

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de L'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique.

Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques.

Département de Biochimie-Microbiologie.



Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention du diplôme de Master II en sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée.

Thème

**Isolement et purification de bactéries lactiques
productrices de bactériocines à partir de produits
laitiers.**

Présenté et soutenu par

Melle. AMMOURI Kamélia

Melle. REKIK Samia

Devant le jury composé de :

Grade

Président :	Mme. BEDOUHENE Samia	MCB
Promotrice :	Mme. ZENNIA Saliha	MCB
Co-promoteur :	Mr. SEBBANE Hillal	MAA
Examinatrice :	Mme. SENOUSI Chahra	MAA

Année universitaire : 2018/2019.

Sommaire

Remerciements

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 01

Partie I : Synthèse bibliographique

I. Les bactéries lactiques

1.1. Définition et caractéristiques des bactéries lactiques 02

1.2. Origine et habitat 02

1.3. Taxonomie et classification 03

1.4. Voies métaboliques 07

1.5. Intérêt des bactéries lactiques 08

 1.5.1. Dans l'industrie alimentaire 08

 1.5.2. Dans le domaine thérapeutique 10

1.6. Les bactéries lactiques comme probiotiques 10

1.7. Les facteurs inhibiteurs produits par les bactéries lactiques 11

II. Les bactériocines des bactéries lactiques

2.1. Définition et caractéristiques principales 12

2.2. Nomenclature et propriétés 13

2.3. Classification des bactériocines 14

2.4. Mode d'action 16

2.5. Biosynthèse et régulation 17

2.6. Conditions de production des bactériocines 21

2.7. Les facteurs influençant la production des bactériocines 21

2.8. Les applications des bactériocines 23

Sommaire

Partie II : Partie expérimentale

Chapitre I: Matériel et méthode

1.1. Matériel	25
1.2. Méthodes	25
1.2.1. Préparation des échantillons	25
1.2.2. Isolement et purification des bactéries lactiques	26
2.2.1. Détermination de l'appartenance des différents isolats aux bactéries lactiques	26
2.2.2. La purification des souches des souches	27
1.2.3. La conservation des souches de longue durée	28
1.2.4. Revivification et préparation d'inoculum	28
1.2.5. La standardisation des souches	28
1.2.6. Screening des souches productrices de bactériocines	28
2.6.1. Méthode directe	28
2.6.2. Méthode indirecte	30
1.2.7. Détermination de la nature protéique des bactériocines par électrophorèse PAGE-SDS	31
1.2.8. Identification des souches bactériennes productrices de bactériocines	32
2.8.1. Détermination du type fermentaire	32
2.8.2. La fermentation des sucres	32
2.8.3. Croissance dans des conditions hostiles	33
8.3.1. Différentes concentration en NaCl	33
8.3.2. Culture à différents pH	33
8.3.3. Culture à différentes températures	33
8.3.4. La thermorésistance	33

Sommaire

Chapitre II : Résultats et discussion

2.1. Isolement et purification des souches	35
2.2. Résultats du screening des souches productrices des bactériocines	36
2.2.1. Méthode directe.....	36
2.2.2. Méthode indirecte	37
2.3. Résultat de l'électrophorèse PAGE-SDS.....	39
2.4. Identification des bactéries lactiques	41
2.4.1. Identification au stade genre	41
2.4.2. Identification au stade espèce	42
Conclusion	44

Références bibliographiques

Annexes

,

Remerciements

*Nous adressons notre reconnaissance et nos plus sincères remerciements à notre promotrice, Madame **ZENNIA Saliha**, pour ses conseils scientifiques judicieux, et l'aide qu'elle nous a apporté dans la réalisation de ce travail et surtout pour ses qualités humaines.*

*Nos chaleureux remerciements s'adressent à notre copromoteur, Monsieur **SEBBANE Hillal**, pour ses encouragements, sa disponibilité exceptionnelle, son inquiétude et l'aide qu'il nous a apporté durant toute la période de réalisation de ce travail.*

*Nous remercions également Madame **BEDOUHENE Samia**, pour l'honneur qu'elle nous a fait d'accepter de présider le jury d'évaluation et d'examiner ce mémoire, vos remarques ne feront qu'améliorer ce travail.*

*Nos remerciements les plus respectueux vont également à Madame **SENOUSSI Chahra**, qui nous a fait l'honneur d'accepter d'examiner ce travail ; qu'elle trouve ici l'expression de notre profond respect et de notre profonde gratitude.*

Nous tenons à adresser, notre respect et nos vifs remerciements à toutes les personnes ayant apporté leur contribution, de près ou de loin à notre travail de recherche.

A la fin nous remercions chaleureusement nos familles respectives et nos amis pour leurs soutient et leurs encouragements.

Liste des abréviations

BAL	Bactéries de l'acide lactique
G/C	Guanine / Cytosine
UFC	Unité Formant Colonie
ADN	Acide désoxyribonucléique
Zi	Zone d'inhibition
pH	Potentiel hydrogène
T°	Température
NaOH	Hydroxyde de sodium (soude)
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GRAS	Généralement reconnu sans risque
h	Heure
NaCl	Chlorure de sodium
%	Pourcentage
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
ATB	Antibiotique
ECBU	Examen cytobactériologique des urines
O ₂	Oxygène
DO	Densité optique
nm	Nanomètre
D	Dextrogyre
L	Lévogyres
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
Lb.	<i>Lactobacillus</i>
Sc.	<i>Streptococcus</i>
Lc.	<i>Lactococcus</i>
Ln.	<i>Leuconostoque</i>
CO ₂	Dioxyde de carbone
FAO	Food and agriculture (Organisation des Nations Unis pour l'alimentation et l'agriculture)
C ₄ H ₆ O ₂	Diacétyl
KDa	Kilodalton
Transporteur ABC	ATP Binding Cassette
GG	Double glycine
K ₂ HPO ₄	Hydrogénophosphate de potassium
KH ₂ PO ₄	Phosphate de potassium monobasique
ml	Millilitre
SDS	Dodécylsulfate de sodium

Liste des figures

Figure 1 : L'arbre phylogénétique des bactéries lactiques	03
Figure 2 : Représentation schématique des principales voies de fermentation des Hexoses chez les bactéries lactiques.....	08
Figure 3 : Mécanisme d'action par formation de pores des lantibiotiques	16
Figure 4 : Schéma du mode d'action des bactériocines de la classe IIa	17
Figure 5 : Régulation de la production, modification post-traductionnelle et auto-immunité de la nisine	18
Figure 6 : ABC-transporteur avec le domaine protéasique	19
Figure 7 : Schéma de la biosynthèse de la production des bactériocines de la sous classe IIa, montrant : la régulation, la synthèse, le transport et l'immunité.....	20
Figure 8 : Les différents domaines d'applications des bactériocines des bactéries lactiques ...	24
Figure 9 : Protocole d'isolement et de purification des bactéries lactiques.....	27
Figure 10 : Protocole de screening des souches productrices de bactériocines par méthode directe	29
Figure 11 : Protocole de screening des souches productrices de bactériocines par méthode indirecte.	31
Figure 12 : Protocole d'identification des souches dans des conditions hostiles.	34
Figure 13 : Activité antibactérienne des quatre souches vis-à-vis des souches cibles révélée par méthode directe.	36
Figure 14 : L'activité antibactérienne de la souche S24 vis-à-vis de la souche cible <i>E. coli</i> ATCC 25922 révélée par méthode indirecte.	37
Figure 15 : Les résultats du test indirect obtenus lors d'utilisation des surnageants des bactéries lactiques contre <i>S. aureus</i> ATCC 25923.	38
Figure 16 : Gel électrophorétique de la migration des quatre souches identifiées	39
Figure 17 : Courbe de calibration PAGE-SDS.....	40

Liste des tableaux

Tableau I : Les différents genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques ..	06
Tableau II : Quelques applications des bactéries lactiques.	09
Tableau III : Principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques.....	11
Tableau IV : La classification de quelques bactériocines des bactéries lactiques.....	15
Tableau V : Les résultats d'isolement et purification des souches de bactéries lactiques.	35
Tableau VI : Les résultats des différents tests effectués pour l'identification des souches.	41
Tableaux VII : Les résultats du profil fermentaire.	43
Tableau VIII : Les quatre bactériocines de la classe III	43

Résumé

Les bactéries lactiques font naturellement partie de notre environnement et notre alimentation. Connues depuis longtemps, pour leur propriété de produire des substances antimicrobiennes et leur utilisation dans la fermentation et la bio-préservation des aliments et comme une alternative au traitement des anti-bio résistances des bactéries pathogènes. La recherche de souches bactériennes lactiques productrices des substances antimicrobiennes a été entreprise à partir de cinq produits laitiers : lait cru (lait de vache, lait de chèvre), lait fermenté (Activia), Lben industriel, camembert, yaourt nature. L'isolement des bactéries lactiques à partir de ces produits laitiers nous a permis d'obtenir 36 souches à Gram positif et catalase négative, que nous avons purifié et conservé. L'interaction des souches tests et les souches cibles (*E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923) à donner des résultats positifs pour quatre souches uniquement, se traduisant par l'apparition des zones d'inhibition à l'encontre de la souche pathogène *S. aureus* ATCC 25923 lors du test direct et indirect. L'étude des caractéristiques phénotypiques, biochimiques et physiologiques (type fermentaire, croissance à différentes concentrations de NaCl (2%, 4% et 6,5%), croissance à différents pH (3.3, 6.5, 7, 9.6), croissance à différentes températures (10°C, 15°C, 30°C, 37°C, 45°C) et l'étude de la thermorésistance) a permis d'identifier deux espèces bactériennes : *Lactobacillus rhamnosus* et *Enterococcus faecium*.

Mots-clés : bactéries lactiques, bactériocines, activité antibactérienne, produits laitiers, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus rhamnosus*.

Summary

Lactic acid bacteria are a natural part of our environment and our diet. Known for a long time, for their property of producing antimicrobial substances and their use in the fermentation and bio-preservation of food and as an alternative to the treatment of anti-bio resistance of pathogenic bacteria. The search for lactic bacterial strains producing antimicrobial substances was undertaken from five dairy products: raw milk (cow's milk, goat's milk), fermented milk (Activia), industrial Lben, camembert, natural yoghurt. The isolation of lactic acid bacteria from these dairy products allowed us to obtain 36 Gram-positive and catalase-negative strains, which we purified and preserved. The interaction of the test strains and the target strains (*E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923) gave positive results for only four strains, resulting in the appearance of zones of inhibition against the *S. aureus* ATCC 25923 pathogenic strain during the direct and indirect test. The study of phenotypic, biochemical and physiological characteristics (fermentative type, growth at different concentrations of NaCl (2%, 4% and 6,5%), growth at different pH (3.3, 6.5, 7, 9.6), growth at different temperatures (10°C, 15°C, 30°C, 37°C, 45°C) and the thermoresistance study) identified two bacterial species: *Lactobacillus rhamnosus* and *Enterococcus faecium*.

Key words: lactic acid bacteria, bacteriocins, antibacterial activity, dairy products, *Enterococcus faecium*, *lactobacillus rhamnosus*.

Introduction générale

Introduction générale

Introduction

Les organismes vivants se sont dotés, au cours de l'évolution, de systèmes de défense afin de se protéger des agressions bactériennes. Des peptides à activité antimicrobienne sont retrouvés chez les mammifères (défensives), les amphibiens (magainines, dermaseptines), les insectes (cécropines, cératoxines) et chez les bactéries (bactériocines). Un intérêt pour ces molécules s'est récemment développé, et notamment pour les bactériocines de bactéries lactiques en raison de leur utilisation potentielle en industrie agro-alimentaire (Dany MORISSET, 2003).

L'intérêt des bactériocines des bactéries lactiques réside d'une part dans leur effet antimicrobien à spectre large ou étroit et d'autre part dans leur sûreté pour la santé humaine, vue leur sensibilité aux protéases digestives, et leur non toxicité pour les cellules eucaryotes. Ces substances antimicrobiennes ont la capacité de cibler sélectivement les bactéries pathogènes ou altérantes, sans pour autant inhiber les bactéries indispensables.

Ces substances bioactives présentent également une grande tolérance aux variations de pH et aux traitements thermiques. Tous ces critères suggèrent que les bactériocines peuvent être un substituant idéal des conservateurs chimiques (Dortu et Thonart, 2009).

La compréhension du mode d'action de ces molécules constitue non seulement un intérêt du point de vue fondamental mais également sur le plan appliqué. En effet, il paraît essentiel de déterminer les conditions favorables à une activité optimale des bactériocines afin d'envisager leur utilisation future en industrie agro-alimentaire. De plus, avec le précédent des antibiotiques, l'apparition de souches résistantes suscite des craintes.

Afin de définir le mécanisme d'action des bactériocines, de nombreuses études ont été menées. Elles reposent sur la comparaison, entre les souches sensibles et les souches résistantes, de données génétiques ou physiologiques ou encore sur l'étude des relations structure-fonction de ces peptides antimicrobiens (Dany MORISSET, 2003).

C'est dans ce cadre que s'inscrit notre travail, dont les objectifs sont les suivants :

- L'isolement et la purification de différentes souches de bactéries lactiques à partir de différents produits laitiers ;
- La mise en évidence de l'activité antibactérienne des bactériocines produites par les bactéries lactiques ;
- L'identification des souches bactériennes productrices de bactériocines.

Etude

Bibliographique

I. Les bactéries lactiques**1.1. Définition et caractéristiques des bactéries lactiques**

Les bactéries lactiques appelées aussi bactéries de l'acide lactique (BAL) constituent un groupe très hétérogène de micro-organismes partageant divers aspects morphologiques, métaboliques et physiologiques et dont la caractéristique fondamentale est la production de quantités appréciables d'acide lactique comme produit principal de leur métabolisme fermentaire (Marshall et Law, 1984 ;Axelsson, 1993).

Les BAL sont un groupe de bacilles ou coccobacilles à Gram positif qui ont moins de 55 % de contenu G+C dans leur ADN (à l'exception des bifidobactéries (Ammour., 2004)). Ce sont des cellules procaryotes, hétérotrophes et chimioorganotrophes. Elles sont immobiles, unicellulaires (donc constituées obligatoirement d'une seule paroi, un cytoplasme renfermant les acides nucléiques, principalement l'ADN chromosomique et parfois des plasmides. Le cytoplasme est entouré d'une membrane cytoplasmique. (Stiles et Holzapfel ; 1997)). Elles sont non sporulées, anaérobies mais aérotoles (microaérophiles).

Les bactéries lactiques sont dépourvues de nombreuses activités enzymatiques comme la catalase, la nitrate réductase et le cytochrome oxydase, elles ne produisent pas d'indole ni d'acide sulfhydrique et certaines espèces hydrolysent la caséine. Elles sont protéolytiques, ne liquéfient pas la gélatine, et ne forment pas d'indole ni d'hydrogène sulfureux, ces bactéries sont également incapables de fermenter le glycérol (Dellaglio *et al.*, 1994; Salminen *et al.*, 2004).

En raison de leur faible capacité biosynthétique, ces bactéries ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (Dellaglio *et al.*, 1994).

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

1.2. Origine et habitat

Grace à leur souplesse d'adaptation physiologique, les bactéries lactiques peuvent coloniser des milieux très différents du point de vue physico-chimique et biologique ils sont donc dit « ubiquitaires ». Dans différents écosystèmes, les BAL sont capables d'exercer des effets bénéfiques ou plus rarement d'engendrer des altérations biologiques.

La source originale des bactéries lactiques est constituée par les plantes vertes, et suite à des processus d'évolution et d'adaptation, ces bactéries ont colonisé d'autres environnements et se trouvent ainsi dans divers habitats, tant que ceux-ci réunissent les conditions adéquates pour satisfaire leurs besoins nutritifs (Fenton, 1987 ; Kelly *et al.*, 1998 ; Carr *et al.*, 2002).

De cette manière, le lait auquel les BAL peuvent accéder à travers le corps de l'animal, les excréments ou les végétaux, est devenu un habitat caractéristique des bactéries lactiques, et ainsi elles se trouvent associées à divers produits laitiers fermentés (Dellaglio *et al.*, 1994). Il faut signaler en outre que les BAL font partie de la microflore naturelle de la bouche, du tractus intestinal et du vagin de l'espèce humaine et de nombreux animaux homéothermes (Holzapfel *et al.*, 1998 ; Sookkhee *et al.*, 2001).

1.3. Taxonomie et classification

La classification des bactéries lactiques repose principalement sur leur morphologie (bacilles ou coques), mais aussi sur les critères phénotypiques suivants (Axelsson, 2004) :

- le mode de fermentation du glucose ;
- la croissance à différentes températures (de 15 à 45°C) ;
- la nature de l'acide lactique (D, L ou DL) ;
- la tolérance ou l'intolérance aux fortes concentrations en sel (6,5%, 18% NaCl) ;
- la tolérance à l'acidité (des pH relativement bas), au milieu alcalin ou à l'éthanol ;
- l'hydrolyse de l'arginine, la formation de l'acétoïne ;
- la production des polysaccharides extracellulaires.

Orla-Jensen (1919), est le premier, qui a proposé une classification des bactéries lactiques. Une autre classification a été donnée par Kandler et Weiss, (1986), en divisant les bactéries lactiques en trois groupes distincts : homo-fermentaires strictes, hétéro-fermentaires facultatives et hétéro-fermentaires strictes.

A partir de 1990, une classification qui se base sur le séquençage de l'ARNr 16S a été proposée, ce dernier a permis d'organiser les genres des bactéries lactiques dans un arbre phylogénétique (Figure 1).

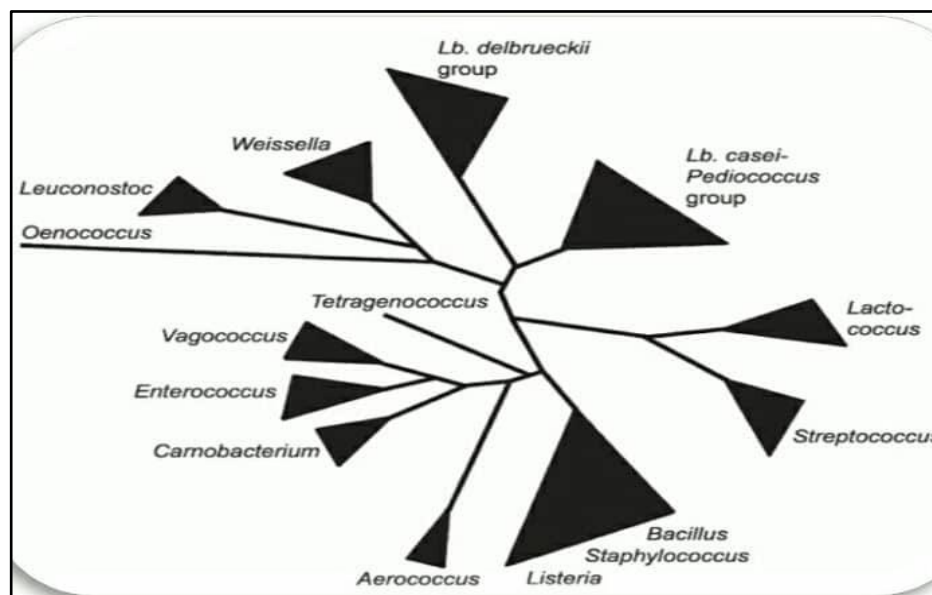


Figure 1 : L'arbre phylogénétique des bactéries lactiques (Axelsson, 2004).

Les bactéries lactiques peuvent se diviser en deux groupes selon le pourcentage G+C dans leur génome :

- Les actinomycètes dont le G+C > 50%, ce groupe renferme les genres : *Atopobium*, *Bifidobacterium*, *Corynebacterium*, et *Propionibacterium*.
- La branche des clostridiés, qui regroupe les bactéries dont G+C < 50%, ce groupe rassemble les principaux genres des bactéries lactiques : *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus*.

Les bactéries lactiques constituent les genres : *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella*.

D'autres genres ont récemment, été inclus dans le groupe des bactéries lactiques, il s'agit de : *Aerococcus*, *Microbacterium*, *Propionibacterium* et *Bifidobacterium* (Carr et al., 2002).

➤ Caractéristiques des principaux genres

Les bactéries lactiques sont un groupe hétérogène, chaque genre possède ses propres caractéristiques qui le différencient des autres, phénotypiquement et génotypiquement.

- **Genre *Lactobacillus***

Les bactéries du genre *Lactobacillus* ont des aspects variés allant du bacille long et fin au coccobacille en passant par la forme bâtonnet court ou légèrement flexueux. Ils sont Gram positif, non sporulés, fréquemment associés en chaînettes et habituellement immobiles. Les lactobacilles se montrent généralement plus résistants au stress acide que les lactocoques (Siegumfeldt et al., 2000). Les lactobacilles se répartissent en trois groupes selon leur profil fermentaire, d'après la classification de Kandler et Weiss (1986).

