultats obtenus montrent

qu'il a une action inhibitrice après neutralisation et même après chauffage, par contre l'absence de cette dernière après l'ajout de la pepsine.

Pour un traitement à 70°C, 90°C et 110°C pendant 30 min, les souches *Leuconostoc cremoris* et *Lactococcus raffinolactis* ont des zones d'inhibition importantes, ce qui conduit que la ou les molécules inhibitrices sont thermostables. Ces spécifications font penser qu'on a affaire à des bactériocines thermorésistantes qui sont de la classe I ou II (**Dortu et Thonart, 2009 ; Parente et al., 1996**).

Ces résultats vont dans le même sens que ceux trouvés par **Mamèche-Doumandji (2008)**, ayant démontré que la substance inhibitrice produite par la bactérie lactique *Lactobacillus acidophilus* 11 reste stable pendant 30 minutes à des températures de 70°C jusqu'à 90°C.

Les résultats obtenus après le traitement thermique du surnageant contenant la substance et les tests des enzymes protéolytiques ainsi que l'élimination de l'acidité et le H₂O₂ nous ont permis de sélectionner des souches productrices de substance antimicrobienne d'une nature protéique thermorésistante (**Hugas et al, 2003**). D'après les résultats de la recherche de pouvoir antimicrobien des bactéries lactiques ; on suggère que cette bactériocine secrétée par les genres testés, *Leuconostoc*, *Lactococcus* et *Enterococcus* appartient à la classe II qui renferme les bactériocines thermorésistantes (**Klaenhammer, 1988**).

II.3.2.1. Précipitation des protéines :

Les résultats ont montré que les zones d'inhibition des souches lactiques S14 et S86 sont plus larges contre presque tous les bactéries multi résistantes par l'utilisation de surnageant qu'est précipité par le sulfate d'ammonium, aussi contre tous les BMR utilisées par l'utilisation de la solution (culot de surnageant qu'est précipité par le méthanol avec l'eau distillé), ces résultats sont similaires aux résultats de travaux de **Makhloufi.,(2011)**, où les zones d'inhibition étaient de 12 mm à 14 mm contre deux souches de *Listeria*.



Photo 10 : Activité antibactérienne de bactéries lactiques vis-à-vis *S. aureus*, Par la méthode de précipitation (Zergoune, 2019)

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

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

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

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

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

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

- **Selon les travaux de (Zergoune, 2019) :** L'étude de la cinétique bactérienne est effectuée sur le milieu BN par la mesure de la densité optique chaque 1h d'incubation à 37°C en absence et en présence de surnageant des bactéries lactiques S14 et S86 et exprimée en absorbance en fonction de temps, Pour enfin obtenir les résultats suivantes : une augmentation continue de croissance avec le temps dans les deux cas, en absence et en présence de surnageant des bactéries lactiques S14 et S86 pour toutes les souches cible dans l'intervalle de 6h, en revanche cette croissance diminue après 6h seulement en présence de surnageant des bactéries lactiques S14 et S86, ça veut dire que la diminution est suite à l'action inhibitrice du surnageant par la présence des substances antimicrobienne de nature protéique.

Ces résultats vont dans le même sens de ceux trouvés dans les travaux de **Khodja., (2017)** qui a aussi trouvé que la biomasse bactérienne d'*E. coli* est nettement diminué après l'ajout des bactériocines, aussi les travaux de **Bhunja et al., (1991)**, **O'Sullivan et al., (2002)** montrent une augmentation de la densité optique puis une

diminution de celle-ci après l'ajout du surnageant. **Rodriguez et al., (2000)** montre aussi qu'après quelques heures d'incubation, la croissance de *Staphylococcus aureus* diminue après l'addition du surnageant de *Lactococcus lactis*.