Le genre *Lactobacillus* a été subdivisé par Orla Jensen (1919) en trois groupes et cette classification est encore utilisée en milieu industriel :

-Groupe « thermobactérium » : Il comprend les lactobacilles homo-fermentaires thermophiles qui se développent à 45 °C mais pas à 15 °C. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation (lait, yaourts, fromages) sont *L. helveticus*, *L. jugurti*, *L. bulgaricus*, *L. lactis*, *L. acidophilus*, *L. leichamni*, *L. derbrueckii*, *L. kefirifaciens*, *L. mali*, etc.

- Groupe « streptobactérium » : Il regroupe les lactobacilles homo-fermentaires mésophiles qui se développent à 15 °C (ils peuvent être occasionnellement hétéro-fermentaires en fonction du substrat). Il comporte les espèces *L. casei* qui est les lactobacilles prédominant du lait, *L. plantarum* rencontré dans la choucroute, *L. curvatus*, *L. sake*, *L. acetotolerans*, *L. graminis*, *L. rhamnosus*, etc.

- Groupe « bêtabactérium » : Il comprend les lactobacilles hétéro-fermentaires. Les espèces les plus fréquents dans l'alimentation sont : *L. fermentum*, *L. fructivorans*, *L. hilgardii*, *L. sanfrancisco*, etc.

- **Genre *Streptococcus***

Ce genre 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*). L'espèce thermophile *Streptococcus thermophilus* se différencie par son habitat (lait et produits laitiers), et son caractère nonpathogène. Du fait de ses propriétés technologiques, c'est la seule espèce considérée comme un *Streptocoque lactique* (Laurent, 1998).

- **Genre *Lactococcus***

Le genre *Lactococcus* est formé de bactéries à Gram positif dont les cellules, en forme de coques, sont associées par paires ou en chaînettes de longueur variable. Elles sont dépourvues de catalase et ne sont pas capables d'utiliser l'oxygène mais se multiplient en sa présence (anaérobies aérotolérantes). Ces bactéries sont thermosensibles et ne peuvent pas croître en présence de 6.5% de NaCl ou à pH 9,6. Leur température optimale de croissance s'étend de 25°C à 35°C, respectivement pour les souches de *Lc. cremoris* et *Lc. lactis*.

Les *Lactococcus* sont capables de croître à 10°C mais pas à une température supérieure à 40°C (Dellaglio *et al.*, 1994).

- **Genre *Leuconostoc***

La famille des *leuconostocaceae*, contient des coques ovoïdes, pouvant être allongés ou elliptiques. Ce sont des cellules sphériques disposent en paire ou en chaîne, elles sont caractérisées par un métabolisme hétéro-fermentaire en convertissant le glucose en D-lactate et éthanol ou en acide acétique par la voie de transcétolase, elles sont incapables de dégrader l'arginine ce qui leurs distinguent des lactobacilles hétéro-fermentaires (Gonzalez *et al.*, 2007).

Les *leuconostocs* sont habituellement classés dans les anaérobies facultatifs, mais certains les considèrent comme des anaérobies aérotolérants. Ils sont exigeants et présentent souvent une auxotrophie pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels minéraux et les glucides (Dellaglio *et al.*, 1994). Ce genre comprend les espèces suivantes : *Ln. mesenteroides* avec ces sous espèce *Mesenteroides cremoris* et *dextranicum* et *Ln. lactis* et *Ln. Pseudomesenteroides* et *Ln. paramesenteroides* (Collins *et al.*, 1993; Laease, 2005).

- **Genre *Bifidobacterium***

Les cellules de *Bifidobacterium* se caractérisent par leur forme très irrégulière, souvent en V et Y, mais pouvant être coccoïde. Elles se différencient des autres bactéries lactiques par leur caractère anaérobie, leur G + C % élevé, et la présence d'une enzyme, la fructose-6-phosphate phosphocétolase. Celle-ci leur permet de fermenter les hexoses en produisant de l'acide acétique et de l'acide lactique, ainsi qu'en moindre proportion de l'éthanol et d'autres acides organiques.

Cette fermentation « lactique » a conduit à les rapprocher du groupe des bactéries lactiques. Leur température optimale de croissance est comprise entre 37°C et 41°C. Elles se développent à pH supérieur à 5. Elles sont isolées de l'homme et des animaux (Laurent, 1998).

- **Genre *Pediococcus***

Ce genre rassemble des coques homofermentaires dont la particularité qui les différencie des autres genres est le regroupement en paires ou en tétrades. Le genre *Pediococcus* est mésophile. Leur exigence nutritionnelle, leur faible activité protéolytique et le plus souvent leur incapacité à utiliser le lactose, ne leur permettent pas d'acidifier et de coaguler le lait.

Leur fermentation homolactique donne parfois de l'acide lactique racémique (acide D. L.-lactique), mais fréquemment la forme lévogyre L prédomine. Les espèces osmophiles non acidophiles ne donnent que cette forme (lévogyre). Ce genre est parfois utilisé comme levain lactique pour les charcuteries (Guiraud, 1998).

Nous présentons ci-dessous les caractéristiques des principaux genres lactiques :

Tableau I : Les différents genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques (Laurent, 1998).

Genre	Morphologie	Fermentation	Température optimale	Nombre d'espèce
<i>Lactobacilles</i>	Bacilles	Homo ou hétéro-fermentaires	thermophiles ou mésophiles	G1 :23 G2 :16 G3 :22
<i>lactococcus</i>	Coques	Homo-fermentaires	mésophiles	5
<i>Streptococcus</i>	Coques	Homo-fermentaires	mésophiles ou thermophiles	19
<i>Leuconostoc</i>	Coques	Hétéro-fermentaires	mésophiles	11
<i>Bifidobacterium</i>	Forme irrégulière	Acide acétique et lactique	mésophiles	25

1.4. Voies métaboliques

Les bactéries lactiques peuvent être divisées en deux groupes homo-fermentaires et hétéro-fermentaires (figure 2) basées sur les produits fabriqués à partir de la fermentation du glucose (Makhloufi, 2011).

1.4.1.Homo-fermentaires

Toutes les bactéries lactiques (à l'exception des genres : *Leuconstoc*, *Oenococcus*, *Weissella* et certains membres du genre *Lactobacillus*) entravent la voie de la glycolyse pour dégrader les hexoses (ex : glucose). Après son transfert vers la cellule, le glucose subit une phosphorylation pour se transformer en fructose qui est à son tour phosphorylé en fructose 1-6 di-phosphate puis clivé en dihydroxyacétone phosphate et glycéraldéhyde phosphate (GAP), ces deux derniers sont convertis en pyruvate. Le pyruvate est dans une dernière étape réduit en acide lactique qui est le produit unique: c'est la fermentation homolactique.

Dans les conditions défavorables telles la limitation du glucose, ces bactéries produisent également l'acide formique, l'acide acétique, l'éthanol et/ou le CO₂ par la voie de fermentation des acides mixtes (Mozziet *al.*, 2010).

1.4.2. Hétéro-fermentaires

Ce groupe de bactéries lactiques utilise la voie des pentoses phosphate (ou 6-phosphogluconate) qui consiste à une déshydrogénation du glucose, après sa phosphorylation, pour donner le 6-phosphogluconate qui subira une décarboxylation.

Le pentose résultant est clivé en glycéraldéhyde phosphate (GAP) qui suit la voie de la glycolyse donnant l'acide lactique et l'acétyle phosphate qui sera réduit en éthanol. En raison de la production de CO₂, d'éthanol ou de l'acétate en plus de l'acide lactique, cette fermentation est appelée hétéro-lactique (Salminen *et al.*, 2004).

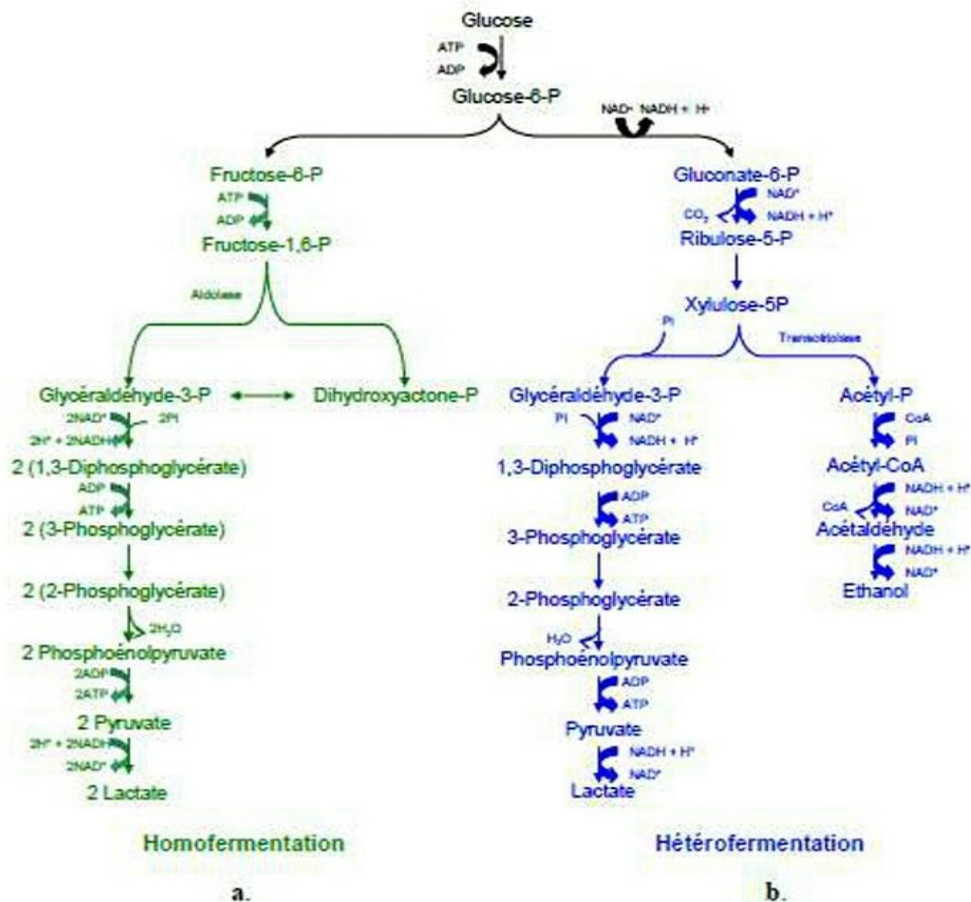


Figure 2 : Représentation schématique des principales voies de fermentation des Hexoses chez les bactéries lactiques (Makhloufi, 2012).

ATP : Adénosine triphosphate. Pi : Phosphate inorganique.

ADP : Adénosine diphosphate. NAD⁺/NADH,

H⁺ : Couple oxydant/réducteur du nicotinamide adénine di nucléotide.

1.5. Intérêt des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques jouent un rôle important que ce soit dans l'industrie alimentaire ou dans le domaine thérapeutique. Différentes applications des bactéries lactiques sont présentées dans le tableau II.

1.5.1. Dans l'industrie alimentaire

Les bactéries lactiques sont impliquées dans la fermentation et la bio-conservation de différents aliments. Ainsi, les souches de *Lactobacillus bulgaricus*, *Sterptococcus thermophilus* sont utilisées pour la production du yaourt, des fromages et des laits fermentés (Yateemet *al.*, 2008). Le vin, les poissons, les viandes, les charcuteries, le pain au levain entre autres sont aussi des produits de fermentation par des bactéries lactiques (Badiset *al.*, 2005).

L'utilisation de ces dernières a pour but l'amélioration des caractéristiques organoleptiques des produits fermentés et l'augmentation de leur durée de conservation sans l'utilisation de conservateurs chimiques grâce aux substances antimicrobiennes qu'elles secrètent (Dortu et Thonart, 2009).

Les souches utilisées en industrie alimentaire (Tableau II) doivent répondre à certains critères :

- absence de pathogénicité ou activité toxique ;
- capacité d'améliorer les caractéristiques organoleptiques ;
- capacité de dominance ;
- facilité de culture et de conservation, et maintenance des propriétés désirables durant le stockage (Marth et Steele, 2001).

Tableau II : Quelques applications des bactéries lactiques (Zhu *et al.*, 2009).

Souches lactiques	Applications	Références
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM	Probiotique	Altermannet <i>al.</i> (2005)
<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	Ferment de l'ensilage, levain, fermentation de la bière.	Dubchaket <i>al.</i> (2006)
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334	Probiotique, fermentation du lait, la flaveur des fromages	Dubchaket <i>al.</i> (2006)
<i>Lactobacillus casei</i> BL23	Probiotique, fermentation du lait, la flaveur des fromages	Kandler et Welss (1986)
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp, <i>bulgaricus</i> ATCC BAA-365	Fermentation du yaourt	Tamime et Robinson (1999)
<i>Lactobacillus helveticus</i> DPC 4571	Industrie fromagère	Callananet <i>al.</i> (2008)
<i>Lactobacillus johnsonii</i> NCC 533	Probiotique	Primoreet <i>al.</i> (2004)
<i>Lactobacillus plantarium</i> WCFSI	Conservation des aliments, tels que le lait, la viande et les végétaux, probiotique	Kleerebezemet <i>al.</i> (2003)
<i>Lactobacillus reuteri</i> F275	probiotique	Moritaet <i>al.</i> (2008)
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp, <i>sakei</i> 23 K	Conservation des aliments, fermentation de la viande	Chaillouet <i>al.</i> (2005)
<i>Lactobacillus lactis</i> subsp, <i>cremoris</i> MG1363	La fermentation des aliments laitiers, une souche modèle	Wegmannet <i>al.</i> (2007)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp, <i>mesenteroides</i> ATCC 8293	Fermentation d'aliment : choucroute, des légumes, production de dextrane.	Debchaket <i>al.</i> (2006)
<i>Streptococcus thermophilus</i> LMC 18311	Fermentation du fromage et du yaourt	Bolotin et al. (2006)

1.5.2. Dans le domaine thérapeutique

Les bactéries lactiques, présentes dans le tractus digestif de l'homme et des animaux, jouent un rôle non négligeable sur la santé de leur hôte. Incorporées dans les laits fermentés ou des aliments supplémentés, on leur attribue plusieurs effets thérapeutiques. Les substances antimicrobiennes qu'elles produisent contrôlent la prolifération de pathogènes indésirables (Corcy et Lepage, 1991).

Parmi leurs rôles bénéfiques sur la santé :

- elles élaborent des enzymes qui viennent en aide au métabolisme de leur hôte, plus particulièrement pour les individus déficients en lactase ;
- leurs propriétés anti-cholestérol interviennent en diminuant le taux de cholestérol sérique ;
- elles peuvent réduire les chances d'apparition du cancer du côlon en éliminant les substances pro-carcinogènes et en intervenant sur les enzymes fécales susceptibles de transformer les substances pro-carcinogènes en substances carcinogènes ;
- elles interviennent sur la suppression des tumeurs par activation des macrophages.

1.6. Les bactéries lactiques comme probiotiques

Les probiotiques sont définis comme des micro-organismes vivants qui lorsqu'ils sont ingérés en quantité appropriées ont un effet bénéfique sur la santé de l'hôte (FAO, 2001) ils contiennent uniquement les microorganismes non pathogènes.

De nombreux microorganismes sont considérés comme probiotiques, parmi eux des bactéries lactiques telles que *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Lb. acidophilus*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. casei*, et *Streptococcus thermophilus* (*Sc. thermophilus*).

Lb. bulgaricus et *Sc. Thermophilus* sont les premières souches bactériennes qui ont été utilisées pour la fabrication de yaourt (Makhloufi., 2012).

➤ Applications des probiotiques

Grâce à leurs propriétés nutritionnelles et thérapeutiques utilisées par les industries agroalimentaires et pharmaceutiques, les probiotiques sont parfois utilisés comme compléments dans des produits comme les yaourts ou bien dans des préparations pharmaceutiques sous forme de gélules. De nombreuses souches bactériennes ont montré leurs bénéfices sur la santé humaine et sont déjà commercialisées par Danone telles que *Bifidobacterium lactis* (Makhloufi., 2012).

Parmi les principaux rôles bénéfiques, Makhloufi (2012) cite :

- Le traitement des diarrhées : les souches probiotiques *Lb. acidophilus* et *Lb. casei*, qu'on retrouve entre autre dans le lait fermenté, ont fait l'objet d'études montrant leur efficacité contre la diarrhée associée à la prise d'antibiotiques en milieu hospitalier (Penner *et al.*, 2005).

- Le traitement gastrique : des travaux prometteurs sur l’amélioration des traitements gastriques sont en cours sur la conjonction des probiotiques aux antibiotiques en vue de limiter les infections à *Helicobacter pylori*, une bactérie impliquée dans la survenue et les récurrences des gastrites et ulcères gastroduodénaux. Les études sur ce traitement se poursuivent car son efficacité reste à démontrer (Reid *et al.*, 2003).

Les applications des probiotiques se sont énormément étendues ces dernières années, tant dans le domaine agroalimentaire que médical (tableau III).

Tableau III : Principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques (Patterson, 2008).

Effets intestinaux	Effets sur le système immunitaire	Autres effets
<p>Contrôle des troubles suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mauvaise digestion du lactose. • Diarrhée due aux rétrovirus. • Syndrome du colon irritable. • Infection par <i>Helicobacter Pylori</i>. • Prolifération bactérienne dans l’intestin grêle. • Maladies inflammatoires chroniques de l’intestin (colite ulcéreuse et maladie de Crohn). 	<ul style="list-style-type: none"> • Modulation Immunitaire. • Réduction des réactions des risques d’infection par des agents pathogènes courants (<i>Salmonella, shigella</i>). • Répression des réactions allergiques par réduction de l’inflammation. 	<p>Réduction du risque de :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Maladie de voies urinaires. • Certains cancers (colorectal, vessie, col utérin, sein). • Infection des voies respiratoires supérieures et infections connexes. • Réduction du cholestérol sérique et de la pression artérielle.

1.7. Les facteurs inhibiteurs des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques ont également un rôle dans la production des substances inhibitrices qui ont un effet sur l’action des bactéries pathogènes.

1.7.1. Acides carboxyliques

L’acide lactique est le métabolite majeur issu du métabolisme fermentaire utilisé par certaines bactéries lactiques. Cet acide organique baisse le pH à un niveau conduisant à l’inhibition de la croissance des bactéries appartenant au genre *Listeria*, *Staphylococcus* ou *Clostridium* et des bactéries des flores de surface acido-sensibles (Oh et Marshall, 1993 ; Holzapfelet *al.*, 1995).

L'acide acétique a un effet inhibiteur plus important sur *L. monocytogenes* (Ahamad et Marth, 1989) mais les deux acides organiques peuvent agir de manière synergique. En effet, l'acide lactique abaisse le pH du milieu, ce qui augmente la toxicité de l'acide acétique (Adams et Hall, 1988). La plupart du temps, les acides organiques faibles ne diminuent pas la viabilité des microorganismes mais retardent leur croissance en allongeant par exemple la phase de latence (Oh et Marshall, 1993 ; Holzapfel *et al.*, 1995).

1.7.2. Peroxyde d'hydrogène

Les bactéries lactiques sont capables de produire du peroxyde d'hydrogène (Van de Guchte *et al.*, 2001). Cette molécule neutre diffuse librement à travers la membrane cellulaire. Ce produit est une molécule très délétère pour la cellule réagissant sur de nombreux composants cellulaires essentiels tels que l'ADN, les protéines et les lipides ce qui entraîne la mort de la cellule. Le peroxyde d'hydrogène possède donc un effet inhibiteur sur la croissance de microorganismes ne possédant aucun système de défense adéquat comme les catalases (Touati, 2000).

1.7.3. Le diacétyl

Il est synthétisé par différents genres de bactéries lactiques comme *Lactococcus sp.*, *Leuconostoc sp.*, *Lactobacillus sp.* et *Pediococcus sp.* Le diacétyl (C₄H₆O₂) est un des composants aromatiques essentiels du beurre. Il a des propriétés antimicrobiennes qui sont dirigées contre les levures, les bactéries Gram négatif et les bactéries Gram positif non lactiques, ces dernières y sont néanmoins moins sensibles (El Ziney *et al.*, 1998).

1.7.4. Le dioxyde de carbone

Intermédiaire de fermentation de certains substrats par les bactéries lactiques hétéro-fermentaires, le CO₂ crée des conditions anaérobies dans le milieu, pouvant conduire à l'élimination de bactéries aérobies strictes. Ceci peut en revanche aussi favoriser dans le même temps le développement de flores anaérobies qui peuvent être parfois néfastes (Papa Abdoulaye, 2011).

1.7.5. Les bactériocines

Différentes définitions ont été données au cours du temps, cependant, la définition qui reste la plus largement utilisée 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.

II. Les bactériocines des bactéries lactiques

2.1. Définition et caractéristiques

Le terme « bactériocine » est employé pour la première fois par Jacob *et al.* (1953), pour les peptides à spécificité importante, produits par certaines souches et actifs contre les souches de

la même espèce. La première bactériocine, nommé la colicine était produite par *Escherichia coli* S (Gratia, 1925). Depuis, l'étude des bactériocines s'est élargie. Rogers et Whitter (1928), furent les premiers à étudier les inhibiteurs des bactéries lactiques, et plus spécialement des *Lactocoques*.

D'après Klaenhammer (1988), les bactériocines sont des substances de nature totalement ou partiellement protéique, à activité bactéricide envers les espèces proche de la souche productrice. Elles sont synthétisées par voie ribosomale, sous forme de peptides inactifs, et deviennent actives en milieu extracellulaire ; dans la plupart des cas, elles sont codées par des gènes plasmidiques.

Ces substances antagonistes se différencient entre elles par : leurs poids moléculaires, leur propriétés biochimiques, leur spectre et leur mode d'action (Klaenhammer, 1988). Elles sont actives contre les bactéries à Gram positif, néanmoins, certains auteurs ont observé que certaines bactériocines exercent aussi un effet inhibiteur contre les bactéries Gram négatives (Todorov *et al.*, 2005). Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont généralement cationiques, hydrophobiques ou amphiphiliques, composées de 20 à 60 acides aminés (Nes et Holo, 2000).

2.2. Nomenclature

La nomination des bactériocines est attachée soit au genre ou à l'espèce de la première souche productrice en ajoutant le suffixe « cine » pour indiquer le pouvoir létale ; par exemple: la plantaricine est la bactériocine produite par *Lactobacillus plantarum* (Karthikeyan et Santhosh, 2009).

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

2.3. Propriétés

Certains critères des bactériocines produites par les bactéries lactiques justifient leur choix comme bio-conservateurs (Gálvez *et al.*, 2007) :

- Considérées comme 'GRAS' (Généralement reconnu sans risques ; Generally Recognized As Safe) ;
- Inactives et non toxiques contre les cellules eucaryotes ;
- Généralement thermostables et tolérantes aux variations du PH ;
- Possèdent un spectre d'activité relativement large ;
- Mode d'action généralement bactéricide (membrane cytoplasmique) ;
- Déterminants génétiques codés par les plasmides ;
- Sensibilité aux protéases et digestibilité dans le tractus intestinal.

2.4. Classification des bactériocines

La classification des bactériocines repose sur les critères qui les différencient. Klaenhammer (1993), propose une classification des bactériocines en 4 classes distinctes (tableau IV) :

- **Classe I** : appelée aussi « classe des lantibiotiques », elle renferme les bactériocines post-traductionnellement modifiées, caractérisées par une taille moléculaire < 5 KDa, stables à la chaleur, elles contiennent des acides aminés inhabituels tels que la lanthionine.

Cette classe est subdivisée en deux types, selon leur structure et leur mode d'action :

- **Le type A**, regroupe les lantibiotiques linéaire, avec une charge nettement positive, leur mode d'action se manifeste par la formation de pores sur la membrane de l'hôte.

- **Le type B**, constitue les lantibiotiques globulaires, possédant une charge négative, ou ne contenant pas de charge, elles attaquent des enzymes spécifiques et les inhibent (Mc Auliffe *et al.*, 2001).

- **Classe II** : renferme les bactériocines, dont le poids moléculaire n'excède pas les 10 KDa, thermorésistantes, et qui ne possèdent pas des acides aminés inhabituels, elles ne subissent pas de modifications post-traductionnelles. Cette classe est subdivisée en 3 sous classes :

- **Sous classe IIa** : ces bactériocines font partie de la famille des pédiocines, qui présentent une partie N terminale conservée, à activité anti-*Listeria*. Grâce à cette qualité, plusieurs chercheurs se sont intéressés à l'isolement des bactériocines qui appartiennent à cette sous classe. La mésentéricine Y105 est une bactériocine de la classe IIa et elle contient 37 acides aminés (Hechard *et al.*, 1992).

- **Sous classe IIb** : regroupe les bactériocines contenant deux peptides, l'activité de ces peptides permet de distinguer deux types : le type E (Enhancing), où un des deux peptides sert à stimuler l'activité de l'autre peptide et le type S (Synergy) où les activités des deux peptides sont complémentaires. La lactacine F produite par *Lactobacillus johnsonii* est une bactériocine de la sous classe IIb (Allison *et al.*, 1994).

- **Sous classe IIc** : elle contient d'autres bactériocines qui ne peuvent pas être classées dans les sous classes IIa et IIb. L'acidocine B est une bactériocine de cette sous classe, produite par *Lactobacillus acidophilus* (Leer *et al.*, 1995).

- **Classe III** : cette classe rassemble les bactériocines de poids moléculaire supérieur à 30 KDa, sensible à la chaleur, ce qui limite leur utilisation possible dans l'industrie agroalimentaire. La helvictine J, une bactériocine de cette classe, est produite par *Lactobacillus helveticus* A (Joerger et Klaenhammer, 1990).

- **Classe IV** : Klaenhammer (1993), a regroupé dans cette classe les bactériocines qui possèdent une ou plusieurs molécules de nature non protéique, mais lipidiques et/ou glucidiques, ces dernières sont nécessaires à leur activité. L'activité de la plantaricine S est affectée par les enzymes lipolytiques et glycolytiques (Jimenez-Diaz *et al.*, 1993).

Plusieurs classifications ont été proposées par d'autres chercheurs. Après celle proposée par Klaenhammer (1993), la classification de Neset *et al.* (1996), qui a éliminé la classe IV, car aucune bactériocine de ce type n'a été purifiée, ni chimiquement caractérisée.

La classification la plus récente, est proposée par Heng et Tagg. (2006), elle regroupe quatre classes : classe I pour les lantibiotiques, classe II : peptides non modifiés, classe III : protéines et classes IV pour les peptides cycliques.

La classification des bactériocines permet d'établir une relation entre la fonction et la structure de ces molécules, pour une application possible. Le mode d'action de la plupart des bactériocines se manifeste par l'adsorption à la membrane de l'hôte et la formation des pores, ce qui provoque la mort cellulaire (Bauer and Dicks, 2005 ; Cotter *et al.*, 2006).

Tableau IV : La classification de quelques bactériocines des bactéries lactiques (Chen et Hoover, 2003).

Bactériocines	Souche productrice	Références
Classe I- lantibiotique type A		
nisine	<i>Lactococcuslactis</i>	Hurst, (1981)
lactocine S	<i>Lactobacillus sake</i>	Mortvedtetal. (1991)
Classe I- lantibiotique Type B		
cinnamycine	<i>Streptomycescinnamoneuse</i>	Sahl et bierbaum, (1998)
ancovenine	<i>Streptomycessp</i>	
Classe IIa		
pediocine PA-1/Ach	<i>Pediococcusacidilactici</i>	Henderson <i>et al.</i> (1992) ; Motlaghet <i>al.</i> (2001)
lactococcine MMFII	<i>Lactococcuslactis</i>	Ferchichiet <i>al.</i> (2001)
Classe IIb		
lactococcine G	<i>Lactococcuslactis</i>	Nissen-Meyer <i>et al.</i> (1992)
lantaricine EF	<i>Lactobacillus plantarium</i>	Andersssenet <i>al.</i> (1998)
Classe IIc		
acidocine B	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Leeret <i>al.</i> (1995)
Classe III		
helveticine J	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Joerger et Klaenhammer, (1986)
helveticine V-1829	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Vaughan <i>et al.</i> (1992)

2.4. Mode d'action des bactériocines

Il varie d'une classe à une autre, en général, les bactériocines interagissent avec la membrane cytoplasmique de la cellule hôte. Le mode d'action des bactériocines, peut être bactéricide ou bactériostatique, déterminés respectivement par la mort cellulaire ou l'extension de la phase logarithmique, de la cellule sensible. Nous présenterons le mécanisme d'action des bactériocines de classe I et de classe II.

2.4.1. Les lantibiotiques

Ils interagissent soit par des interactions électrostatiques, soit par des liaisons au précurseur du peptidoglycane, le lipide II (un récepteur spécifique), cette liaison va permettre la formation des pores. Le maintien de ces derniers, au niveau membranaire, empêche la régénération de la paroi cellulaire (Dotu et Thonart, 2009) (figure3). La formation des pores cause l'efflux des petits composés intracellulaires, comme les ions et les acides aminés. Cet efflux provoque le déséquilibre de la force proton motrice, de part et d'autre de la membrane, l'arrêt des fonctions cellulaire et la mort de la cellule (Patton *et al.*, 2005).

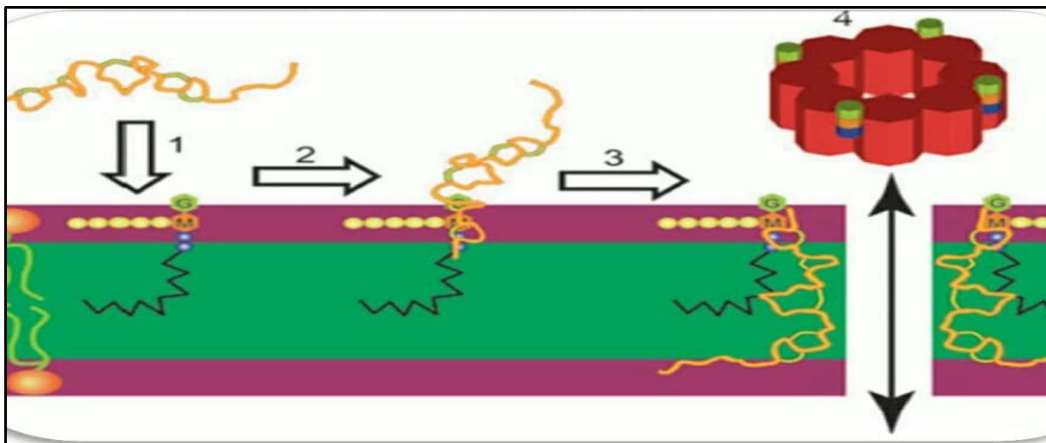


Figure 3 : Mécanisme d'action par formation de pores des lantibiotiques (Breukink et De Kruijff, 2006).

- 1) le rapprochement du lantibiotique de la membrane plasmique de l'hôte.
- 2) l'adsorption du lantibiotique au lipide II.
- 3) la formation du pore.
- 4) la structure complexe du pore formée par 8 molécules de nisine et 4 lipides II, générant un pore (2nm).

2.4.2. Les bactériocines de classe II

L'action des bactériocines de la classe II se fait généralement, par l'adsorption à la membrane, son insertion et la formation des pores.

La sous classe IIa est, largement, étudiée, pour son efficacité contre *Listeria*. Son action commence par des liaisons électrostatiques entre la bactériocine et la membrane. La nature cationique des bactériocines de cette sous classe et la nature hydrophile de la partie N terminale, se conjuguent avec la partie anionique (tête du phospholipide).

Dans un 2^{ème} temps, des interactions hydrophobes se produisent entre la partie amphiphile des chaînes acyle lipidique (la queue du phospholipide) et la partie C terminale de la bactériocine (hydrophobe).

Il a été démontré que la formation des pores, nécessite l'intervention de plusieurs molécules de bactériocines qui s'agrègent (figure 4). Contrairement aux lantibiotiques, la perte de l'ATP n'est pas due à son efflux (la taille des pores est relativement faible), mais est due à sa consommation excessive pour régénérer la force proton motrice et/ou à l'incapacité de la cellule à produire l'ATP suite à l'efflux des phosphates.

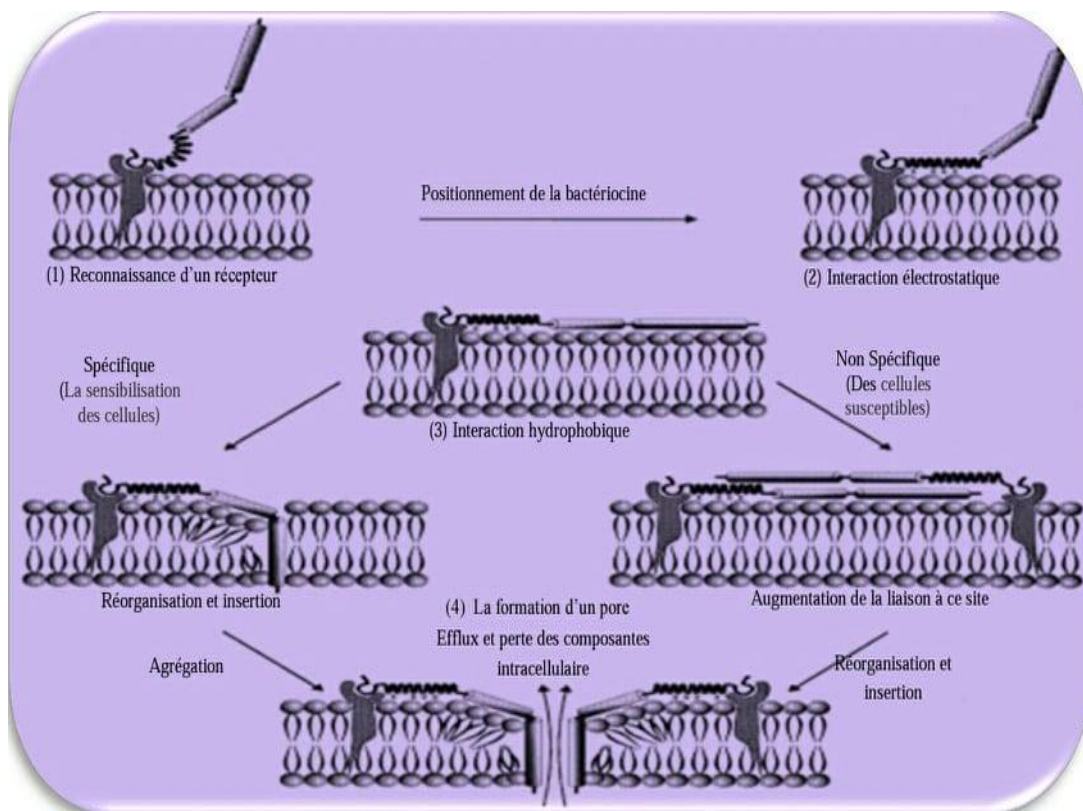


Figure 4: Schéma du mode d'action des bactériocines de la classe IIa (Ennaharet *al.*, 2000).

2.5. Biosynthèse et régulation de la production des bactériocines

Le mécanisme de biosynthèse des bactériocines et sa régulation fait appel à un système complexe, en effet, la biosynthèse dépend d'un ensemble de gènes de structure, qui codent pour le peptide et son transport ainsi que l'immunité de la bactérie productrice. Cet Opéron transcrit un pré-peptide (non actif), qui sera actif en milieu extracellulaire ; la cellule doit s'immuniser contre sa propre bactériocine.

La production des bactériocines de classe I et II est détaillée ci-dessous :

2.5.1. La biosynthèse des lantibiotiques (bactériocine de type I)

La nisine est le lantibiotique le plus caractérisé et étudié. Pour cela, nous allons détailler sa biosynthèse. En général, la biosynthèse de la nisine, comme celle des autres bactériocines de cette classe, se déroule en trois étapes (figure 5) :

- la formation des acides aminés inhabituels (les modifications post traductionnelles) ;
- l'organisation en structure cyclique de la pré-nisine ;
- le clivage et le transport vers l'extérieur. Ces derniers sont assurés par le système de transport (le transporteur ABC dépendant).

La nisine étant la bactériocine la plus utilisée en industrie agroalimentaire, nous avons choisi de présenter sa biosynthèse en détaille.

Le gène de structure est appelé Nis, il code pour un pré-peptide de 23 à 30 acides aminés, qui sera clivé à l'extérieur de la cellule. Mais avant, il subira des modifications post-traductionnelles : les serines et les thréonines seront déshydratés par une déshydratase, formant ainsi des acides aminés inhabituels (déhydroalanines et déhydrobutyrines). Ces derniers établiront une structure cyclique, par des ponts thioéther, avec les cystéines proches, à l'aide d'une cyclase codée par les gènes NisB et NisC ou le gène NisM.

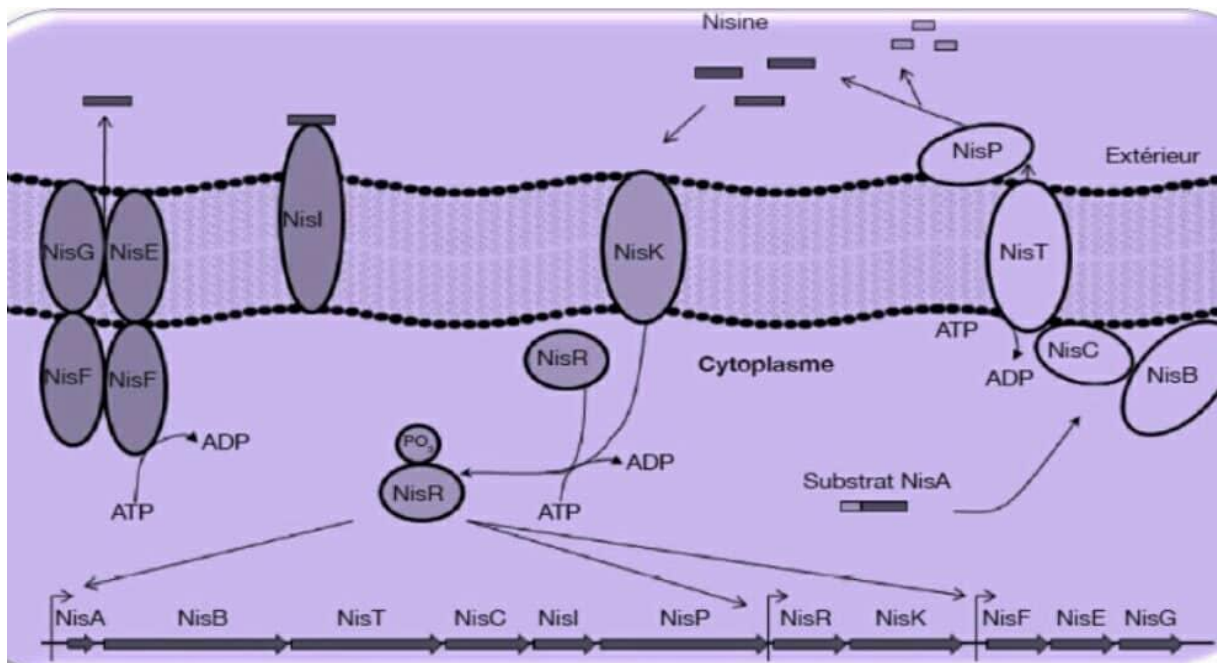


Figure 5: Régulation de la production, modification post-traductionnelle et auto-immunité de la nisine (Patton *et al.*, 2005).

NisA : pré-peptide
 NisB : déshydratase
 NisC : cyclase
 NisT : l'ABC transporteur
 NisP : la protéase
 NisK : l'histidine Kinase
 NisR : le régulateur de réponse
 Nis I : la lipoprotéine d'immunité
 NisG, NisE et Nis F : l'ABC transporteur.

Le transport du prépeptide est assuré par le gène de structure, qui sera clivé par une protéase NisP ou par le domaine protéasique (figure 6) du système transporteur ABC, le NisT (Mc Auliffe *et al.*, 2001).

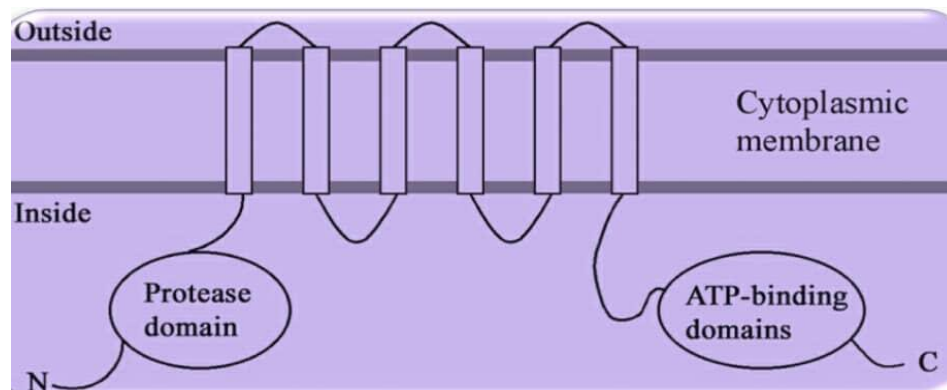


Figure 6 : ABC-transporteur avec le domaine protéasique (Patton *et al.*, 2005).