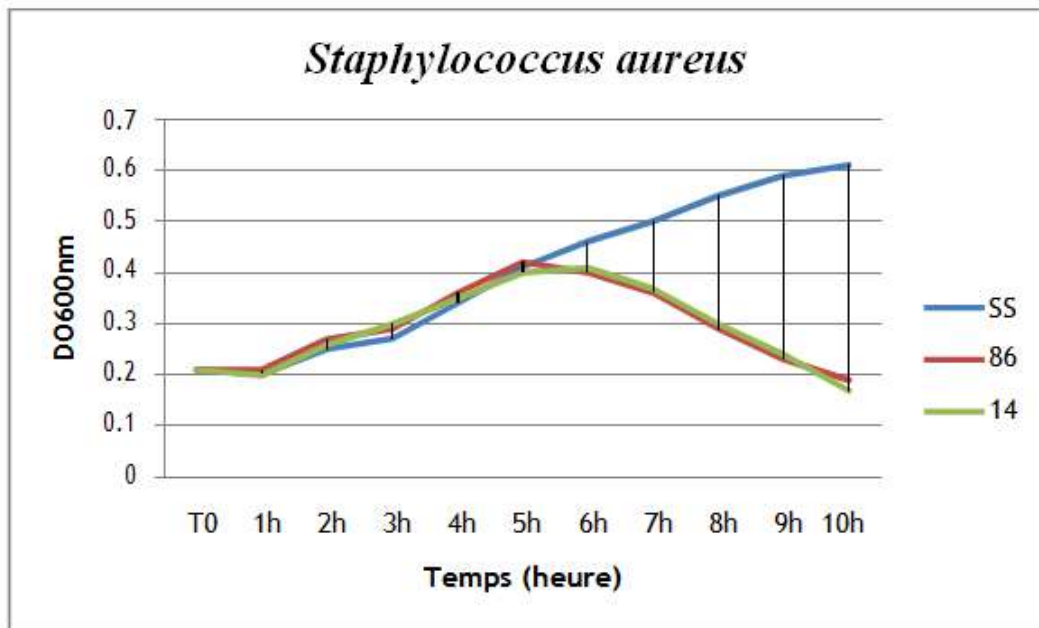


Figure 10 : Cinétique de croissance de *Staphylococcus aureus* en fonction du temps, en présence et en absence de surnageant (SS : sans l'ajout de surnageant, 86 : en présence de surnageant de la souche lactique S86, 14 : en présence de surnageant de la souche lactique S14). (Zergoune, 2019)

Conclusion

Conclusion

Les bactéries lactiques occupent une place importante dans les industries agroalimentaires puisqu'elles interviennent comme flore technologique pour améliorer la qualité technologique, la qualité organoleptique et l'inhibition de la flore d'altération et les germes pathogènes par la production de substances inhibitrices.

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

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

Les souches des bactéries lactiques utilisées dans cette étude ont été isolées à partir de différents produits laitiers (lait de vache, lait de chèvre, fromage traditionnel) qu'elles ont été déjà identifiées.

La sélection des souches lactiques productrices de substances antimicrobiennes vis-à-vis les BMR nous a permis de sélectionner 33 souches inhibitrices. 29 souches ont un grand spectre d'inhibition.

Selon les travaux de (Zergoune, 2019), les résultats d'inhibition par la méthode des puits ont montré que : les substances antimicrobiennes étudiées présentent une forte thermorésistance. Ces substances sont entièrement détruites sous l'action des enzymes protéolytique. Ces propriétés suggèrent que cette bactériocine appartient à la classe II.

La cinétique de croissance des BMR en présence et en absence du surnageant des bactéries lactiques (*Lactococcus raffinolactis* et *Leuconostoc cremoris*) a montré une augmentation continue de croissance avec le temps dans les deux cas dans l'intervalle de 6h, en revanche cette croissance diminue après 6h seulement en présence de surnageant.

Cette étude montre le potentiel des bactéries lactiques et leur effet antagoniste vis-à-vis les BMR, pour résoudre au moins le problème d'infections avec ces dernières par l'utilisation des bactériocines produites par les bactéries lactiques. D'autres études seront nécessaires pour en savoir plus sur l'action des bactériocines sur les BMR.

Perspectives

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

Références
bibliographiques

Références bibliographiques

- **Ababsa A. 2012.** Recherche de bactériocines produites par les bactéries lactiques du lait. UNIVERSITE FERHAT Abbas- SETIF.
- **Abee T. (1995).** « Pore-forming bacteriocins of Gram+ bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms ». FEMS Microbiol. Lett., 129, 1-9.
- **Adams, M. R., and marteau, P., 1995.** On the safety of lactic acid bacteria from food. *Int J Food Microbiol.*27:263-264.
- **AFSSA, (2006).** Usages vétérinaires des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine. Rapport du groupe de travail “Antibiorésistance”. [En ligne]. Maisons-Alfort : AFSSA, 214 pages.
- **AGUIRRE, M., and COLLINS, M. D., 1993.** Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J Appl Bacteriol.*75 :95/107.
- **AMMOR, S., TAVERON, G., DUFOUR, E., CHEVALLIER, I. (2006).** Antibacterial activity of lactic acid bacteria
- **ARCHAMBAUD. M, 2009.** Laboratoire Bactériologie-Hygiène .CHU Rangueil Toulouse. P 23, 24, 33,34.
- **AXELSSON L.T., CHUNG T.C., DOBROGOSZ W.Z., LENDGREN S., 1989.** Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*.*Micro. Eco. Health Dis.*, 2: 131-136 .
- **BAREFOOT S.F. ET KLAENHAMMER, T.R. (1983).** Detection and activity of lacticin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*.*Appl. Environ. Microbiol.* 45 :1808- 1815.
- **Benasla A. 2012.** Production d'exopolysaccharides par des souches de lactobacilles. Thèse de Magister en Biotechnologie. Université d'ORAN ES-Senia.
- **Benmouna Z. 2019.** Etude de bactériocines de bactéries lactiques et leurs effets sur les bactéries pathogènes et/ou d'altération. Thèse de doctorat. Université ORAN 1 AHMED BEN BELLA
- **Bergey's manual trust, 2001–2009.** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1–5, 2nd ed. Springer-Verlag, New York
- **BHUNIA, A.K., JOHNSON, M. C. and RAY, B. (1991).** « Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains ». J. Appl. Bacteriol. 70: 25-33.
- **BREUKINK, E., WIEDEMANN, I., VAN KRAAIJ, C., KUIPERS, O.P., SAHL, H. et DE KRUIJFF, B. (1999).** Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science* 286:2361-2364.