ABC : cassette ATP dépendante.

La régulation de la production se fait par le système « Quorum sensing » (Kleerebezem, 2004), qui possède deux composants phosphorylés la deuxième, sous l'effet d'un stimulus extérieur. Le régulateur de réponse phosphorylé, stimule l'expression de l'Opéron. Le stimulus extérieur est la nisine elle même, on parle d'une autorégulation (Kleerebezem, 2004).

L'immunité de la souche productrice est assurée par quatre gènes NisI, NisF, NisE et NisG (Stein *et al.*, 2003), ont suggéré que NisI est une lipoprotéine, qui en interagissant avec la nisine, empêche cette dernière à former des pores, alors que le Nis F, NisE et NisG (transporteur ABC) exportent les nisines, qui ne seront pas liées avec la lipoprotéine.

2.5.2. La biosynthèse des bactériocines de classe II

Les bactériocines de cette classe, sont synthétisées sous formes d'un pré-peptide, ce pré-peptide ne contient pas des acides aminés inhabituels, il n'est pas biologiquement actif. Il sera transporté à l'extérieur après le clivage de son peptide leader et la formation des ponts disulfures (Ennaharet *al.*, 2000 ; Drideret *al.*, 2006). Les bactériocines de la sous classe IIa ont intéressé de nombreux chercheurs, du fait de leurs propriétés physico-chimique et leur activité anti-Listeria. Pour cela, nous allons détailler la biosynthèse de la sous classe IIa.

L'entérocinP produite par *Enterococcus Faecium* P13 est une bactériocine appartenant à la classe Iia (Cintaset *al.*, 1997). Certaines bactériocines de cette sous classe sont sécrétées par une voie appelée « la voie sec-dépendant » (Keyyseret *al.*, 2003). La sécrétion de la bactériocine se fait par une translocation du peptide à travers un pore formé par plusieurs protéines, le peptide leader est une séquence spécifique des protéines synthétisées par cette voie, il sera clivé lors de l'exportation à l'extérieur.

Une autre voie de biosynthèse, généralement utilisée par les bactériocines de la classe IIa fait appelle au système GSP : voie générale de sécrétion (figure 7), contenant deux protéines distinctes : ABC transporteur et une protéine accessoire, la protéine accessoire est ancrée dans la membrane vers l'intérieur de la cellule.

La régulation de la biosynthèse des bactériocines de la classe IIa, fait appelle à un système « Quorum sensing » à 3 composantes : une protéine d'induction, une histidine Kinase et un régulateur de réponse, ces protéines sont co-transcrites.

La protéine d'induction est le pré-peptide contenant un peptide leader de type double glycine (GG), il sera clivé lors de son transport par le système ABC, le peptide leader interagit avec l'histidine Kinase et active le régulateur de réponse afin de stimuler les gènes de structure, on parle d'une auto-induction (Drider *et al.*, 2006).

L'immunité de la souche productrice de la bactériocine de classe IIa, se manifeste par une immunité dite « immunité croisée ». Elle est plus spécifique par rapport à l'immunité des souches de bactériocines de classe I. En effet, il n'existe pas de similarité entre les protéines d'immunité de classe IIa et les bactéries productrices de ces bactériocines sont partiellement protégées contre les autres bactériocines de classe IIa. Ceci indique que les protéines d'immunité n'appartiennent pas forcément au même gène de structure (Quadri *et al.*, 1994). Ces protéines sont composées de 88 à 114 acides aminés, et sont ancrées dans la membrane cytoplasmique. Les protéines d'immunité interagissent avec une protéine membranaire, en empêchant l'insertion de la bactériocines (indirectement), afin de former les pores.

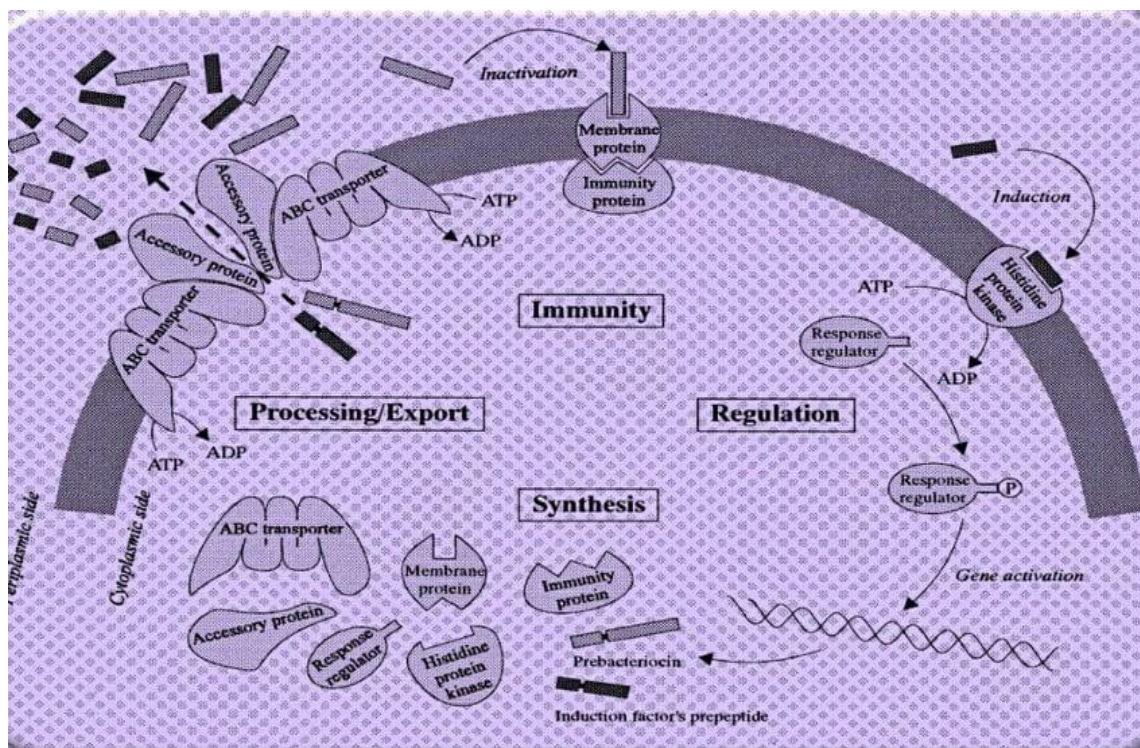


Figure 7: Schéma de la biosynthèse de la production des bactériocines de la sous classe IIa, montrant : la régulation, la synthèse, le transport et l'immunité (Ennahar *et al.*, 2000).

La biosynthèse des bactériocines varie d'une classe à une autre, sa complexité dépend de la composition chimique de cette molécule. La biosynthèse des bactériocines de classe III est plus complexe, ces bactériocines ont une structure tridimensionnelle d'une protéine à poids moléculaire, qui peut atteindre 30 KDa. La biosynthèse des bactériocines de la classe IV nécessite la liaison des composés lipidique ou des composés glucidique au pré-peptide pour sa fonction biologique.

2.6. Conditions de production

Dans leur lutte pour survivre et se nourrir, les bactéries lactiques produisent de nombreuses substances antimicrobiennes entre-autres les bactériocines, qui servent d'armes permettant aux bactéries lactiques de dominer les microorganismes compétitifs. Ces bactériocines peuvent être dégradées sous l'action des protéases de la souche productrice ou être adsorbées à sa surface (Moll *et al.*, 1999 ; Dortu et Thonart, 2009).

Les conditions optimales pour la croissance peuvent l'être également pour la production des bactériocines. Yang et Ray (1994) et Castro *et al.* (2011), ont démontré que les conditions conduisant à une forte densité cellulaire favorisent la production de bactériocine par *Lactobacillus sakei*. Cependant, il a été noté par Verluyten *et al.* (2004), que des conditions défavorables à la croissance permettent de stimuler la production des bactériocines par *Lactobacillus curvatus*.

La présence des microorganismes compétitifs dans le milieu stimule la production des bactériocines. Tabasco *et al.* (2009), ont démontré que *Lactobacillus acidophilus* augmente la production de lactacine B quand cette souche sent la présence de cellules cibles vivantes ; l'utilisation de ces mêmes cellules cibles après chauffage n'avait aucun impact sur cette production. De même une co-culture de *Lactobacillus plantarum* NC8 avec *Enterococcus faecium* a augmenté sa production de bactériocine (Ruiz-Barba *et al.*, 2010).

2.7. Facteurs influençant la production des bactériocines

L'utilisation des bactériocines à l'échelle industrielle en nécessite de grandes quantités. Ceci ne peut être atteint qu'en connaissant et optimisant les facteurs influençant leur production tels que : la température, le pH, le milieu utilisé, etc. Ces conditions de culture affectent fortement la production de bactériocines.

2.7.1. Température et pH

La température et le pH sont des facteurs importants qu'on doit prendre en considération quant à la production de bactériocines. Celle-ci est généralement optimale à des températures et des pH inférieurs à ceux optimaux pour la croissance (Héquet *et al.*, 2007 ; Dortu et Thonart, 2009 ; Sharma *et al.*, 2010).

L'effet de ces deux facteurs a fait l'objet de plusieurs études. Ainsi, la production de bactériocine par *Leuconostoc lactis* était optimale à 30°C et à pH variant de 6.5 à 7 ;

néanmoins, elle est diminuée d'une façon remarquable à 37°C et à pH 5.5 et 8.0 (Dhakur et Roy, 2009).

La production de pédiocine LB-B1 par *Lactobacillus plantarum* LB-B1 était optimale à 37°C et à pH : 6 (Xie et al. 2011). *Enterococcus faecium* PC4.1 atteint son maximum de production à 30°C et à pH : 6 (HadjiSfaxiet al., 2011). La production de l'acidocine 8912 par *Lactobacillus acidophilus* était maximisée à 30°C (Ahmed et al., 2010).

2.7.2. Composition du milieu de culture

La composition du milieu de culture en particulier la source et la teneur de carbone et d'azote influence considérablement la production de bactériocines. Vu leurs exigences nutritionnelles, les bactéries lactiques requièrent plusieurs composants tels que : les facteurs de croissance, les peptones, l'extrait de levure, les hydrolysats de protéines et l'extrait de viande. Ces composants ont un impact positif sur le rendement en bactériocines (Dortuet Thonart, 2009).

De nombreux milieux de culture complexes ont été utilisés pour l'isolement des bactéries lactiques bactériocinogènes tels le MRS (Elmoualdiet al., 2008 ; Khalil et al., 2009 ; Moraes et al., 2010 ; Xie et al., 2011; Abramset al., 2011 et Castro et al., 2011), le BHI (Ammoret al., 2006 ; Ghrairiet al., 2008), et le M17 (Hadji-Sfaxiet al., 2011). Toutefois, l'Elliker constitue le milieu le plus approprié pour améliorer le rendement des bactériocines (Thakuret al., 2009).

Il a été signalé que la production des bactériocines peut être maximisée en fortifiant le milieu de culture par l'ajout d'extrait de levure (Benkerroumet al., 2000 ; Labioui et al., 2005 ; Elmoualdiet al., 2008 ; Sarikaet al., 2010). Todorv et Dicks (2005), ont démontré que le taux de bactériocines ST461BZ et ST462BZ produites par *Lactobacillus rhamnosus* a significativement augmenté en ajoutant au milieu le K₂HPO₄ et le KH₂PO₄ respectivement.

2.7.3. Temps d'incubation

La synthèse des bactériocines prend lieu au cours de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire. Au-delà de cette période une diminution du taux de bactériocines a été observée suite à la digestion de ces dernières par les enzymes protéolytiques libérées par la cellule productrice. De ce fait, plusieurs études ont été réalisées pour optimiser la période d'incubation.

Gong et al. (2010), ont démontré que la production de la plantaricine MG par *Lactobacillus plantarum* atteint sa valeur maximale après 28h d'incubation. La production maximale de bacALP7 par *P. pentosaceus* est observée après 16h d'incubation et diminue de près de la moitié après 21h (Pinto et al., 2009).

2.8. Les applications des bactériocines

Considérées en tant que « GRAS » (Généralement reconnu sans risque ; Generally Recognized As Safe) et vu leur abondance et leur pouvoir antimicrobien généralement bactéricide, les bactériocines des bactéries lactiques trouvent leur utilisation dans différents domaines où elles empêchent le développement de bactéries pathogènes et nuisibles (Albano *et al.*, 2007). Cependant le domaine d'utilisation le plus exploité, est la bio-conservation.

2.8.1. Dans le secteur alimentaire

L'utilisation des bactériocines dans les aliments fut introduite par Hirschet *al* en 1951, lorsqu'il démontra que la nisine était en mesure d'inhiber la croissance de *Clostridium* dans un fromage fait de lait pasteurisé. Cette découverte eut comme effet de propulser les études sur les bactériocines.

En effet, grâce à l'activité anti-microbienne de leurs bactériocines, les bactéries productrices ont la capacité de diminuer la charge microbienne d'un aliment et donc de contribuer à leur innocuité. Ces molécules bioactives sont incorporées dans les aliments soit directement sous forme purifiée ou semi-purifiée (nisine) ou sous forme de concentré (pédiocine une bactériocine de classe IIa, est commercialisée sous cette forme sous le nom ALTA 2341) soit indirectement en appliquant la souche productrice dans le produit alimentaire (production insitu), comme elles peuvent être immobilisées par encapsulation ou adsorption (Ghalfiet *al.*, 2006 ; Dortu et Thonart, 2009).

A l'heure actuelle, la nisine (E-234) produite par *Lactococcus lactis* est la seule bactériocine dont l'usage est autorisé dans plus de 50 pays incluant les Etats unis, l'Union Européenne, le Brésil et la Chine (Reunanen et Saris, 2004).

Les applications de la nisine comme conservateur des aliments envasés, les produits carnés, végétaux fermentés ainsi que dans le lait et dérivés laitiers ont fait l'objet de nombreuses études (DelvesBroughton, 1990 ; DelvesBroughton *et al.*, 1996 ; Thomas et DelvesBroughton, 2001 ; Ross *et al.*, 2002).

2.8.2. Dans le domaine médical

L'utilisation de bactériocines purifiées sous forme d'antibiotiques peptidiques dans le domaine thérapeutique, est une application prometteuse. En effet, les antibiotiques montrent de plus en plus leurs limites, vis-à-vis des phénomènes de résistance, qui ne cessent d'augmenter. Pour cela, l'utilisation des peptides antimicrobiens à la place de ces ATB, est une alternative prometteuse (Papagianni, 2003).

La nisine a fait l'objet d'une étude dans de nombreuses applications, notamment dans le domaine pharmaceutique, comme nutraceutique (un aliment qui présente des propriétés curatives ou préventives d'une maladie) et cosmétiques (Luquet et Corrieu, 2005 ; Colas *et al.*, 2007). Aranha *et al.* (2004), ont suggéré le développement d'une alternative contre les

infections vaginales en utilisant la nisine. En médecine, la nisine peut être utilisée pour les dermatites (Valenta *et al.*, 1996), comme agent thérapeutique dans le traitement des ulcères et les infections des colons pour les patients immuno-déficients (Dubois, 1995 ; Kim *et al.*, 2003).

Un nouveau domaine médical est en pleine expansion, il s'agit de l'utilisation de la bactériocine comme une conception rationnelle de médicament. Arnusch *et al.* (2008), ont conçu un hybride nisine-vancomycine, ce dernier est très actif contre les entérocoques résistants à la vancomycine.

Une application probiotique des bactériocines est envisageable, notamment pour le système intestinal, pour la cavité buccale, respiratoire et génitale. Comme la bactériocine de la souche *Lactobacillus pentosus* et *L. jensenii* 5L08, qui inhibent la croissance de *Candida albicans*, agent des infections vaginales (Aroutcheva *et al.*, 2001 ; Kaewsrichanet *et al.*, 2006).

Les différents domaines d'application des bactériocines des bactéries lactiques sont récapitulés dans la figure (8).

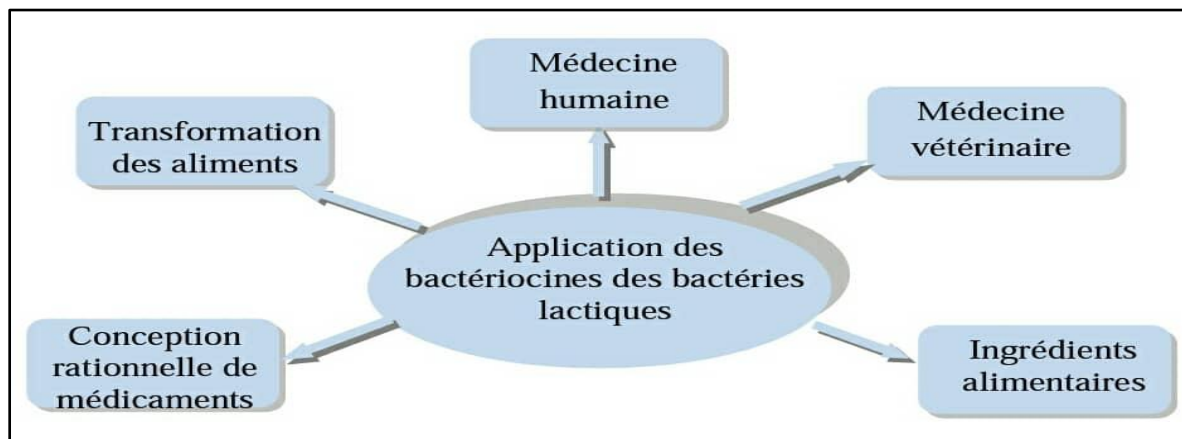


Figure 8 : Les différents domaines des applications des bactériocines des bactéries lactiques (Leblanc, 2010).

2.8.3. Dans d'autres domaines

Toujours pour lutter contre les microorganismes d'altération. Par exemple dans la fabrication du bioéthanol, qui se fait dans des conditions non stérile, grâce à des microorganismes qui convertissent la source du carbone en éthanol. Cependant, la présence de contaminants peut dévier le métabolisme désiré. L'utilisation des antibiotiques n'a pas donné de bons résultats, face aux problèmes des biofilms et de résistance des bactéries d'altération (les bactéries acétiques). Plusieurs études ont adoptées l'utilisation des bactériocines pour lutter contre ces microorganismes (Muthaiyan *et al.*, 2010).

Partie

Expérimentale

Chapitre I

Matériel et méthodes

I. Matériel et méthodes

Notre travail expérimental a été réalisé au niveau de :

- laboratoire de Microbiologie de l'Université Mouloud MAMMARI de Tizi-Ouzou, pour la réalisation de l'isolement et de la purification des bactéries lactiques productrices de bactériocines.
- laboratoire pédagogique de biochimie de l'Université Mouloud MAMMARI de Tizi-Ouzou, pour la réalisation d'une électrophorèse PAGE-SDS.

1.1. Matériel

- **Echantillonnage et condition de transport**

Les bactéries lactiques, sont isolées à partir des produits laitiers suivants : lait crus (lait de vache, lait de chèvre), Lben, yaourt nature, lait fermenté (Activia) et camembert, sur une période qui s'étale du mois de mars jusqu'au mois de juin.

Les échantillons sont acheminés au laboratoire dans une glacière à 4°C, puis sont mis au réfrigérateur pour qu'ils soient utilisés ultérieurement, au maximum dans les 48h.

Les onze échantillons obtenus sont représentés dans le tableau suivant :

Origine des échantillons	Nombre d'échantillon
Lait cru de vache	3
Lait cru de chèvre	3
Yaourt nature	1
Lait fermenté (Activia)	1
Lben	2
Camembert	1

1.2. Méthodes

1.2.1. Préparation des échantillons

L'isolement des bactéries lactiques à partir du lait fermenté, Lben et yaourt nature se fait par isolement en stries directement des produits sans passer par une préparation préalable.

2.1.1. Prélèvement du lait crus

Après lavage à l'eau savonneuse, rinçage à l'eau javellisé, les pis sont séchés à l'aide de lingettes. Les premiers jets sont éliminés dans un bocal, puis le lait crus est recueilli dans des tubes ECBU stériles.

2.1.2. Préparation de la solution fromagère

L'isolement des bactéries lactiques du fromage (camembert) a été réalisé à partir d'une de 10g de camembert écrouté suivie d'un broyage dans un mortier en le mélangeant avec 10ml d'eau distillé stérile chauffée à 40°C. Le mélange est ensuite versé dans un bécher stérile, puis il va subir un remuage de temps en temps placé dans un bain marie à 40°C pour une meilleure solubilisation jusqu'à l'obtention d'une solution homogène.

1.2.2. Isolement et purification des bactéries lactiques

A partir des différents échantillons utilisés, l'isolement et la purification ont été effectués par des repiquages successifs sur bouillon Elliker (pH : 6,6 et 5,4) suivi d'un isolement en stries sur gélose M17 et MRS.