Références bibliographiques

- **Brogden K.A. 2005.** «Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? » *Nature reviews* 3: 238-250.
- **Brotz H, et al. 1998.** «Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and lantibiotics .» *Mol microbiol* 30: 317-327.
- **BURTON, J.P., CHILCOTT, C.N., MOORE, C.J., SPEISER, G. et TAGG, J.R. (2006).** A preliminary study of the effect of probiotic *Streptococcus salivarius* K12 on oral malodour parameters. *J Appl Microbiol.* 100:754-764.
- **CALVEZ S., BELGUESMIA Y. PREVOST H., DRIDER D. et KERGOURLEY G. 2009.** Les bactériocines : de la synthèse aux applications. Bacteries lactiques : physiologique, métabolisme,génomique et applications industrielles édition : Economica . Paris.
- **CANU A. ; PETER F. 2001.** Le préparateur sur pharmacie. Dossier 4, microbiologie- immunologie. P : 30-44-120-154.
- **CAO, L.T., WU, J.Q., XIE, F., HU, S.H. ET MO, Y. (2007).** Efficacy of nisin in treatment of clinical mastitis in lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 90:3980-3985.
- **CAPLICE E., FITZGERALD G., 1999.** Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 50(1-2) : 131-149
- **CARL S. 2009.** La Résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important. le parrainage des antimicrobiennes .p47 .
- **CAROLISSEN-MACKAY V., G. ARENDSE AND J. W. HASTINGS (1997).** Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. *International Journal of Food Microbiology.* 34, 1, 1-16.
- **CARROLL, S.B. DOEBLEY, J. GRIFFITHS, A.J.F. WESSLER, S. 2013.** Introduction à l'analyse génétique. De Boeck Supérieur.
- **CA-SFM. 2012** .Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. Recommandations
- **CASTALA, E., MONTEL, M. C., 2008.** Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactococcus*genus. *International Journal Food Microbiology*126, 271-273.
- **CAVERA, V.L., ARTHUR, T.D., KASHTANOV, D. ET CHIKINDAS, M.L. (2015).** Bacteriocins and their position in the next wave of conventional antibiotics. *Int J Antimicrob Agents* 46:494-501.

Références bibliographiques

- **CENATIEMPO, Y, J.M BERJEAUD, F BIET, ET C FREMAUX. 1996.** «Bactériocines de bactéries lactiques : données récentes sur leur structure, leur mode d'action et leurs déterminants génétiques.» *Le Lait* 76: 169-177.
- **CHAMMAS, G.I., SALIBA, R. AND BEAL, C. (2006).** Characterization of the fermented milk .Laban. with sensory analysis and instrumental measurements. *J. Food Sci.* 71: S156–S162
- **CHOPRA, I., O'NEILL, A., AND MILLER, K. 2003.** The role of mutators in the emergence of antibiotic-resistant bacteria. *Drug Resist Updates.* 6: 137-145.
- **CIZEIKIENE, D., JUODEIKIENE, G., PASKEVICIUS, A. ET BARTKIENE, E. (2013).** Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. *Food Contr.* 31:539-545.
- **COTTER, P.D., HILL, C. ET ROSS, R.P. (2005).** Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol.* 3:777-788.
- **COURTIN, J.-P. 2012.** L'homme et les lois de la nature 2. Lulu.com.
- **COVENTRY M. J., J. B. GORDON, M. ALEXANDER, M. W. HICKEY AND J. WAN (1996),** A food-grade process for isolation and partial purification of bacteriocins of lactic acid bacteria that uses diatomite calcium silicate. *Applied and Environmental Microbiology.* 62, 5, 1764-9.
- **DAESCHEL M. A., J. M. GUIRE AND H. AL-MAKHLAFI (1992),** Antimicrobial activity of nisin adsorbed to hydrophilic and hydrophobic silicon surfaces. *Journal of Food Protection.* 55, 731-735.
- **DAVID MZ, DAUM RS. (2014).** Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clin Microbiol Rev*; 23:616–87.
- **DE VUYST L. AND E. J. VANDAMME (1992),** Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. *Journal of General Microbiology.* 138 (Pt 3), 571-8.
- **DE VUYST L. AND F. LEROY (2007),** Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology.* 13, 4, 194-9.
- **DE VUYST L. ET VANDAMME E. J. (1994).** A bacterial potential of lactic acid bacteria. Dans: Bacteriocin of lactic acid bacteria. End. Blacki Academic & Profitionel, Londre.