Afin d'augmenter les chances d'isolement de différents groupes de bactéries lactiques, les incubations ont été réalisées sur bouillon Elliker à différents pH (6,6 et 5,4), à différentes températures de 30°C, 37°C, 44°C et à différentes conditions d'incubation (aérobie, anaérobie).

2.2.1. Détermination de l'appartenance des différents isolats aux bactéries lactiques

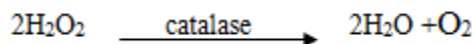
La détermination de l'appartenance des isolats aux bactéries lactiques a été réalisée par observation macroscopique ainsi que par les tests de catalase et la coloration de Gram.

• Observation macroscopique

Cette étude est basée sur l'observation visuelle de la culture des isolats sur milieu M17, MRS solide et bouillon Elliker; pour caractériser la taille, la forme et la couleur des colonies sur milieu solide et le trouble dans le milieu liquide (Badis *et al.*, 2005).

• Test de la catalase

Chez les bactéries douées d'un métabolisme oxydatif, le système respiratoire compte parmi d'autres enzymes une catalase. Celle-ci décompose l'eau oxygénée selon la réaction suivante :



La méthode de recherche de la catalase consiste à étaler une colonie sur une lame en verre sur laquelle on ajoute une goutte de H₂O₂, à 10 volumes. La présence de l'enzyme se manifeste par un dégagement de bulles de gaz (Marchal *et al.*, 1991).

• Coloration de Gram

La coloration de Gram permet de différencier les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif, les bâtonnets, les coques et le mode de regroupement. La coloration de Gram a été effectuée selon la méthode décrite par (Prescott *et al.*, 2003).

Les bactéries Gram positif et catalase négative sont présumées des bactéries lactiques (Belarbi, 2011) (Annexe 2).

2.2.2. La purification des souches

La pureté des souches a été réalisée par des repiquages successifs des colonies isolées contrôlées par test de catalase et coloration de Gram, ainsi que l’aspect des colonies appartenant aux bactéries lactiques comme indiqué si dessus, en suivant le protocole schématisé dans la figure 9.

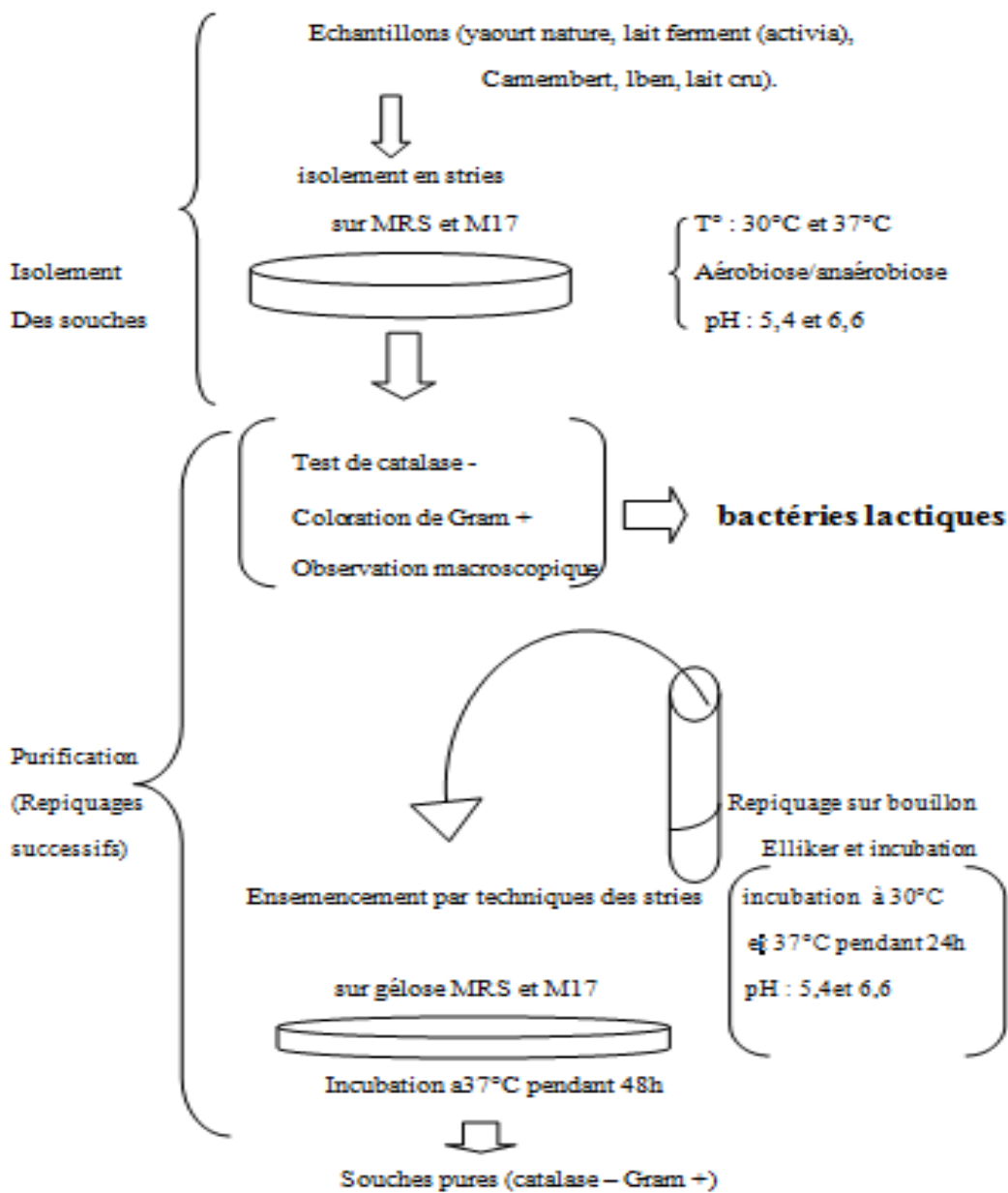


Figure 9 : Protocole d’isolement et de purification des bactéries lactiques.

1.2.3. La conservation des souches de longue durée

Pour assurer une bonne continuité du travail, les souches doivent être conservées dans des conditions adéquates.

Une conservation de longue durée, est faite à partir des cultures de 18 heures (milieu liquide), les cellules sont récupérées par centrifugation, une fois le surnageant est éliminé, on ajoute le milieu de culture de conservation (bouillon Elliker) sur le culot, additionné de glycérol (v/v) à 50%. Les cultures sont conservées en suspension dense et en tube eppendorf à -45°C (Font de Valdez, 2002).

1.2.4. Revivification et préparation d'inoculum

Les souches pathogènes : *E. coli* ATCC 25922 et *S. aureus* ATCC 25923 utilisées, sont revivifiées suivant ces étapes :

La revivification des souches a été réalisée à partir des cryo-tubes maintenus à -40°C. Après avoir mis les cryo-tubes à 37°C pendant 3h, le contenu est transvasé dans 9ml de BHIB puis incubé à 37°C pendant 18h.

5ml de suspension jeune est ensemencée dans 5ml de BHIB, ensuite incubé pendant 18h à 37°C.

0,1ml de cette suspension a été étalé en surface par technique des stries sur gélose GN, après 24 h d'incubation à 37°C, la pureté des souches a été vérifiée par test de catalase et coloration de Gram (Guiraud, 2004).

1.2.5. Standardisation des souches

La suspension bactérienne a été standardisée à une densité optique de 0,08-0,1 (équivalent 10^8 UFC/ml) à une longueur d'onde de 625nm à partir de deux colonies dissoutes dans 9ml d'eau physiologique stérile (Ausubel *et al.*, 1991).

1.2.6. Screening des souches productrices de bactériocines

2.6.1. Méthode directe

La méthode directe, appelée aussi méthode de Fleming *et al.* (1975), permet d'évaluer le pouvoir inhibiteur des bactéries lactiques ensemencées en spot dans la gélose molle. Elle met en évidence les inhibitions dues à la production d'agents inhibiteurs mais aussi à l'effet de pH, H₂O₂, compétition vis-à-vis du substrat et l'inhibition par contact cellulaire.

L'inhibition se traduit par l'apparition des halos d'inhibition (≥ 2 mm) autour des souches productrices (Mamiet *et al.*, 2008).

L'activité antimicrobienne des bactéries lactiques isolées est évaluée contre deux souches cibles (*E. coli* ATCC 25922 et *S. aureus* ATCC 25923) standardisées.

Une solution fraîche de bactéries lactiques de 18h est ensemencée par technique des spots en déposant 5µl de cette suspension sur la gélose (M17 ou MRS), puis incubé en anaérobiose à différentes températures (30°C et 37°C) pendant 24h.

Après cette période d'incubation, 10ml d'une gélose MH semi-molle liquéfiée sont ensemencés avec 1ml d'une suspension bactérienne standardisée des souches cibles, sont versées sur la gélose MRS ou M17 et homogénéisé délicatement afin d'éviter le décollement des spots.

Les boîtes sont incubées en anaérobiose pendant 24h à différentes températures (30°C et 37°C), la formation d'un halo transparent autour du spot témoigne de l'effet antibactérien des souches lactiques testées comme le montre la figure 10.

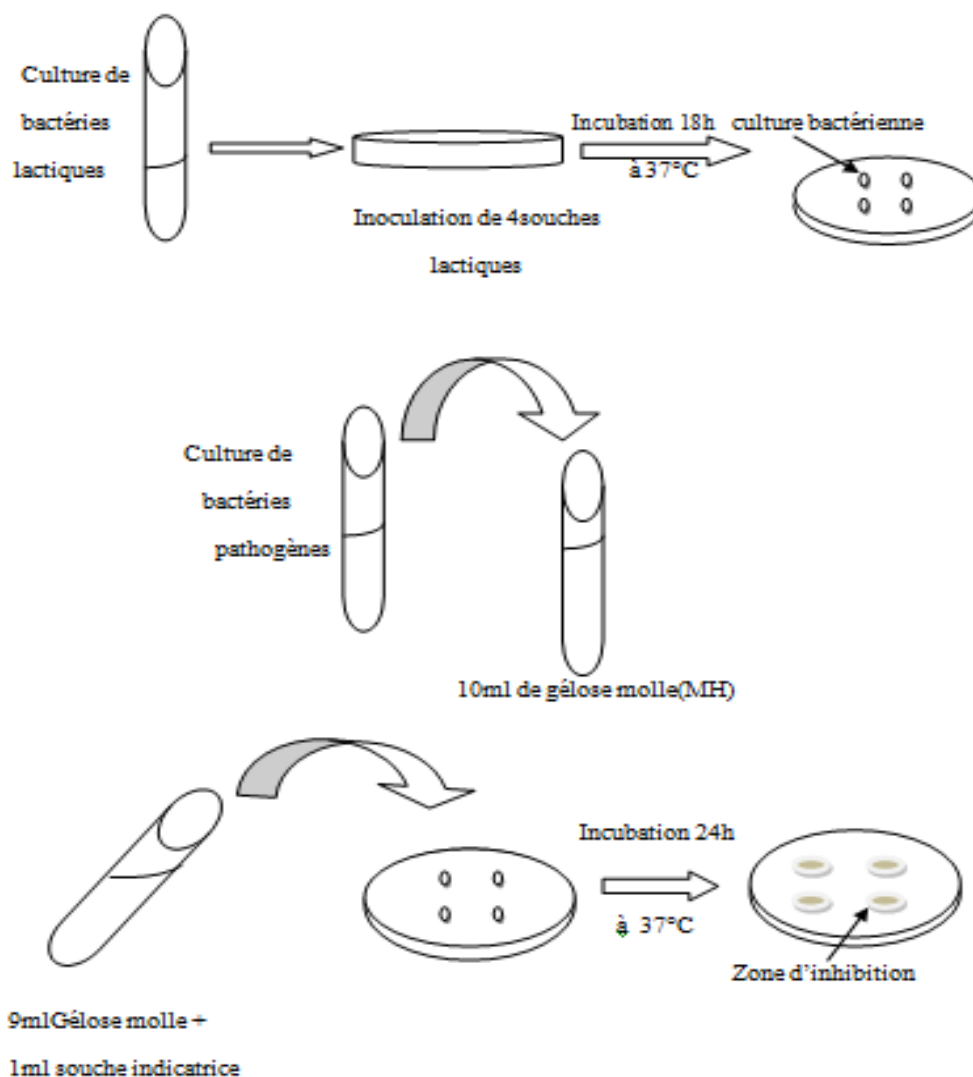


Figure10 : Protocole de screening des souches productrices de bactériocines par méthode directe.

2.6.2. Méthodes indirecte

Les bactéries lactiques qui ont donné un résultat positif ont été sélectionnées pour tester leur pouvoir bactériocinogène à l'égard des deux souches cibles utilisées, en utilisant la méthode de diffusion sur disque, appelée aussi méthode indirecte, sur un tapis bactérien obtenu par méthode d'écouvillonnage à partir d'une suspension standardisée des souches cibles (*E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923) sur la surface d'une gélose MH semi-molle (figure 11).

6.2.1. Préparation des surnageants de bactéries lactiques

Une suspension fraîche de 10ml de bactéries lactiques, obtenue après 24h d'incubation en anaérobiose créer en ajoutant 1ml d'huile de vaseline stérile à la suspension avant incubation afin d'éliminer l'inhibition dû à la production de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).

Les surnageants ont été récupérés par centrifugation de la suspension de bactéries lactique (6000 rpm pendant 30min à 4°C) tout en éliminant le culot.

Les surnageants récupérés ont subi un traitement thermique de 100°C, pendant 5min afin d'inhiber la dégradation des bactériocines par des protéases et éliminer toute activité inhibitrice, d'origine protéique autre que les bactériocines (VinodKumer *et al.*, 2006).

Afin d'éliminer l'effet de l'acidité, une partie du surnageant a été utilisée telle quelle et représente le surnageant brut. Le reste du surnageant a été neutralisé à un pH : 6,7-7 avec du NaOH 2N, ce qui représente le surnageant neutralisé.

Le pH initial des surnageants est représenté dans le tableau suivant :

Surnageant	pH initial
1B	3,88
23B	3,75
24B	4,32
34B	4,10

6.2.2. Méthodes des disques

Après avoir réalisé le tapis bactérien comme indiqué ci-dessus, des disques sont déposés, puis imbibés par un volume de 20µl de surnageant (surnageant brut, surnageant neutralisé, bouillon Elliker (témoin négatif)), puis sont laissés à diffuser pendant 30min à 4°C.

Après une incubation de 24 heures à 37°C, la persistance des zones claires autour des disques bruts et neutralisés témoigne sur la présence d'un effet éventuel de bactériocines sur les souches cibles (Berecka *et al.*, 2009).

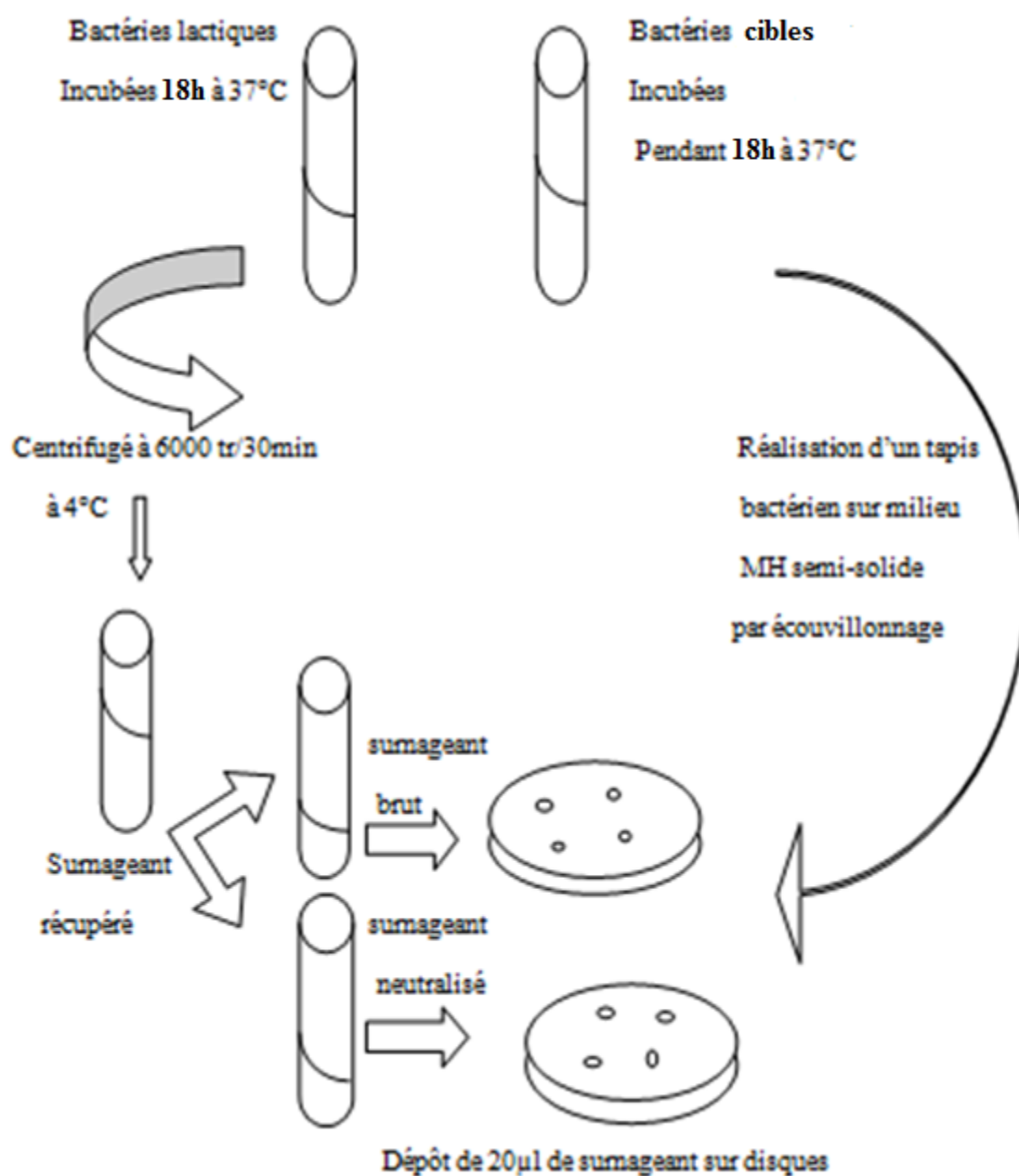


Figure 11: Protocole de screening des souches productrices de bactériocines par méthode indirecte.

1.2.7. Détermination de la nature protéique des bactériocines par électrophorèse PAGE- SDS

La nature protéique des bactériocines n'a pas été confirmée par la digestion enzymatique par faute de temps, c'est pour cette raison qu'une électrophorèse PAGE-SDS a été utilisée comme méthode palliative pour démontrer leur nature protéique comme ça a été décrit par plusieurs auteurs (Laemmli, 1970 ; Schagger et vonJagow, 1987 ; Smaoui, 2010).

Les échantillons ont été préparés en mélangeant 1mg de lyophilisat (surnageant lyophilisé) avec 1ml de tampon d'échantillon. Les marqueurs de taille ainsi que le témoin (milieu Elliker) ont été préparés dans les mêmes conditions.

Le kit protéique utilisé comme marqueur de taille comporte quatre protéines : sérum albumine bovine (67KDa), ovalbumine (45KDa), β -lactoglobuline(18KDa), α -lactalbumine(14KDa).

La migration a été réalisée sur un gel de polyacrylamide en système discontinu, avec un gel de concentration à 4% et un gel de séparation à 17%. La migration a eu lieu à 250 V, 20 mA et 10 W pendant 2h dans un tampon d'électrode (pH : 8,3).

Après migration, le gel a été récupéré, ensuite trempé dans une solution de TCA (12%) pendant 10min, puis transféré dans une solution de coloration au bleu de Coomassie pendant 3h, le gel est ensuite décoloré dans un bain de décoloration jusqu'à ce que les bandes protéiques au niveau du gel soient visibles.

1.2.8. Identification des souches bactériennes productrices de bactériocines

L'identification des souches au stade d'espèce a été réalisée par les techniques classiques, basées sur la recherche d'un certain nombre de caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques. Toutes les techniques d'identification ont été décrites par Larpent (1997), Idoui et Karam (2008) et Gusilset *al.* (2010).

2.8.1.Détermination du type fermentaire

Ce caractère est mis en évidence sur bouillon Elliker reconstitué, contenant du glucose comme source de carbone, le milieu est muni d'une cloche de Durham. Après l'ensemencement des souches à identifier, le bouillon est incubé pendant 24h à 30°C ou 37°C, Le développement d'une bactérie hétéro-fermentaire se manifeste par l'apparition de gaz dans la cloche de Durham, qui est absente chez les bactéries homo-fermentaires (Bourgeois *et al.*,1991).

2.8.2.La fermentation des sucres

Afin de mettre en évidence la fermentation des sucres, deux milieux ont été utilisés, l'un est spécifique aux Lactobacilles et l'autre est spécifique aux Streptocoques. Ces deux milieux contiennent un indicateur coloré qui est le rouge de chlorophénol, sans source de carbone. Dans ce test onze sucres ont été utilisés à savoir: L(+) – arabinose, D(-)arabinose, D(+)-glucose, a-L(+)-rhamnose, D(+)-sucrose, D(+)-galactose, (D+)-mannose, (L-)-sorbose, D(+)-xylose, D(+)-saccharose, D(-)-fructose reinst. Les sucres ont été préparés à 10%, puis stérilisés à l'aide des micros filtres à seringue de 0,45 μ m.

Afin d'éliminer toute trace de sucre, une suspension bactérienne de 18h d'incubation dans le bouillon Elliker a été centrifugé à 9000rpm à 4°C pendant 15min.

Le culot bactérien est lavé deux fois dans les mêmes conditions de centrifugation avec de l'eau physiologique stérile. Le culot issu de la dernière centrifugation est dissout dans de l'eau physiologique, des volumes de 1ml sont prélevés pour ensemercer des tubes contenant 9ml de milieu de fermentation des sucres et une cloche de Durham.

La concentration finale de 1% des sucres à tester, a été obtenue en ajoutant 1ml de la solution sucrée (10%). L'anaérobiose est obtenue par l'ajout de 1ml d'huile de paraffine stérile après avoir chassé le gaz présent dans les cloches de Durham.

La fermentation de sucre et la production de gaz se manifestent par un changement de couleur du milieu (jaune) et une accumulation de gaz dans les cloches (Stiles *et al.*, 1997).

2.8.3. Croissance dans des conditions hostiles

8.3.1. Différentes concentration en NaCl

L'effet de la concentration de NaCl sur La croissance des souches a été étudié en utilisant des bouillons Elliker reconstitués à différentes concentrations en NaCl: 2%, 4% et 6,5%. Après une période d'incubation de 24h (à 37°C ou 30°C).

La formation d'un trouble bactérien témoigne sur la résistance à la concentration en NaCl testées (Badiset *al.*, 2005).

8.3.2. Culture à différents pH

L'effet du pH sur la croissance des souches a été étudié en utilisant des bouillons Elliker reconstitués à différents pH : 3.3, 6.5, 7 et 9.6. Après une période d'incubation de 24h (à 37°C ou 30°C). La formation d'un trouble bactérien témoigne sur la résistance au pH testé (Badiset *al.*, 2005).

8.3.3. Culture à différentes températures

L'effet de la température sur la croissance des souches a été étudié en utilisant des bouillons Elliker incubés à différentes température: 10°C, 15°C, 30°C, 37°C et 45°C.

Après une période d'incubation de 24h, la formation d'un trouble bactérien témoigne sur la résistance à la température testée.

Ces tests vont nous aider à distinguer les souches mésophiles des thermophiles (Carr *et al.*, 2002 ; Badiset *al.*, 2004 ; Hariret *al.*, 2009).

8.3.4. La thermorésistance

Des tubes contenant 10 ml de bouillon Elliker sont inoculés par les souches isolées, ensuite les tubes sont déposés dans un bain marie à 65°C pendant 30 min, après refroidissement, elles sont incubées à 37°C ou 30°C pendant 24h.

La présence de trouble indique une croissance bactérienne et que la souche est thermorésistante (Guiraud, 2003) ; (Badiset *al.*, 2005).

Les étapes à suivre pour ces tests physiologiques sont représentées dans la figure 12.

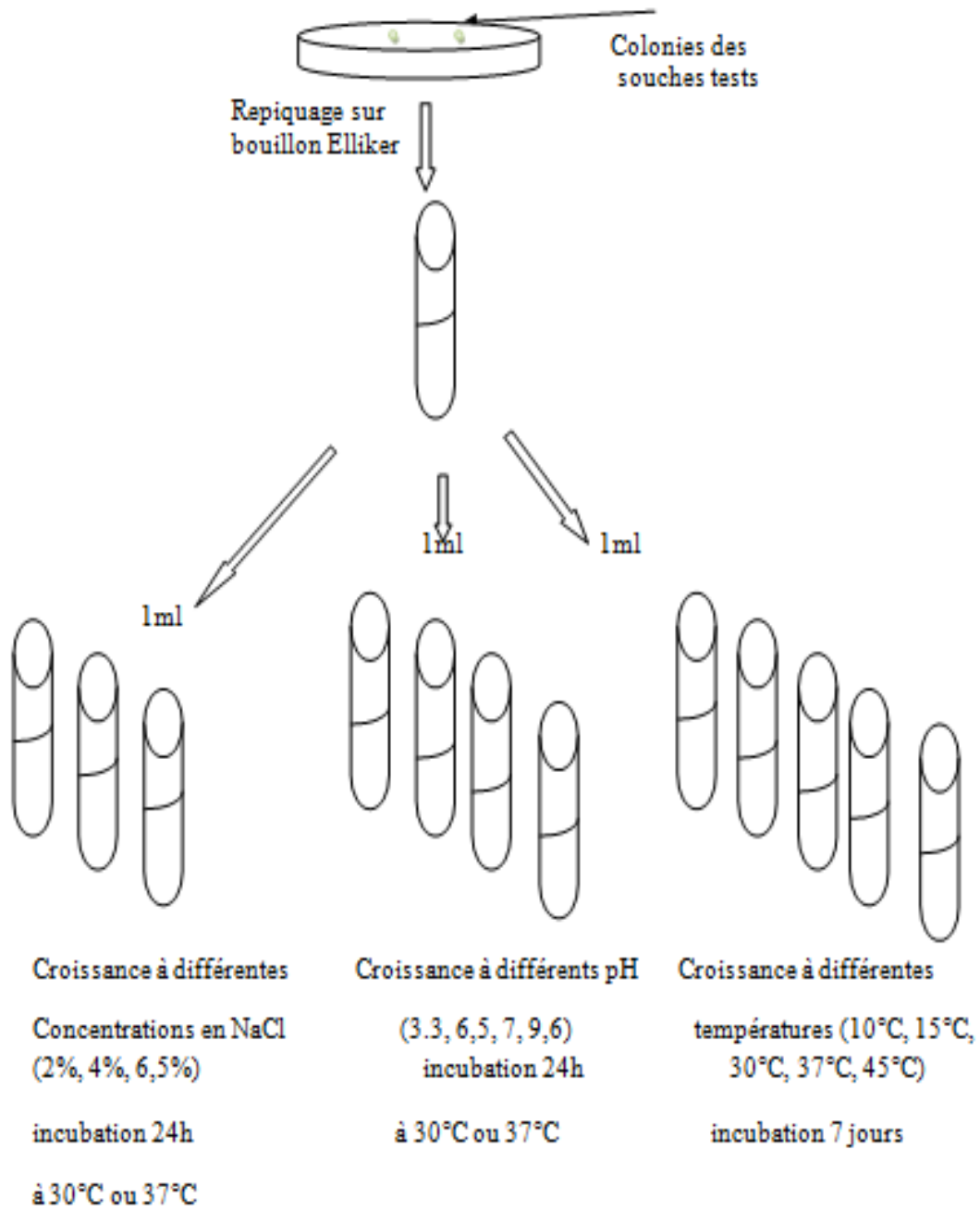


Figure 12: Protocole d'identification des souches dans des conditions hostiles.

Chapitre II

Résultats et discussion

II. Résultats et discussion

2. 1. Isolement et purification des souches

Les résultats des tests d'isolement, catalase et coloration de Gram nous ont permis de sélectionner 36 souches ayant des formes lenticulaires, une couleur blanchâtre ou laiteuse et de taille variable appartenant aux bactéries lactiques comme le montre le tableau V.

Tableau V: les résultats d'isolement et purification des souches de bactéries lactiques.

Origine des échantillons		Souche	Catalase	Gram	Forme
Lait cru	Laits de vaches	S33	-	+	Bacille
		S34	-	+	Coque
		S35	-	+	Bacille
		S4	-	+	Bacille
	Laits de chèvres	S9	-	+	Bacille
		S10	-	+	Bacille
S36		-	+	Coque	
Lait fermenté (Activia)		S1	-	+	Bacille
		S6	-	+	Coque
		S7	-	+	Bacille
		S8	-	+	Coque
Lben		S3	-	+	Coque
		S4	-	+	Coque
		S5	-	+	Bacille
		S17	-	+	Coque
		S18	-	+	Coque
		S19	-	+	Coque
		S20	-	+	Bacille
		S21	-	+	Bacille
		S22	-	+	Coque
		S23	-	+	Bacille
		S24	-	+	Coque
		S28	-	+	Bacille
		S29	-	+	Coque
		S31	-	+	Coque
S32	-	+	Coque		
Yaourt nature		S2	-	+	Coque
		SS11	-	+	Bacille
		S12	-	+	Bacille
		S13	-	+	Coque
		S14	-	+	Bacille
		S25	-	+	Bacille
		S30	-	+	Bacille
Camembert		S15	-	+	Bacille
		S16	-	+	Bacille
		S26	-	+	Bacille
		S27	-	+	Coque

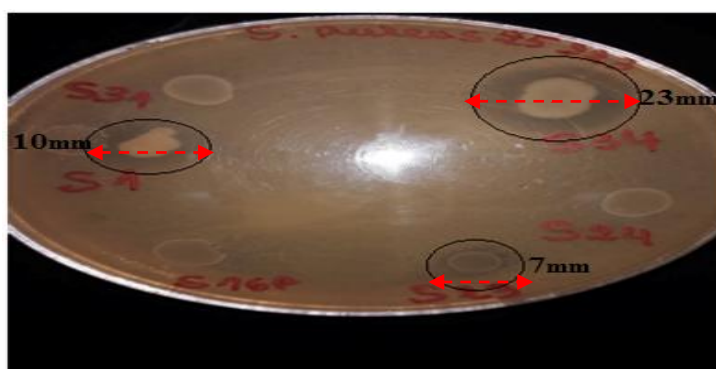
2.2. Résultats du screening des souches productrices de bactériocines

2.2.1. Méthode directe

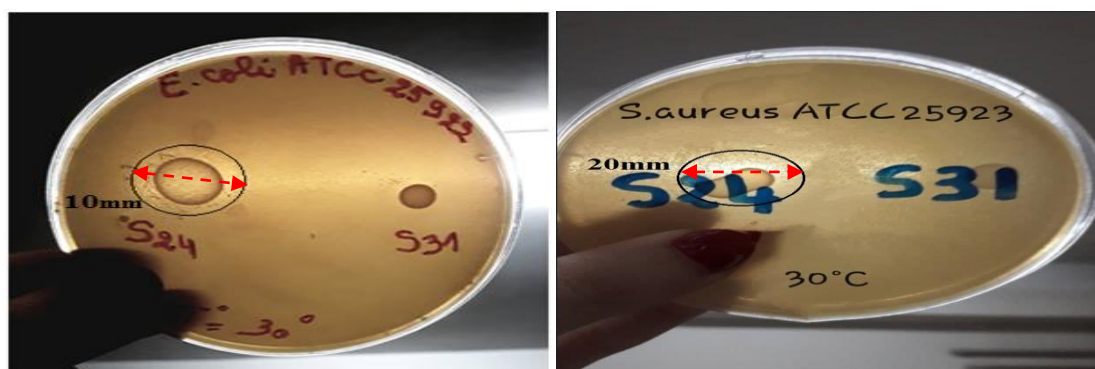
Le résultat du screening des 36 souches isolées a permis de sélectionner 4 souches potentiellement productrices de bactériocines (S1, S23, S24, S34) comme le montre la figure 13, avec une prévalence de 11,11%.

Cette action antimicrobienne est conférée soit par la diminution du pH suite à la production d'acides organiques, ou par la production de différents autres métabolites tels le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl, le dioxyde de carbone, la reutérine et les bactériocines (Albano *et al.*, 2007 ; Anaset *al.*, 2008).

Les résultats obtenus sont largement supérieurs à ceux obtenus par Luo *et al.* (2011), qui ont isolé 5 souches dotées d'une activité inhibitrice sur un total de 256 souches, soit une prévalence de 1,9%. Nos résultats obtenus sont également supérieurs à ceux de Salminen *et al.* (2004), qui ont isolé 4 souches sur un totale de 52 souches ce qui représente une prévalence de 7,69%.



(A)



(B)

Figure 13: Activité antibactérienne des quatre souches vis-à-vis des souches cibles révélé par méthode directe.

A : Activité inhibitrice des souches S1, S23, S34 vis-à-vis de *S. aureus* ATCC 25923 à 37°C

B : Activité inhibitrice de la souche S24 vis-à-vis *E. coli* ATCC 25922 et *S. aureus* ATCC 25923 à 30°C

Les résultats des zones d'inhibitions représentées dans la figure ci-dessus, montrent que *S.aureus* ATCC 25923 est plus sensible à l'activité inhibitrice à l'égard des souches tests: S1, S23, S24 et S34, contrairement à *E.coli* ATCC 25922 qui a été sensible uniquement vis-à-vis de S24.

Ondaet *al.* (2003), confirme que les bactéries Gram positif sont plus sensibles à l'effet bactéricide ou bactériostatique des bactéries lactique où les bactériocines produites par ces dernières agissant sur les Gram positif en formant des pores dans la membrane cytoplasmique qui entraînent des perturbations des fonctions cellulaire. Selon Kalchayanand *al.* (2008), toutes les bactériocines ont une activité dirigée contre les bactéries à Gram positifs puisque la membrane externe des bactéries à Gram négatifs ne permet pas aux bactériocines d'atteindre la membrane interne.

Les résultats obtenus montrent que la température joue un rôle important dans le pouvoir bactériocinogène des bactéries lactiques. Il s'avère que la température de 37°C à donner de meilleurs résultats notamment à l'égard de la souche cible *S.aureus* ATCC 25923.

Ces résultats sont semblables à ceux AGGAG et KHELIL (2013), qui ont observé que l'optimum de production d'un pouvoir inhibiteur est obtenu à 37°C.

Les mêmes résultats de l'effet de la température sur la production d'un effet inhibiteur de *Lb. Plantarium* à l'égard de la souche cible *S.aureus* ATCC 6538, ont montré que la température 30°C et 37°C ont donné de bons résultats (Slim, 2010).

Selon Messenset *al.* (2003), l'effet de la température élevée sur la possibilité de production de bactériocines peut être expliqué par l'activation des protéases du mécanisme de repense au stress thermique au dépend de la production de bactériocines.

2.2.2. Méthodes indirecte

Les résultats des tests des disques sont montrés dans les figures 14 et 15.



Figure 14: L'activité antibactérienne de la souche S24 vis-à-vis la souche cible *E.coli* ATCC 25922 révélé par méthode indirecte.

Selon la figure 14, on constate l'absence d'activité inhibitrice de tous les surnageants vis-à-vis de la souche cible *E. coli* ATCC 25922.

On remarque que l'effet inhibiteur de la souche S24 obtenu par la méthode des spots a disparu avec la méthode de diffusion sur disque.

Schillinger et Lucke (1989), ont remarqué une différence dans l'effet antibactérien selon la méthode utilisée. Effectivement *Lactobacillus sake* a montré un résultat positif par le test des spots, mais qui a disparu lors de l'utilisation des surnageants par la méthode de diffusion dans les puits. Ces résultats sont semblables à nos observations.

Selon Lewus et al. (1991), la disparition des zones d'inhibition par la méthode indirecte peut être à l'origine de plusieurs facteurs, notamment l'agrégation des molécules de bactériocines entre elles, l'hydrolyse des bactériocines par des protéases non spécifique et une faible concentration en bactériocines dans le surnageant sous l'effet de la dilution.

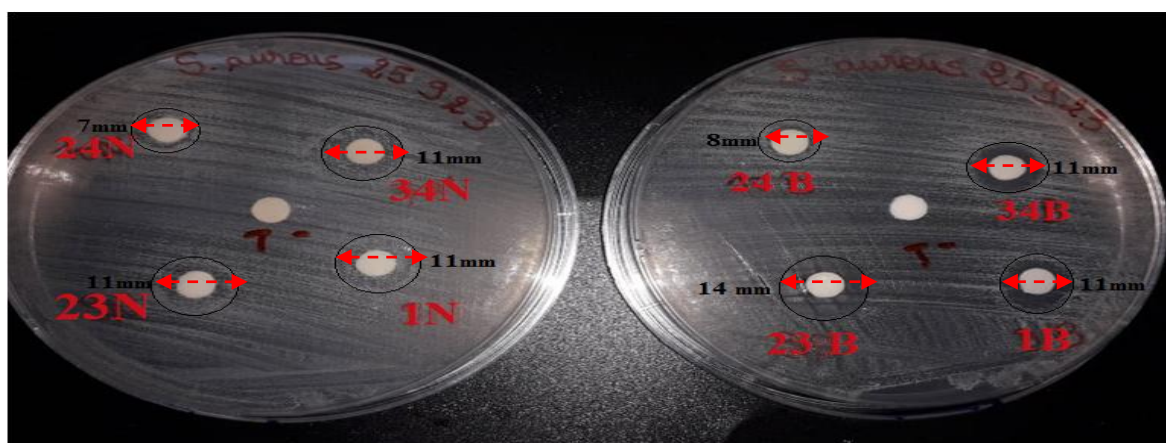


Figure 15: Les résultats du test indirect obtenus lors d'utilisation des surnageants des bactéries lactiques contre *S. aureus* ATCC 25923.

Les résultats de l'antagonisme vis-à-vis de *S. aureus* ATCC 25923 par méthodes des disques sont représentés dans la figure 15.

L'absence de zone d'inhibition au niveau du témoin (bouillon Elliker pH : 6,6), révèle l'absence de l'effet inhibiteur du pH sur la croissance des deux souches cibles : *E. coli* ATCC 25922 et *S. aureus* ATCC 25923.

Les surnageants des quatre souches se sont avérés thermostables au traitement thermique de 100°C pendant 5min, car on distingue des zones d'inhibition similaires à celles obtenues avec des surnageants qui n'ont pas subi de traitement thermique. Vinod Kumer et al. (2006), ont obtenu les mêmes résultats en traitant des surnageants de bactéries lactiques à 100°C.

La persistance des zones d'inhibitions des surnageants bruts et neutralisés, favorise l'hypothèse de la présence potentielle de bactériocines. Cet effet est soutenu par les résultats des surnageants neutralisés ayant subi un traitement thermique préalablement, auxquels les

effets de l'acidité et H_2O_2 ont été éliminés. La présence de l'effet inhibiteur dans le surnageant suggère que la substance inhibitrice se trouve dans le milieu extracellulaire. Des résultats similaires ont été trouvés par Ammore *et al.* (2006). Ce résultat concorde avec les travaux réalisés par l'Abioui *et al.* (2005) ; Elmoualdiet *et al.* (2006).

Selon les résultats obtenus, les surnageants bruts (ϕ S1:11mm ; ϕ S34 : 11mm) et neutralisés (ϕ S1 :11mm ; ϕ S34 :11mm), les souches S1 et S34 ont gardé le même diamètre, cela peut être expliqué par l'absence de l'effet de pH sur l'activité potentielle de la bactériocine.

Les zones d'inhibition obtenues par les surnageants bruts (ϕ S23 : 14mm ; ϕ S24 : 8mm) et les surnageants neutralisés (ϕ S23 :11mm ; ϕ S24 :7mm), diminuent après la neutralisation, cela est probablement dû à l'effet du pH sur l'activité de la bactériocine. Les résultats obtenus sont soutenus par les résultats observés par plusieurs chercheurs (Antanosova *et al.*, 2003 ; Lozo *et al.*, 2007).