Références bibliographiques

- **DELLAGLIO, F. DE ROISSART, H. TORRIANI, S. CURK, C. M. & JENSSENS, D. (1994).** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. *Lorica*, Uriage. . 25-116
- **Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R.J., Hugenholtz, J. (1996).** Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek*. **69**: 193-202.
- **Diep, D.B., Straume, D., Kjos, M., Torres, C. et Nes, I.F. (2009).** An overview of the mosaic bacteriocin pln loci from *Lactobacillus plantarum*. *Peptides* **30**:1562-1574.
- **Dierksen, K.P., Moore, C.J., Inglis, M., Wescombe, P.A. et Tagg, J.R. (2007).** The effect of ingestion of milk supplemented with salivaricin A-producing *Streptococcus salivarius* on the bacteriocin-like inhibitory activity of streptococcal populations on the tongue. *FEMS Microbiol Ecol*. **59**:584-591.
- **Dortu C., Thonart P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêt pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Enviorn*, 13: 143-154.
- **Dridier J., Prevost H. (2009).** Bactéries lactiques. Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles. Ed .Economica., Paris, 504p.
- **DRIESSEN ET AL 1995.** In. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation .*Antonie Van Leeuwenhoek* 76: p 186.
- **Driessen, A.J.M., Van den Hooven, H.W., Kuiper, W., Van de Kamp, M., Sahl, Ecker, K.F. 1992.** «Bacteriocin and food applications.» *Dairy Food Environ Sanit* 12: 204-209.
- **Ennahar , S, T Sashihara, K Sonomoto, and A Ishizaki .2000.** "Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity." *FEMS Microbiol Rev* 24: 85–106.
- **EUZÉBY, J.P., (1997).** List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature.*International Journal of Systematic Bacteriology* 7: 590-592.
- **FAO/WHO. 2001.** Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a joint FAO/WHO expert consultation.
- **Farber J.M. 1991.** Microbiological aspects of modified-atmosphere packaging technology: a review. *J. Food Prot.* 54: 58-70.
- **Field, D., Cotter, P.D., Ross, R.P. et Hill, C. (2015).** Bioengineering of the model lantibiotic nisin. *Bioengineered* **6**:187-192.

Références bibliographiques

- **FIGARELLA .J, LEYRAL.G et TERRET .M, 2007.** Microbiologie générale et appliquée DELGRAVE EDITION. France. P 102,104, 106, 107,108
- **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.
- **Frederiq P. 1946.** «Sur la pluralité des récepteurs d'antibiose d'E.coli.» *C.R Soc Biol* 140 : 1189-1194.
- **FRENEY, J., RENAUD, F., HANSEN, W., BOLLET, C., 2000.** Précis de Bactériologie clinique. Ed. Eska (Paris), p 1692
- **GAUDY.C et BUXERAUD.J ,2005.** Antibiotiques : pharmacologie et thérapeutique, ELSEVIER, Paris .P 14,23, 24
- **Giovanna, E. Felis, Elisa Salvettiet Sandra Torriani. 2016.** Systematics of Lactic Acid Bacteria: Current Status. In: *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications* (2nd Ed. F Mozzi, R R. Raya, and G M. Vignolo). John Wiley et Sons, Ltd, P. 395, pp. 25-31.
- **Gonzalez, C. J., Encinas, J. P., Garcia Lopez, M. L. &Otero, A. (2000).** Characterization and identification of lactic acid bacteria from fresh water fishes. *Food Microbiol*, **17**: 383-391.
- **Gratia A. 1925.** «Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille.» *C. R. Soc Biol* 93: 1040–1041.
- **Guetarni H. (2018).** les probiotiques et leur métabolites : une alternative de traitement des pathologies gastro-intestinales. *SAGREN Vol 02, No 02, pp 11-22*
- **GUIRAUD J.P. (2003).** Microbiologie alimentaire. Edition DUNOD. P.
- **Güllüce, M., Karadayı, M. et Barış Ö. (2013).** Bacteriocins: promising natural antimicrobials. In: **Méndez-Vilas, A. (Ed.)**. Microbial pathogens and strategies for combating them. Science, Technology and Education. Formatex, Badajoz. P. 1016-1027.
- **Guyonnet D., C. Fremaux, Y. Cenatiempo and J. M. Berjeaud (2000),** Method for rapid purification of class IIa bacteriocins and comparison of their activities. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**, 4, 1744-8.
- **H.G., Konings, R.N.H. et al. (1995).** Mechanistic studies of lantibiotic-induced permeabilization of phospholipid vesicles. *Biochemistry* **34**:1606-1614.

Références bibliographiques

- **HAMMES W.P. ET HERTEL C. (2009).** Genus I. *Lactobacillus*. Dans: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.
- **Hammi I. (2016).** Isolement et caractérisation de bactériocines produites par des souches de bactéries lactiques isolées à partir de produits fermentés marocains et de différentes variétés de fromages français. l'Université Sidi Mohamed Ben Abdallah.
- **HASSAN A.N. ET FRANK J.F., 2001.** Starter Cultures and their use. In: Applied Dairy Microbiology (Marth E.H. et Steele J.L.) 2e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 151-205.
- **Hassen, A. N. & Frank, J. F. (2001).** Starter cultures and their use. In **Marth, E. H. Food Science and Technology.** Marcel Dekker, New York. Pp: 151-206.
- **Hécharde Y., B. Derijard, F. Letellier and Y. Cenatiempo (1992),** Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. *Journal of General Microbiology.* **138**, 12, 2725-31.
- **Helander, I.M., Von Wright, A. et Mattila-Sandholm, T.-M. (1997).** Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends Food Sci Technol.* **8**:146-150.
- **Henderson J. T., A. L. Chopko and P. D. van Wassenaar (1992),** Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1.0. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* **295**, 1, 5-12.
- **Hillman, J.D., Mo, J., McDonell, E., Cvitkovitch, D. et Hillman, C.H. (2007).** Modification of an effector strain for replacement therapy of dental caries to enable clinical safety trials. *J Appl Microbiol.* **102**:1209-1219.
- **Hirsch, A, E Grinstead, H.R Chapman, et A.T.R Mattick. 1951** «A note on the inhibition of an anaerobic sporeformer in Swiss-type cheese by a nisin-producing Streptococcus. » *J Dairy Sci* 18: 205–206.
- **Holck, A, L Axelsson, S. E Birkeland, T Aukrust, and H Blom. 1992.** «Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706». *J Gen Microbiol.***138**: 2715-2720.
- **Holo H., O. Nilssen and I. F. Nes (1991),** Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. *Journal of Bacteriology.* **173**, 12, 3879-87.

Références bibliographiques

- **HOLS P., HANCY F., FONTAINE L., GROSSIORD B., PROZZI D. ET LEBLONDBOURGET N., (2005).** New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiology Reviews*, 29:435–463.
- **Holzappel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J. & Schillinger, U. (2001).** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.*, **73** : 365S–73S.
- **Hu, C.B., Malaphan, W., Zendo, T., Nakayama, J. et Sonomoto, K. (2010).** Enterocin X, a novel twopeptide bacteriocin from *Enterococcus faecium* KU-B5, has an antibacterial spectrum entirely different from those of its component peptides. *Appl Environ Microbiol.* **76**:4542-4545.
- **HUGAS, M., GARRIGA, M ET AYMERICH, M.T. (2003).** Functionally of enterococci in meat product. *Int. J. Food Microbiol.* 88(2-3): 22-33. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 on beef by application of organic acids. *J. Food Prot.* 59: 370-373. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bacteriocin-producing *Pediococcus* during manufacture of fermented semi-dry sausage. *J. Food Protect.* 53: 194- 197.
- **Isolauri, E et S. Salminen. 2004.** Microbial-gut interactions in health and disease. Probiotics." *Best Pract Res ClinGastroenterol* 18(2): 299-313.
- **Jack R. W., J. R. Tagg and B. Ray (1995),** Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiological Reviews.* **59**, 2, 171-200.
- **Jack R. W., J. Wan, J. Gordon, K. Harmark, B. E. Davidson, A. J. Hillier, R. E. Wettenhall, M. W. Hickey and M. J. Coventry (1996),** Characterization of the chemical and antimicrobial properties of piscicolin 126, a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* JG126. *Applied and Environmental Microbiology.* **62**, 8, 2897-903.
- **JASNIEWSKI Jordane. (2008).** Etude des mécanismes d'action de bactériocines de la sous-classe IIa. Institut National Polytechnique de Lorraine.
- **Joerger M. C. and T. R. Klaenhammer (1986),** Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *Journal of Bacteriology.* **167**, 2, 439-46.
- **Joo, N.E., Ritchie, K., Kamarajan, P., Miao, D. et Kapila, Y.L. (2012).** Nisin, an apoptogenic bacteriocin and food preservative, attenuates HNSCC tumorigenesis via CHAC1. *Cancer Med.* **1**:295-305.

Références bibliographiques

- **Juven Benjamin J et Pierson Merle D. 1996.** Antibacterial Effects of Hydrogen Peroxide and Methods for Its Detection and Quantitation. *J. Food Protection*. Volume 59, Number 11, November. pp. 1233-1241(9).
- **Kaur, S. et Kaur, S. (2015).** Bacteriocins as Potential Anticancer Agents. *Front Pharmacol.*6:1-11.
- **KHODJA B. (2017).** Caractérisation phénotypique et moléculaire des souches de bactéries lactiques productrice de bactériocine. Thèse de doctorat. Université Djillali Liabes de Sidi Bel Abbes.
- **Kjos, M., Nes, I.F. et Diep, D.B. (2011).** Mechanisms of resistance to bacteriocins targeting the mannose phosphotransferase system. *Appl Environ Microbiol.* 77:3335-3342.
- **Klaenhammer T.R., 1988.** Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie.*, 70: 337-349
- **Klaenhammer, T.R. (1993).** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 12:39-86.
- **König, H. &Fröhlich, J. (2009).** Lactic acid bacteria. *Biology of Microorganism on Graps, in Must and in Wine.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 522 p.
- **Koo, S.P, A.S Bayer, et M.R Yeaman. 2001.** «Diversity in antistaphylococcal mechanisms among membrane-targeting antimicrobial peptides. » *Infection and immunity* 69: 4916-4922.
- **Langella P., Nouaille S., Commissaire J., Bolotine A.,Gruss A. et Le Loir Y.. 2001.** Characterization of host factors affecting heterologous protein secretion in *Lactococcuslactis*. *Lait* 81, 19-28.
- **LANSING M., PRESCOTT, JOHN P., HARLEY, DONALD A. KLEIN, (2003).** *Microbiologie De Boeck Supérieur*, P 549
- **LAURENT. F ,2009.** Principales β -lactamines : Pénicillines G, A, M, inhibiteurs de β - lactamases, Uréidopénicillines, Carboxypénicillines C1G, C2G, C3G, MonobactamesCarbapénèmes. Groupement Hospitalier Nord Lyon. P 8.
- **Lee, Y. K. 2009.** Probiotic microorganisms. In: handbook of probiotics and prebiotics (2nd ed. Y. K. Lee et S. Salminen), John Wiley et Sons, Inc. P. 606, pp. 1-176.
- **Leveau, J. Y. &Bouix, M. (1993).** *Microbiologie industrielle : les micro-organismes d'intérêt industriel. Tec et Doc, Lavoisier, Paris.* 612 p.