Allouche *et al.* (2010), ont également obtenu des diamètres d'inhibition qui varient entre 12mm et 22mm avec tous les surnageants vis-à-vis des souches cibles, après une incubation dans des conditions d'anaérobiose afin d'éliminer tout effet inhibiteur pouvant provenir du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

2.3. Résultat de l'électrophorèse PAGE-SDS

Les résultats obtenus lors de l'électrophorèse sont présentés dans la figure suivante :

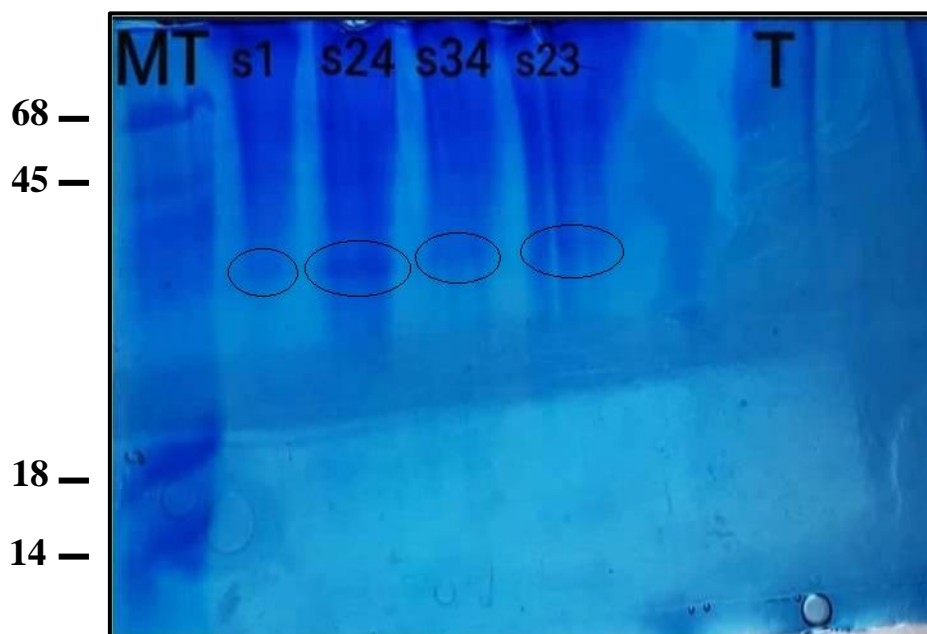


Figure 16: Gel électrophorétique de la migration des quatre souches identifiées.

MT : marqueurs de taille

T: témoin

S1 : lyophilisat de S1

S23: lyophilisat de S23

S24 : lyophilisat de S2

S34: lyophilisat de S34

La migration des marqueurs de taille donnent des bandes de différentes intensités. Quatre bandes électrophorétiques assez claires, ayant migré au même niveau sont constatées pour les lyophilisats, ceci peut être dû aux faibles concentrations des protéines.

L'absence de bandes protéiques pour le témoin (milieu Elliker) et leur apparition dans les milieux contenant les surnageants révèle que ces dernières représentent des bactériocines produites par les souches tests.

Le poids moléculaires des quatre bandes obtenues est déterminé par comparaison aux marqueurs de taille en utilisant la courbe d'étalonnage représenté dans la figure 17. Le poids moléculaire étant le même est estimé à 35,72KDa, il s'agit donc de bactériocines de classe III (PM > 30).

Aslamet *al.* (2011), ont obtenu quant à eux des poids moléculaires inférieurs à 30KDa (2,7KDa) lors de la réalisation d'une électrophorèse PAGE-SDS pour les surnageants appartenant à *Streptococcus thermophilus*. Les bactériocines produites par cette souche peuvent donc être de classe I ou de classe II.

Sivaramasamy *et al.* (2014), ont pu purifier une bactériocine à partir de la souche *Lactobacillus murinus* AU06, obtenue à une température supérieure à 35°C et à un pH de 6. Le poids moléculaire de cette bactériocine a été déterminé par une électrophorèse PAGE-SDS et estimé à 21KDa.

Cette méthode a permis de déterminer le poids moléculaire de la pédiocine LB-B1 produite par *Lactobacillus plantarum* (Xie *et al.*, 2011) et de plusieurs autres bactériocines (Albano *et al.*, 2007 ; Pinto *et al.*, 2009 ; Khalil *et al.*, 2009).

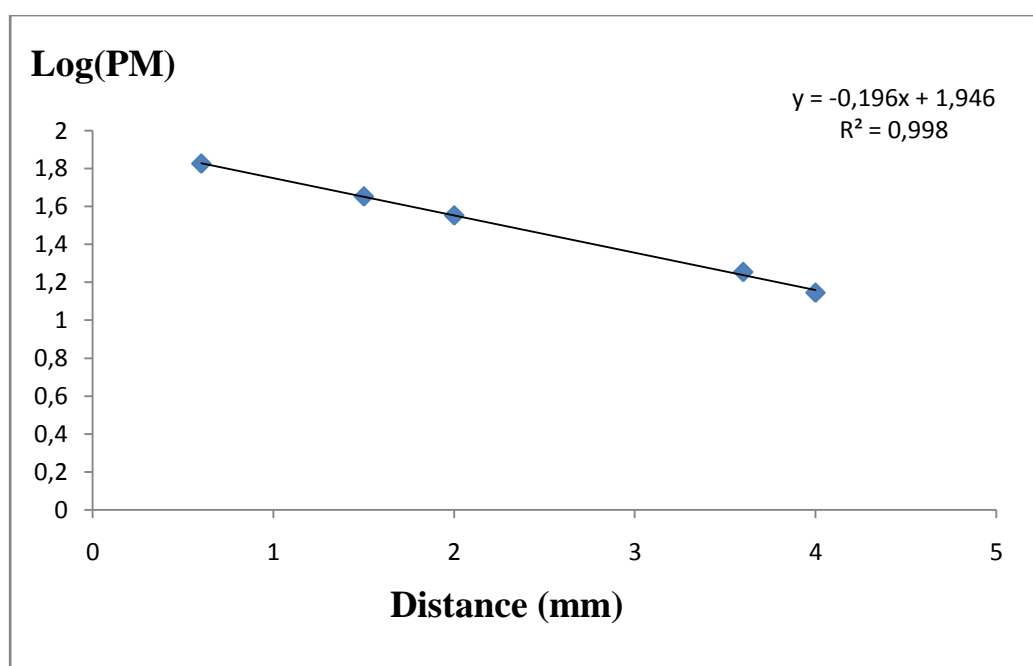


Figure 17: Courbe de calibration PAGE-SDS.

2.4. Identification des bactéries lactiques

2.4.1. Identification au stade genre

Ces tests sont réalisés afin de déterminer le genre des souches isolées, dans notre cas on s’est intéressé uniquement à l’identification des souches dotées d’une activité inhibitrice (S1, S23, S24, S34).

L’identification du genre est d’abord orienté par la morphologie, puis le type fermentaire (production de CO₂ à partir du glucose) et les conditions physiologiques de croissance (Pilet *et al.*, 2005).

Les résultats des méthodes phénotypiques appliquées pour l’identification des souches sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau VI : Résultats des différents tests effectués pour l’identification des souches.

Souche	Catalase	Gram	Forme	Type Fermentaire	Croissance à différentes concentration de NaCl %			Croissance à différentes températures (°C)					Croissance à différents pH				
					2 %	3,3 %	6,5 %	10 °C	15 °C	30 °C	37 °C	45 °C	3,3	6,5	7	9,6	
S1	-	+	bacille	Homo - fermentaire	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+
S23	-	+	bacille	Homo - fermentaire	+	+	+	+	+	+/-	+	+/-	+	+	+	+	+
S24	-	+	Coque	Homo - fermentaire	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+/-	+	+	+	+
S34	-	+	bacille	Homo - fermentaire	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+

On se basant sur les résultats des tests de recherche du type fermentaire, croissances à différents pH, différentes températures, concentrations en NaCl et à la thermorésistance, ainsi que leurs comparaison à d’autres résultats obtenus par Salminen *et al.*(2004), représentés dans le tableau des caractères différentielles des bactéries lactiques cité dans l’annexe 5, nous avons pu établir une pré-identification pour les deux genres *Lactobacillus* et *Enterococcus*.

Les souches tests ont été subdivisées en deux groupes : le 1^{er} groupe qui renferme les trois souches S1, S23 et S34 et le 2^{ème} groupe renfermant la souche S24.

- Le 1^{er} groupe, est caractérisé par une morphologie cellulaire en bâtonnet, les souches sont homo-fermentaires, elles peuvent se développer dans une gamme de températures comprise entre 10 °C et 45 °C et ont également la capacité de se développer à un pH de 3,3 et à différentes concentrations de NaCl (2%, 4%, 6,5%). Ces souches peuvent appartenir aux genres *Lactobacillus*.

Ce résultat n'est pas surprenant, en effet les lactobacilles sont connus pour leur pouvoir acidifiant qui leur permet de résister à des pH inférieurs à 4 (Mc Donald *et al.* 1990, Stiles, 1994). Cette caractéristique fait que les lactobacilles sont souvent, préférentiellement utilisés comme ferments pour plusieurs produits fermentés (Cocconelli et Fontana, 2008).

- Le 2^{ème} groupe, est caractérisé par une morphologie cellulaire en cocci, la recherche du type fermentaire a révélé que S24 est homo-fermentaire, elle peut être cultivée à 45°C et résister à une température de 65°C pendant 30min. Elle peut tolérer différents pH (3.3, 6.5, 7, 9.6) et différentes concentrations en NaCl (2%, 4% et 6,5%). Cette souche appartient donc au genre *Enterococcus* comme le montre le tableau des caractéristiques différentielles des bactéries lactiques (Salminen *et al.*, 2004) (Annexe 5)

La croissance en présence de 6,5% de NaCl, à 45°C et à un pH de 9,6 est un signe caractéristique du genre *Enterococcus* (Devriese *et al.*, 1993 ; Devriese et Pot, 1995). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Guetarni, (2013).

Les genres *Lactobacillus*, *Enterococcus* abritent des espèces considérées comme probiotiques (Fuller, 1991 ; Gordin et Gorbach, 1992).

2.4.2. Identification des espèces

L'identification est complétée par l'étude de la fermentation des sucres par les souches isolées afin de déterminer leurs espèces. Les résultats de la fermentation des sucres par les souches isolées sont représentés dans le tableau suivant (tableau IX):

Tableau VII: Résultats du profil fermentaire.

Souche	L(+)- arabinose	D(-) arabinose	D(+)- glucose	a-L(+)- rhamnose	D(+) sucrose	D(+) galactose	D(+)- mannose	L(-)- sorbitose	D(+)- xylose	D(+) saccharose	D(-)- fructose reinst
S1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S24	+	+/-	+	+/-	+	+	+	-	+	+	+
S34	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

On se basant sur le tableau des caractéristiques des lactobacilles (Guiraud, 2003) (Annexe5) les 3 souches S1, S23, S34 peuvent être classées dans le groupe des *streptobactérium* et en se basant sur leur capacité à fermenter le lactose, l’arabinose, le rhamnose, le saccharose et le xylose, on suppose donc que ces trois souches appartiennent à l’espèce *Lactobacillus rhammnosus*.

Selon le tableau des caractéristiques des *Enterococcus*, *Lactococcus* et *streptococcus*(Guiraud, 2003) (Annexe 5) et de nos résultats obtenus, la souche S24 pourrait appartenir soit à l’espèce *Enterococcusfaecalis*, soit à celle des *Enterococcusfaecium*. En se référant aux résultats de l’électrophorèse, la bande obtenue à partir de la souche S24 (figure 16) est supposée être une bactériocine de classe III en raison de sa thermorésistance et de son poids moléculaire supérieur à 30KDa.

A partir de ces résultat obtenus et du tableau IX des quatre bactériocines de la classe III (Moll *et al.*, 1999), la souche S24 étant une Entérocoque est donc supposée appartenir à l’espèce *Enterococcusfaecium*.

Tableau VIII : Les quatre bactériocines de la classe III (Moll *et al.*, 1999).

Bactériocines	Espèce producteur
Helveticin	<i>Lactobacillus helveticus A</i>
Enterolysine A	<i>Enterococcusfaecium</i>
Zoocin A	<i>Stretococcuszooepidemicus</i>
Millericin B	<i>Streptococcus milleri</i>

Conclusion générale

Conclusion générale

Conclusion

Le but de notre étude était d'isoler et purifier différentes souches de bactéries lactiques productrices de bactériocines à partir de différents produits laitiers (lait cru : lait de vache et lait de chèvre, Lben, lait fermenté (Activia), yaourt nature, camembert), à mettre en évidence l'activité antibactérienne de ces substances inhibitrices, ainsi que l'identification des souches bactériennes productrices de bactériocines par des tests biochimiques et physiologiques.

36 souches ont été isolées et purifiées, parmi lesquelles quatre souches seulement (S1, S23, S24, S34) ont présenté une activité inhibitrice. La détermination de leur capacité à produire des substances inhibitrices a été démontrée en effectuant un screening des 36 souches par contacte directe cellule-cellule entre les souches tests et les souches cibles (*S. aureus* ATCC 25923 et *E. coli* ATCC 25922), l'activité inhibitrice de leur surnageants a également été testées par méthode de diffusion sur disque. Les souches tests ont marqué des résultats positifs que ce soit par méthode directe ou indirecte vis-à-vis de *S. aureus* ATCC 25923. La souche S24 avait présenté un effet inhibiteur contre la souche cibles *E. coli* ATCC 25922 lors du test direct, cet effet a disparu lors de l'utilisation de son surnageant. La nature protéique de ces substances supposées être des bactériocines a été déterminée par une électrophorèse PAGE-SDS.

Les résultats obtenus lors de l'identification des quatre souches productrices de bactériocines révèlent que les isolats étudiés peuvent appartenir aux genres *Lactobacillus rhamnosus*(S1, S23, S34) et *Enterococcus faecium*(S24).

Les résultats de notre recherche permettent d'ouvrir de nouvelles perspectives, nous proposons :

- L'identification génomique des bactéries lactiques productrices de bactériocines, l'étude de leur rôle probiotique ainsi que leurs intérêts en industrie agro-alimentaire ;
- L'optimisation de la production des bactériocines par les bactéries lactiques ;
- La purification des bactériocines et la détermination des propriétés physicochimiques de ces substances ;
- Détermination de la structure des bactériocines par séquençage, ainsi que l'étude de leurs intérêts en industrie agro-alimentaire.

Références

Bibliographiques

Références Bibliographiques

A

Axelsson. L. (1993). Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Lactic acid bacteria. Salminen S. and von Wright A., pp: 1-63. Marcel Dekker Inc. New York.

Axelsson.L. (2004) chapter lactic acid bacteria microbiological and functional aspects edition Marcel, Dekker third edition.

Ammour M. S. (2004). « Ecosystème microbien d'un atelier fermier de salaison Identification et propriétés des bactéries lactiques ». Thèse doctorat Agrocampus Rennes.

Ahamad, N. et Marth, E. H. (1989).« Behavior of *Listeria monocytogenes* at 7, 13, 21, and 35°C in tryptose broth acidified with acetic, citric, or lactic acid ». *Journal of food protection* 52, 688-695.

Adams, M. R. et Hall, C. J. (1988).Growth inhibition of food-borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. *International Journal of Food Science and Technology* 23,287-292.

Albano, H., Pinho, C., Leite, D., Barbosa, J., Silver, J., Carneiro, L., Magalhães, R. (2009).Evaluation of bacteriocin-producing strain of *Pediococcus acidilactici* as a biopreservative for « Alheira », a fermented meat sausage. *Food Control* ,**20**: 764-770.

AGGAG M.L., KHELIL S, (2013). « Détermination de la nature des bactériocines chez quelques bactéries lactiques ». Mémoire de master, université de Mostaganem, Mostaganem P :68.

B

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

Belarbi F., 2011. Isolement et sélection des souches de bactéries lactiques productrices des métabolites antibactériennes. Mémoire de magistère, Université d'Oran Es-Senia., Oran.

Berecka, M. P., Wasko, A., Koston, D. (2009). Comparison of different methods for detection of antimicrobial activity of probiotic strains of *Lactobacillus rhamnosus* against some food spoilage microorganisms. *Annales. Vol. LXIV*1.

Bourgeois C.M., Mescle J.F. et Zuca, J. (1991). Lait et les produits laitiers non fermentés, Microbiologie alimentaires. vol. 1, aspect micro biologique de la sécurité et de la qualité des aliments.

Références Bibliographiques

C

Chammas, G.I., Saliba, R. and Béal, C. (2006).Characterization of the fermented milk Labanl with sensory analysis and instrumental measurements.*J. Food Sci.* **71**: S156–S162.

Carr F.J., Chill D., Maida N. (2002). « The Lactic Acid Bacteria : A Littérature Survey ».*critical Rev. Microbiol.* **28** :281-370.

Collins M.D., Samelis J., Metaxopoulos J., Wallbanks S. (1993). « Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages : Description of a new genus

CORCY J.C. et LEPAGE M. (1991). Fromage Fermiers. La maison Rustique, Paris,P.134-135.

D

Dellaglio F., De Roissart H., Torriani S., Curk, M.C. et Janssens, D. (1994). « Caratéristiques générales des bactéries lactiques ». P : 25-116. In : De Roissart, Luquet F.M. (ed) Bactéries lactiques.Vol 1. Loriga Uriage, Paris, France.

Dortu, C. et Thonart, P. (2009). « Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêt pour la bioconservation des produits alimentaires ». *Biotechnol.Agron. Soc. Environ.* , **13**: 143-154.

E

El-Ziney, M.G., Uyttendaele, M., Debevere, J., Jakobsen, M. (1998).« Characterization of growth and metabolite production of *Lb. reuteri* during glucose/glycerol cofermentationinbatch and coutinuous cultures ». *Biotechnol.Lett.* **20**(10), 913-916.

Ennaher et al (2000). Class IIabacteriocins:biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol Rev.* **24**, 1, 85-106.

Elmoualdi, L., Labioui, H., Boushama, L., Benzakour, A., Ouhssine, M., El Yachioui, M. (2008).Activité bactéricide d'une souche de *Lactococcus lactis subsp.Cremoris*. *Bull. Soc.Pharm. Bordeaux*, **147** : 7-18.

F

Fenton M.P. (1987). An investigation into the source of lactic acid bacteria in GRAS silage J. *ApplBacteriol.***62** :181-188.

FAO, T. W. H. O. (2001) .Probiotic definition

Flemin H.P., Erchells J.L. et Caslilow R.N. (1975). Microbiol inhibition on isolate *Pediococcus*from cucumber bune.*Appl. Environ. Microbiol.*, **30**:1040-1042.

Références Bibliographiques

Fond de Valdez, G, (2002).Maintenance of Lactic Acid Bacteria. In Food Microbiology Protocols.Spencer, J.F.T et Ragout de Spencer, A.L. eds Humana Press. Totowa, New Jersey, Argentine. 163-171.

G

Gonzalez, et al., (2007). In Boudjani, W. (2009). « Action de la flore lactique sur les bactéries contamination ». Mémoire d'ingénieur, Institut de biologie, Université de Tlemcen. 73 pages.

Guiraud, J.P. (1998). Microbiologie alimentaire. Technique et Ingénierie. Série Agroalimentaire, Eds. Dunod Paris, 652 p.

Guiraud J.P. et Rosec J.P., (2004). Pratique des normes en microbiologie alimentaire. AFNOR. 237251.

Guiraud J.P. (2003). Microbiologie alimentaire. Edition.Dunod.,Pari. pp. 315-320.

H

Holzappel W.H., Haberer P., Snel J., Schillinger U., HuisIn't Veld J.H.J. (1998). « Overview of gut flora and probiotics ».Int .J. Food Microbiol.41 :85-101.

K

Khalil, R., Elbahloul, Y., Djadouni, F., Omar, S. (2009). Isolation and partial characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus megaterium*19 strain. *Pak. J. Nutr.*, **8**: 242-250.

Kelly WJ., Davey G.P., Ward LJ. (1998). « Characterisation of lactococci isolated from minimally processed fresh and vegetables ». Int J. Food Microbiol.45 :85-92.

Klaenhammer.TR, (1988) in les bacteriocines des bacterieslactiques ,caracteristiques et interets pour la conservation des produits alimentaires . BASE.VOLUME 13.

L

Laurent, S. (1998). Manuel de bactériologie alimentaire. *Poly technica Paris*. 307 pages.

Weissella for the Leuconstocpamesenteroides group of species ».J. Appl .Bacteriol. 75 : 595-603.

Laease, (2005). In Boudjani, W. (2009). Action de la flore lactique sur les bactéries contamination. Mémoire d'ingénieur, Institut de biologie, Université de Tlemcen. 73 pages.

Lim S.M, 2010. « Cultural conditions arid nutritional components affecting the growth and bacteriocin production of *Lactobacillus plantarum* KC2 1 ». Food Sci. Biotechnol.19 : 793-802.

Références Bibliographiques

Luo F., Feng S., Sun Q, Xiang W., Zhao J., Zhang J., Yang Z. (2011). » Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from kurut, a traditional naturally-fermented yak milk from Qinghai-Tibet plateau ». *Food Control* **22** :50-53.

Larpent J.P. (1997). Mémento technique de microbiologie .3eme Ed. Technique et Documentation Lavoisier. Paris. 910 p.

M

Mami, A., Henni, J. E., Kihal, M. (2008). Antimicrobial activity of *Lactobacillus* species isolated from Algerian raw goat's milk against *Staphylococcus aureus*. *World J. Dairy & Sci* **.3**: 39-49.

Marshall V.M.E., Law B.A.(1984). « The physiology and growth of dairy lactic acid bacteria ».P : 153-186. In : De Davies F.L., Law B.A. (ed) *Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*. Elsevier Applied Science Publisher.