Références bibliographiques

- **Liu, W., Pang, H., Zhang, H. et Cai, Y. (2014).** Biodiversity of lactic acid bacteria. In: **Zhang, Y. et Cai, Y. (Ed.).** Lactic Acid Bacteria. Springer, Dordrecht.
- **M. MOOSAVI-NASAB, Z. ALAHDAD, et SH. NAZEMI , (2009).** Characterization of the Dextran Produced by *Leuconostoc mesenteroides* from Date Fruit Extract. Iran Agricultural Research, Vol. 27, No. 1-2, and Vol. 28 No. 1
- **MADIGAN.M et MARTINKO. J ,2007.** Biologie de Micro-organismes. Université Carbondale de l'Illinois du sud .11e édition. P 702,705, 711,860, 862.
- **Makhloufi Kahina Maya(2011).** Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. L'université Pierre et Marie curie.
- **Mameche-Doumandji A. 2008.** Purification et caractérisation de bactériocines produites par des bactéries lactiques isolées localement. Thèse de Doctorat, Université de Blida: 44-85.
- **Mariah S. Nabi I. 2017.** L'incidence des bactéries multi-résistantes 'BMR' en réanimation chu Tlemcen : intérêt du portage digestif du 15 octobre 2016 au 28 février 2017 : Pharmacie .Tlemcen : AbouBekr Belkaid.
- **Mathot A.G., Beliard E., Thanult D.,(1996).** Propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques en Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentation alimentaires. Bourgeois C.M., Larpent J-P. Tome 2, Tec & Doc, Lavoisier, pp: 432-450
- **Mattick , A.T.R, et A Hirsch.(1947).** «Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci.» *Lancet* 2: 5-7.
- **McAuliffe,(2001) O, T O'Keeffe, C Hill, and R.P Ross.** "Regulation of immunity to the two-component lantibiotic, lacticin 3147, by the transcriptional repressor LtnR." *Mol Microbiol* 39: 982-993.
- **Metivier A., P. Boyaval, F. Duffes, X. Dousset, J. P. Compoin and D. Marion (2000),** Triton X-114 phase partitioning for the isolation of a pediocinlike bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. *Letters in Applied Microbiology.* **30**, 1, 42-6.
- **MOFREDJ, A., BAHLOUL, H., CHANUT, C., 2007.** *Lactococcuslactis*: un pathogène opportuniste. Revue générale. *Médecine et Maladies infectieuses* 37, 200-207.

Références bibliographiques

- **Mokoena, M.P. (2017).** Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens. *Molecules* 22:1255.
- **Monnet V, Latrille E, Béal C et Corrieu G. (2008).** Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc. Lavoisier. Paris, 512-592.
- **Montville, T.J, and Y Chen. 1998.** "Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions." *Appl Microbiol Biotechnol* 50: 511-519.
- **MOUTON.Y, BINGEN.E, DEBOXKER.Y et DUBREUIL.L, 2000.** Antiviraux Anti-infectieux. Éditions John LibbeyEurotext. Paris.P116.
- **Muriana P. M. and T. R. Klaenhammer (1991),** Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. *Applied and Environmental Microbiology.* **57**, 1, 114-21.
- **Naghmouchi, K., Baah, J., Hober, D., Jouy, E., Rubrecht, C., Sane, F. et al. (2013).** Synergistic effect between colistin and bacteriocins in controlling Gram-negative pathogens and their potential to reduce antibiotic toxicity in mammalian epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother.* **57**:2719-2725.
- **Nes, I. F., S.S Yoon¹, et D.B Diep. 2007.** «Ribosomally Synthesized Antimicrobial Peptides (Bacteriocins) in Lactic Acid Bacteria.» *Review Food Sci Biotechnol* 16: 675-690 .
- **Nes, I.F. et Holo, H. (2000).** Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Peptide Sci.* 55:50-61.
- **Nicholls, D.J, and S.J Ferguson. 1992.** *Bioenergetics: Chemiostatic energy transduction.* 2. Edited by D.G Nicholls, & S.J Ferguson. London: Académie Press
- **Nieto Lozano J. C., J. N. Meyer, K. Sletten, C. Pelaz and I. F. Nes (1992),** Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *Journal of General Microbiology.* **138 (Pt 9)**, 1985-90.
- **NIGUTOVA, K., MOROVSKY, M., PRISTAS, P., TEATHER, R.M., HOLO, H., JAVORSKY, P., 2007.** Production of enterolysin A by rumen *Enterococcus faecalis* strain and occurrence of enlA homologues among ruminal Gram+ cocci. *Journal of Applied Microbiology* 102, 563-569.

Références bibliographiques

- **Nissen-Meyer J., H. Holo, L. S. Havarstein, K. Sletten and I. F. Nes (1992)**, A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *Journal of Bacteriology*. **174**, 17, 5686-92.
- **O' Sullivan, L., Morgan, S. M., Ross, R. P. and Hill, C. (2002)**. « Elevated enzyme produced by *Lactococcus lactis* DPC5552. J., release from Lactococcal starter cultures on exposure to the lantibiotic Lacticin 481 ». *Dairy Sei.* 85: 2130-2140
- **Parada, J.L., Caron, C.R., Medeiros, A.B.P. et Soccol, C.R. (2007)**. Bacteriocins from lactic acid bacteria: Purification, properties and use as biopreservatives. *Braz Arch Biol Technol.* 50:521-542.
- **Parente E. and A. Ricciardi (1999)**, Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **52**, 5, 628-38.
- **Parente E., Moles M., Ricciardi A. 1996**. Leucocin F10, a bacteriocin from *Leuconostoc carnosum*. *International Journal of Food Microbiology*. 33, 2-3, 231-43.
- **Patrzykat, A, C.L Friedrich, L Zhang, V Mendoza, and R.E Hancock. 2002**. "Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in Escherichia coli." *Antimicrob Agents Chemother* 46: 605-614.
- **Perez, R.H., Zendo, T. et Sonomoto, K. (2014)**. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): Various structures and applications. *Microb Cell Fact.* 13:1-13.
- **Perronne Christain. (1999)**. Maladies infectieuses, volume 1. pp65.
- **PERRY.J, STALEY.J et LORY.S, 2002**. Microbiologie. Édition par Sinauer Associates .États-Unis. P 160,163, 164,165
- **Peschel A. 2002**. "How do bacteria resist human antimicrobial peptides?" *Trends in microbiology* 10: 179-186.
- **Piard J. C., P. M. Muriana, M. J. Desmazeaud and T. R. Klaenhammer (1992)**, Purification and partial characterization of lacticin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481. *Applied and Environmental Microbiology*. **58**, 279-284.
- **PILET M.F., MAGRAS C., FEDERIGH M., 2005**. Bactéries lactiques. In : bactériologie alimentaire (Federighi M.). 2e Ed., *Economica*. Paris. 219-240.

Références bibliographiques

- **Pilet, M. F., Magras, C. et Federighi, M. (1998).** Bactéries lactiques. Polytechnica, Paris. Pp : 235-260.
- **POT B., 2008.** The taxonomy of lactic acid bacteria
- **PRESCOTT, HARLEY et KLEIN, 2007** .Microbiologie .2e édition française. P 806, 807,813, 819
- **Rammelsberg M., E. Müller and F. Radler (1990),** Caseicin 80: Purification and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus casei*. *Archives of Microbiology*. **154**, 249-252.
- **Rea, M.C., Clayton, E., O'Connor, P.M., Shanahan, F., Kiely, B., Ros, R.P. et al. (2007).** Antimicrobial activity of lacticin 3,147 against clinical *Clostridium difficile* strains. *J Med Microbiol*. **56**:940-946.
- **Revol-Junelles A. M., R. Mathis, F. Krier, Y. Fleury, A. Delfour and G. Lefebvre (1996),** *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Mesenteroides* FR52 synthesizes two distinct bacteriocins. *Letters in Applied Microbiology*. **23**, 2, 120-4.
- **Rodriguez J.M., Martinez M.I., Kok J. (2002).** Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Crit. Rev. Food Sci. Nul*, 42: 91-121.
- **SCARDOVI, V.,(1986).** Section 15.Irregular nonsporing.Gram-positive rods. Genus *Bifidobacterium*Orla- Jensen 1924. In: Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E., Sharpe and J.G. Holt (Eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 9th Edn., Williams and Wilkins Co., Baltimore, 2: p 1418-1434.
- **SCHILLINGER U. ET LÜCKE K. (1989).** Antimicrobial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol*. 55: 1901-1906.
- **SHAH, N.P. ,(2000) :** Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods, *Journal of Dairy Science*, **83**, 894-907
- **SHEHATA, M., EL SOHAIMY, S., EL-SAHN, M., & YOUSSEF, M. (2016).**Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bilesalt hydrolase activity. *Annals of Agricultural Science*, 61(1), 65–7
- **Shin, J.M., Gwak, J.W., Kamarajan, P., Fenno, J.C., Rickard, A.H. et Kapila, Y.L. (2016).** Biomedical applications of nisin. *J Appl Microbiol*. **120**:1449-1465.
- **Stiles, M. and Holzapfel, W. (1997).** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36, pp: 1-29.

Références bibliographiques

- **Sylvie C.2009.**Art : La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important!
- **Tagg J. R., A. S. Dajani and L. W. Wannamaker (1976),** Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriological Reviews.* **40**, 3, 722-56.
- **TAGG J.R. ET MCGIVEN A.R. (1971).** Assay system for bacteriocins. *J. Appl. Microbiol.* 21: 943.
- **TALBERT.M, WILLOQUET.G et GERVAIS.R ,2009.** Pharmaco clinique, Wolters Kluwer France. P 641, 648,655
- **TAYLOR M.J., BANDI C. et HOERAUF A. 2005.** Wolbachia bacterial endosymbionts of filarial nematodes. *AdvinParasitol.* 60: 245-284.
- **THOMPSON J.K, M.A COLLINS. ET W.D. MERCER, (1996)** Characterisation of a proteinaceous antimicrobial produced by *Lactobacillus helveticus* CNRZ 450.*J. Appl. Bacteriol,* 80 338– 348.
- **Van Staden, A.D., Brand, A.M. et Dicks, L.M. (2012).** Nisin F-loaded brushite bone cement prevented the growth of *Staphylococcus aureus* in vivo. *J Appl Microbiol.* **112**:831-840.
- **Vollenweider S., 2004.** 3-hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biotech.,* 64: 16-27.
- **Wan J., J. Gordon, M. W. Hickey, R. F. Mawson and M. J. Coventry (1996),** Adsorption of bacteriocins by ingestible silica compounds. *Journal of Applied Bacteriology.* **81**, 2, 167-73.
- **Yala D., Merad A.S., Mohamedi D et OuarKorich M.N. 2001.** Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine du Maghreb* n°91.
- **Yang R., M. C. Johnson and B. Ray (1992),** Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology.* **58**, 10, 3355-9.