Marchal N., Bourdon J.L. et Richard, C.L. (1991). Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries .3 ème édition, Doin éditeurs, Paris.

Makhloufi .K. M. (2012) .« Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza ». Thèse de doctorat de l'université pierre et marie curie. Spécialité : microbiologie, biochimie (école doctorale iviv).

Messens. W, Vesrluyten.J, Leroy.F, De Vuyst. L, (2003). « Modelling growth and bacteriocin production by *Lactobacillus curvatus* LTH1174 in response to temperature and PH values used for European sausage fermentation process ». *Int. J Food Microbiol.*81 : 41-52.

McAuliffe et al (2001). In *Bacteriocins: biological tools for bio preservation and shelf-life extension*. International Dairy Journal .2006.

Moll. G. N; Konings. W. N; Driessen. J. M. (1999) .Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation .*Antonie Van Leeuwenhoek* 76: p 182.

O

Oh, D. H. et Marshall, D. L. (1993). Antimicrobial activity of ethanol, glycerol monolaurate or lactic acid against *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 20, production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.*50(1-2), 131-149.

Onda T., Yanagida F., Tsuji M., Shinohara T. et Yokotsuka K. (2003). « Production and purification of a bacteriocin peptide produced by *Lactococcus* sp. strain GM005, isolated from Miso-paste ». *International Journal of Food and Microbiology*.87 (1-2): 153-159. *Products* ». *Food Microbiology* **15**: 223-233.

Références Bibliographiques

P

Papa Abdoulaye Fall.(2011). « Études des interactions entre une bactérie bioprotectrice, *Lactococcus piscium* CNCM I-4031, et *Brochothrix thermosphacta* et *Listeria monocytogenes* dans la crevette tropicale ». Thèse de doctorat, UNIVERSITÉ DE NANTES 239-246.

Patterson C, PhD, PAg The pathfinder Research & Management Ltd (2008). « Probiotiques: Bienfaits au-delà des fonctions nutritionnelles de base », 1-4.

Penner et al (2005). « Probiotics and nutraceuticals: no medicinal treatments of gastrointestinal diseases ». In Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Thèse de doctorat 2012.

Prescott, L.M., Harley, J.P. and Donald, A. (2003). Microbiologie, De boeck université, 2eme édition française. **128** : 28-29.

R

Ried et al (2003). Potential uses of probiotics in clinical practice. In Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Thèse de doctorat 2012.

Riley, M. A. et Chavan, M. A. (2007). « Bacteriocins: Ecology and Evolution ». Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

S

Sookkhee S., Chulasiri M., Prachyabrued W. (2001). « Lactic acid bacteria from healthy oral cavity of Thai volunteers : Inhibition of oral pathogens ». *Appl Microbiol.* 90 : 172-179.

Siegmundt, H., Rechinger, KB., Jakobsen, M., (2000). Dynamic changes of intracellular pH in individual lactic acid bacterium cells in response to a rapid drop in extracellular pH. *Appl Environ Microbiol*, **66**: 2330-2335.

Salminen, S., Wright, A. V., Ouwehand, A. (2004). « Lactic acid bacteria. microbiological and functional aspects ». Marcel Dekker. Inc., U.S.A.

Stiles, M. and Holzappel, W. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, **36**, pp: 1-29.

Stiles, M. and Holzappel, W. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, **36**, pp: 1-29.

Smaoui, S. (2010). « Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés ». Thèse de Doctorat. Université de Toulouse.

Références Bibliographiques

Schillinger U and Luke F., (1989). «Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat » .Appl. Environ.Microbiol,55.

SivaramasamyElayaraja, NeelamegamAnnamalai, PackiyamMayavu, ThangavelBalasubramanianAsian Pac J Trop Biomed. 2014 May; 4(Suppl 1): S305–S311.

T

TANTAOUI-ELARAKI, M. BERRADA, A.EL MARRAKCHI ET A. BERRAMOU, Etude sur le lbenMarocain,Le lait 63 (198)(1983) 230-245.

Touati, D. (2000). « Iron and oxidative stress in bacteria ». Archives of Biochemistry and Biophysics 373, 1-6.

V

Van de Guchte, M., Ehrlich, S. D. et Maguin, E. (2001). « Production of growth-inhibitingfactors by *Lactobacillus delbrueckii* ». Journal of Applied Microbiology 91, 147-153.

Vinod Kumar J., Somesh S. etNeerja S., (2006). « Production, purification, stability and efficacy of bacteriocin from isolated of Natural Lactic acid fermentation of vegetables ». *Food technology and Biotechnology*, 44 (3):435- 439.

Y

Yateem, A., Balba, M. T., Al-Surrayai, T., Al-Mutairi, B., Al-Daher, R. (2008).« Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potential from camel milk ». *Int. J. Dairy Sci.* , 3: 194-199.

Z

Zamfir, M., Vancanneyt, M., Makras, L., Vaningelgem, F., Lefebvre, K., Pot, B., Swings, J. and De Vuyst, L. (2006). Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products. *Syst. Appl. Microbiol.* **29**: 487–495.

Annexes

Annexe 01 : les milieux de culture

Gélose MRS : (De Man, Rogosa et Sharpe, 1960)

Peptone 10 g
Extrait de viande 10 g
Extrait de levure 5 g
Glucose 20 g
Citrate d'ammonium 2 g
Acétate de sodium 5 g
Sulfate du magnésium 0,2 g
Sulfate de manganèse 0,05g
Phosphate dipotassique 2 g
Agar 5 g
Tween 1 ml
pH 6,2±0,2
Autoclavage 120°C/20min

Gélose M17(Terzaghi et Sandine, 1975)

Tryptone 2,50 g
Peptone pepsique de viande 2,50 g
Peptone papainique de soja 5,00 g
Extrait autolytique de levure 2,50 g
Extrait de viande 5,00 g
Lactose 5,00 g
Glycérophosphate de sodium 19,00 g
Sulfate de magnésium 0,25 g
Acide ascorbique 2,50 g
Agar agar bactériologique 15,00 g
pH 7,1 ± 1,2
Autoclavage 120°C/20min

Gélose Mueller Hinton

Infusion de viande de boeuf 300g
Hydrolysate de caséine 17,5g
Amidon 1,5g
pH 7,3±0,1

Bouillon BHIB

Protéose-peptone 10g
Infusion de cervelle de veau 12,5g
Infusion de coeur de boeuf 5g
Glucose 2g
Chlorure de sodium 5g
Hydrogénophosphate de sodium 2,5g
pH 7,4

Milieu Elliker

Pour 1 litre de milieu :

Tryptone.	20,0 g
Extrait autolytique de levure	5,0 g
Gélatine	2,5 g
Lactose	5,0 g
Saccharose	5,0 g
Glucose	5,0 g
Acétate de sodium	1,5 g
Chlorure de sodium	4,0 g
Acide ascorbique	0,5 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : $6,8 \pm 0,2$.

Milieu de fermentation des sucres de lactobacilles (quantité pour 500ml du milieu)

Peptone	7,5g
Extrait de levure	2,5g
Tween 80	0,5ml
Gélose	0,5g
Rouge de chlorophénol	20mg (à 0,8% d'éthanol)
pH :	6,4

Milieu de fermentation des sucres Streptocoques (fermentation des sucres)

Extrait de viande	2,5g
Peptone	2,5g
Tryptone	5g
Rouge de chlorophénol	(0,8% dans l'éthanol)
pH :	7

Eau physiologie

NaCl 9g

Eau distillée 1000 ml

Autoclaver à 120°C/20mn

Gélose nutritive (GN)

Peptone 15g

Extrait de levure 3g

NaCl 6g

Agar 15g

Eau distillée 1000ml

- PH 7.5±0.2

Autoclavage à 121°C pendant 15min

Annexe 02: Coloration de Gram

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

1. Sur une lame, fixer à la chaleur une culture bactérienne.
2. Recouvrir la lame avec la solution de violet de gentiane pendant une minute.
3. Ajouter du lugol pendant 30 seconds.
4. Décolorer avec de l'alcool 95°, puis rincer à l'eau.
5. Faire une autre coloration en utilisant la fushine et laisser agir 20 à 30 secondes.
6. Laver à l'eau.
7. Après séchage, déposer une goutte de l'huile à émersion, Observer au microscope optique (G×100) (Gram+ : couleur violette ; Gram- : couleur rose).

Produits chimiques

Fushine phénique

Fushine cristallisée 1g
Alcool éthylique 10ml
Phénon 5g
Eau distillée 10ml

Violet de gentiane phénique

Violet de gentiane 1g

Phénol 11g
Ethanol 10ml
Eau distillée 100ml

Réactifs

Alcool, Eau distillée, Lugol, Solution d'eau oxygénée (30%), L'huile à émersion, Solution NaOH.

Verreries

Béchers à différents volumes, burette, erlenmeyers, flacons en verre (250ml), lames et Lamelles en verre, tubes à essai, Pipettes Pasteur.

Annexe 03 : électrophorèse PAGE-SDS

Préparation du gel de séparation : T =17%

Solution (A) 4,60ml

Solution (S) 2,51ml

Eau distillée 2,73ml

SDS 10% 100µl

TEMED 13µl

Persulfated'ammonium 10% 75µl

Couler à environ 1,5 cm du sommet de la plaque.

Préparation du gel de concentration : T =4,8%

Solution (A) 1,3ml

Solution (C) 2,5ml

Eau distillées 5,8ml

Solution de SDS à 100% 100µl

TEMED 20µl

Persulfate d'ammonium à 10% 10µl

Tampon d'échantillon

Solution(C) 500µl

Eau distillé 250µl

SDS 250µl

2-mercaptoéthanol 50µl

Solution de fixation

TCA	12g
Eau distillée	100ml

Solution de coloration

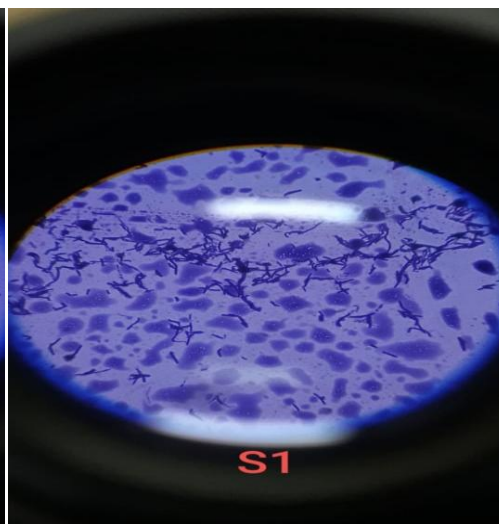
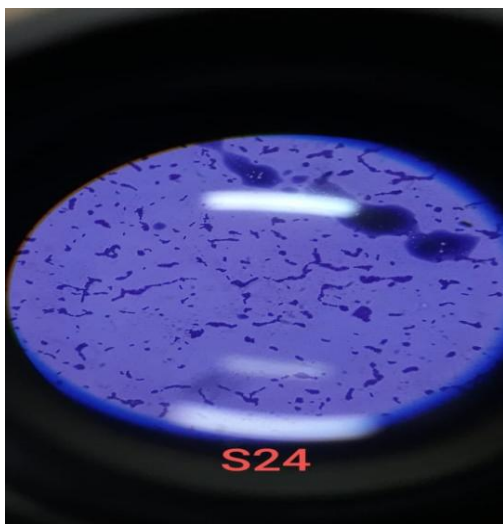
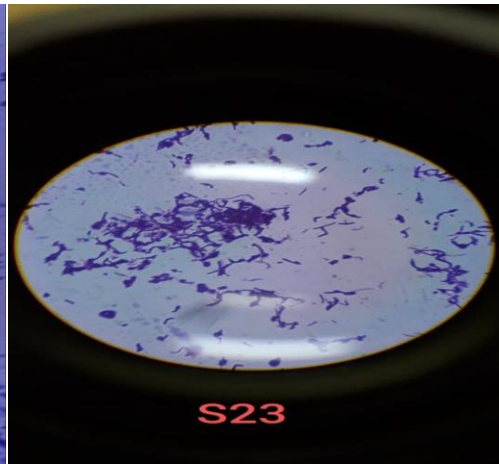
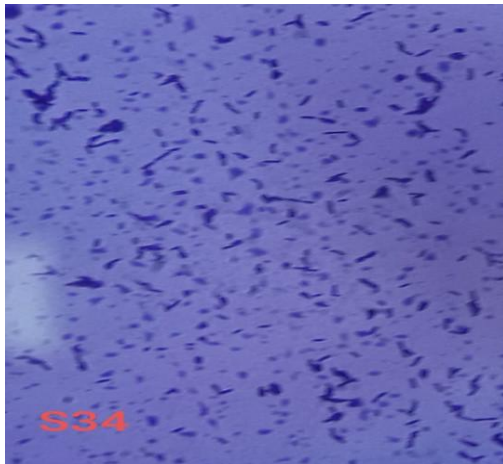
Bleu de Coomassie R250	0,5g
TCA	4g
Méthanol	100ml
EAU distillé	100ml

Solution de décoloration

Acide acétique	37,5ml
Eau distillée	312,5ml
Méthanol	150ml

Annexe 04

Les observations obtenues par coloration de Gram :



Annexe 05

Tableaux référentielles utilisés pour l'identification des souches lactiques

Tableau : Caractéristiques différentielles des bactéries lactiques (Salminen et al., 2004).

Caractères	Bâtonnets			Cocci						
	<i>Carnob.</i>	<i>Lactob.</i>	<i>Aeroc.</i>	<i>Enteroc.</i>	<i>Lactoc. Vagoc.</i>	<i>Leucono. Oenoc.</i>	<i>Pedioc.</i>	<i>Streptoc.</i>	<i>Tetragenoc.</i>	<i>Weisse.</i> ^a
Formation des tétrades	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
CO ₂ à partir de glucose ^b	- ^c	±	-	-	-	+	-	-	-	+
Croissance à 10°C	+	±	+	+	+	+	±	-	+	+
Croissance à 45°C	-	±	-	+	-	-	±	±	-	-
Croissance à 6.5% d'NaCl	ND ^d	±	+	+	-	±	±	-	+	±
Croissance à 18% d'NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Croissance à pH 4.4	ND	±	-	+	±	±	+	-	-	±
Croissance à pH 9.6	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
Configuration d'acide lactique ^e	L	D, L, DL ^f	L	L	L	D	L, DL ^f	L	L	D, DL ^f

+ : Positif, - : Négatif, ± : Réponse varie selon les espèces ; ND : Non déterminé ; *Weisse.*^a : Souches peuvent être bâtonnets. ^b : - : Homofermentaire, + : Hétérofermentaire. ^c : Petite quantité de CO₂ produite qui dépend du milieu.

^d : Absence de croissance à 8% d'NaCl ; ^e : Configuration de l'acide lactique produit à partir de glucose.

^f : Production de D-, L- ou DL- acide lactique varie selon les espèces.

Tableau : Caractéristiques des lactobacilles (Guiraud,2003).

Groupe	Betabacterium										Streptobacterium							Thermobacterium				
	<i>L. brevis</i>	<i>L. buchneri</i>	<i>L. cellobiosus</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. fructivorans</i> *	<i>L. hilgardii</i> **	<i>L. kefir</i>	<i>L. sanfrancisco</i>	<i>L. viridiscens</i>	<i>L. casei/casei</i> ***	<i>L. casei/pseudoplantarum</i>	<i>L. casei/rhamnosus</i> ****	<i>L. casei/olerans</i> *	<i>L. curvatus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. sake</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. delbrueckii/bulgaricus</i>	<i>L. delbrueckii/delbrueckii</i> **	<i>L. delbrueckii/lactis</i>	<i>L. helveticus</i> ***	<i>L. salivarius</i>
CO ₂ sur glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	-	-	-	-	-	-	
Culture à 15 °C	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
Culture à 45 °C	-	-	+	+	-	-	-	v	-	-	-	+	-	-	v	.	+	+	+	+	+	
Arginine (NH ₂)	+	+	+	+	+	v	+	-	-	-	-	-	-	-	.	-	-	v	v	-	-	
Amygdaline	-	-	v	-	-	-	-	.	-	+	+	+	-	-	+	+	+	v	-	+	v	
Esculine	v	v	+	-	-	-	-	v	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	v	-	
Culture teepol 0,4 %	+	+	+	-	+	-	-	-	-	.	+	
Arabinose	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	v	-	-	v	+	-	-	.	.	.	
Cellobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	v	v	-	
Gluconate	v	v	v	v	v	v	v	v	v	+	v	+	v	+	+	+	-	-	-	-	-	
Lactose	v	v	v	+	-	v	v	.	-	v	+	+	+	v	+	-	+	+	-	+	+	
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	v	+	-	-	-	-	+	
Mélezitose	-	+	+	.	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	v	v	
Mélibiose	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	v	-	-	-	-	+	
Raffinose	v	v	+	+	-	v	-	-	-	-	-	-	-	+	-	v	-	-	-	-	+	
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	v	-	-	-	-	-	
Ribose	+	+	+	+	v	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	
Saccharose	v	v	+	+	v	v	-	-	v	+	+	+	-	v	+	+	+	-	+	+	-	
Tréhalose	-	-	+	v	-	-	-	-	v	+	+	+	-	-	+	.	v	-	v	+	v	
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	
Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	v	+	-	-	-	-	+	
Acide lactique (type)	DL	.	.	DL	DL	DL	.	.	.	L	D	L	.	DL	DL	DL	DL	D	D	D	DL	L
Sérotype	E	E	F	F	BC	.	C	-	.	D	.	.	E	E	E	A	G
% acide sur lait	1,3	.	1,3	-	.	0,3	.	0,3	1,5	0	1,5	2,7	0,9
																	1,2	2	4	3		
Auxotrophies	F	R	-	-	R	PF	.	PF	.	.	-	.	RFB	R	RT	RB	RP	RF

v : variable ; R : riboflavine ; P : pyridoxal ; F : acide folique ; B : vitamine B12 ; T : thymidine ; . : non déterminé
 * voisin de *L. trichodes* ; ** voisin de *L. delcidiosus* ; *** = *L. casei* ; **** = *L. rhamnosus* ; * = *L. tolerans* = *L. paracasei/ tolerans* ; ** voisin de *L. leichmanii* ; *** voisin de *L. jugurti*

Tableau : Caractéristiques d'*Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* (Guiraud ,2003).

Tableau 14 – Caractéristiques des *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus*

	<i>Enterococcus</i>			<i>Lactococcus</i>			<i>Streptococcus</i>					
	<i>E. durans</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>L. lactis</i> subsp <i>cremoris</i>	<i>L. lactis</i> subsp <i>lactis</i>	<i>L. « diacetylactis »</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>S. boris</i>	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. mitis</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. thermophilus</i>
Groupe sérologique	D	D	D	N	N	N	B	D	C	-	A	-
Hémolyse	$\alpha\beta$	β	(α)	γ	γ	γ	(β)	(α)	α	(α)	β	(α)
Croissance à 10 °C	v	+	+	+	+	+	v	-	-	+	-	-
Croissance à 45 °C	+	+	+	-	-	-	-	v	-	-	-	-
Croissance à pH 9,6	+	+	+	+	-	+	-	v	-	v	-	+
Croissance à 6,5 % NaCl	+	+	+	-	-	-	v	-	-	v	-	-
Croissance sur milieu billé	+	+	+	-	-	-	v	+	-	-	-	-
Résistance 30 mn à 63 °C	v	+	+	v	v	v	-	+	-	v	-	-
Résistance à l'optochine	-	-	-	-	-	-	+	+	+	v	+	v
Croissance sur lait « bleu »	v	+	+	+	v	+	-	-	-	-	-	-
Arginine	+	+	+	+	-	+	+	-	+	v	+	v
Résistance au tellurite	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hydrolyse de l'hippurate	v	+	+	-	v	v	+	-	-	-	-	-
Réduction du TTC	-	+	-	-	-	-	-	v	-	-	-	-
Lait tournesolé	ARC	ARC	ARC	ARC	ARC	ARC	-	AC	-	-	A	AC
Lactose	+	+	+	+	+	+	v	+	+	+	+	+
Maltose	(+)	(+)	(+)	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Mannitol	-	+	+	-	-	-	-	v	-	-	-	-
Melibiose	-	-	v	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acétoïne (VP)	v	v	v	+	-	-	v	v	-	-	-	v*
Citrate	v	+	-	(+)	-	+	-	-	-	-	-	v
CO ₂ sur citrate	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
β -glucuronidase	-	-	-	-	-	-	(+)	+	+	-	(-)	-
Gélatinase	-	v	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-
Hydrolyse de l'amidon	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Esculine	+	+	+	v	v	v	-	+	-	v	v	-

v : variable ; (+) : positif pour la plupart des souches ; A : acidification ; R : réduction ; C : coagulation
 . : non déterminé ; * : + sur citrate