Annexes

Annexe I : Composition des milieux de cultures (Formule en g/l d'eau distillée)

➤ Milieu MRS (de Man Rogosa et Sharpe, 1960)

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

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

- Infusion de viande de bœuf3000 cm³
- Peptone de caséine17,5 g
- Amidon de maïs1,5 g
- Agar-agar17 g
- pH 7.4 Autoclavage 120°C/ 20 minutes

➤ Gélose nutritive

- Extrait de viande1 g
- Extrait de levure2 g
- Peptone5 g
- Chlorure de sodium5 g
- Agar-agar15 g
- Eau distillée1000 ml
- pH 7,4 Autoclavage 120 °C pendant 20 minutes

➤ **Bouillon nutritif**

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

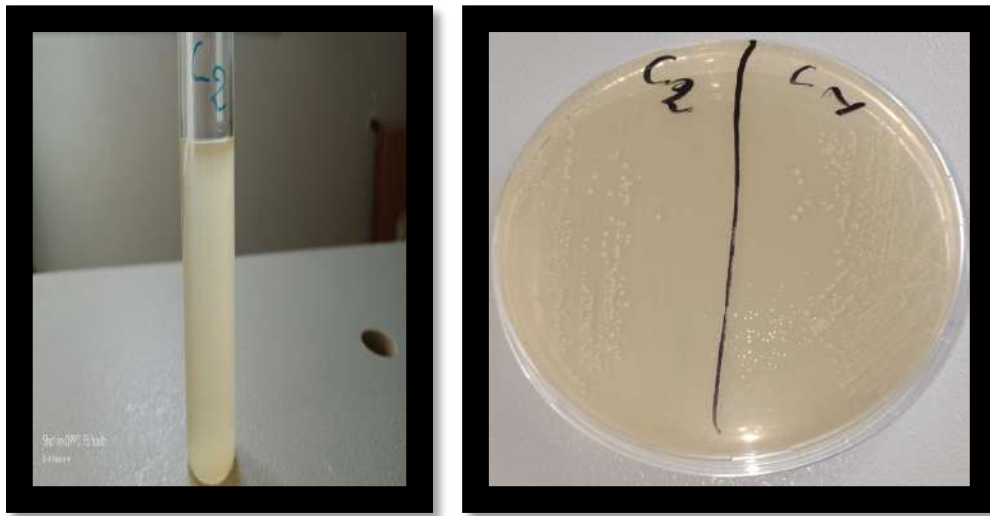
➤ **Milieu Hektoen (JOFFIN et GUY, 2006).**

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

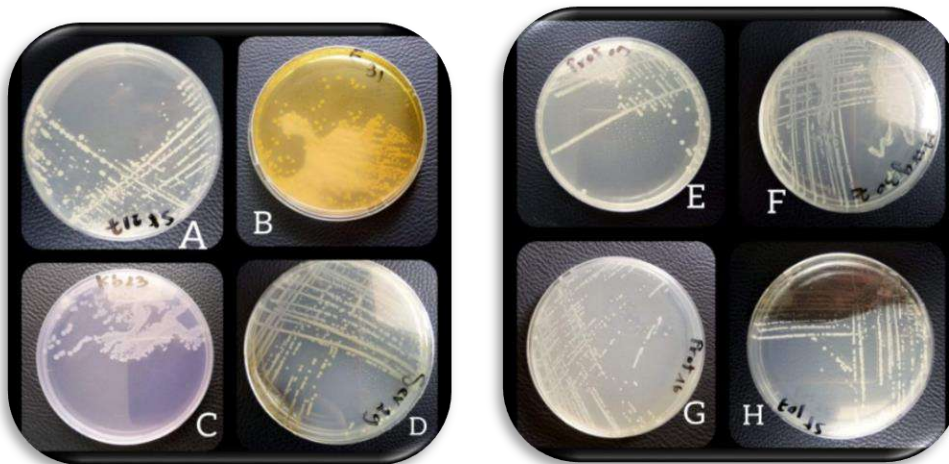
➤ **Gélose de MacCONKEY**

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

Annexe II : Les bactéries utilisées dans ce travail



Aspect des bactéries lactiques sur milieu MRS liquide et solide



Aspect de quelques bactéries pathogènes multirésistantes chacune sur son milieu solide approprié :

A : Aspect de *Staphylococcus Sp217.*, B : Aspect d'*E.coli Sp31* sur GN C: Aspect de *Klebsiella Sp23* sur milieu Macconkey., D : Aspect de *Serratia Sp29* sur GN., E : Aspect de *Proteus Sp29* sur GN., F : Aspect de *Morganella Sp30z* sur GN., G : Aspect de *Proteus Sp16.*, H : Aspect de *Staphylococcus Sp107* sur GN.,