



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen  
Faculté des SNV/STU

**Département de Biologie**  
**Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire au**  
**Biomédical et à l'environnement**

مخبر الميكروبيولوجيا التطبيقية للأغذية للبيوطبي وللبيئة



## MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme de *Magister en Biologie*

**Option : *Maitrise de la Qualité Microbiologique et du Développement Microbien***

**THEME :**

**Recherche des bactéries lactiques productrices des  
bactériocines et l'étude de leur effet sur des bactéries néfastes**

***Présenté par : Mme BOUMEDIENE Karima épouse LAKEHAL***

**Soutenu le :**

**Devant le jury composé de :**

<b>Mr. Abdelwahid Djamel</b>	Professeur	Président	Université de Tlemcen
<b>Mme Hassaine Hafida</b>	MCA	Examineur	Université de Tlemcen
<b>Mme Khelil Nihel.</b>	MCA	Examineur	Université de Tlemcen
<b>Mr Moussa-Boudjemaa Boumediene</b>	Professeur	Rapporteur	Université de Tlemcen
<b>Mme Bendimerad Nahida</b>	MAA	Invité	Université de Tlemcen

**Année universitaire: 2012-2013**

## *Dédicaces*

*Je dédie ce travail à*

*Mon père Mr. Boumediene Ahmed Tu es un pilier solide et  
incontournable pour ma personne et mon parcours, que Dieu te donne  
la santé et longue vie*

*Ma mère, Que ce travail soit pour toi le témoignage de mon infinie  
reconnaissance pour ton aide précieuse et toutes ces années de  
compréhension*

*A mon beau père et ma belle mè*

*Mon cher mari Mr. Abdelmadjid Lakehal Pour ton soutien et ta  
compréhension*

*Mon bébé Mohammed Zakarya né au cours de la préparation de cette  
thèse et qui a illuminé ma vie*

*A mes sœur Fatima Zohra, Sara, Siham Nour el houda.*

*Mon cher frère Mohammed*

*Mes deux belles sœurs*

*Mes beaux frères*

*Karima*

## ***Remerciements***

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été effectués au Laboratoire de recherche en Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE) de l'Université de Tlemcen

Avant tout, je remercie Dieu le tout puissant, le Miséricordieux, de m'avoir donné le courage, la force, la santé et la persistance pour mener à terme ce travail.

L'encadrement scientifique de ce travail a été assuré par le Professeur Boumediene Moussa-Boudjemâa, directeur du Laboratoire Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE). je tiens à le remercier infiniment pour l'honneur qu'il m'a fait en dirigeant ce travail, pour ses aides, ses conseils, tout au long de l'élaboration de ce travail.

Mes remerciements les plus chaleureux et respectueux vont au Professeur Djamel Abdelwahid, responsable de l'équipe de recherche « Ecologie Microbienne » au niveau du LAMAABE pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury de ce mémoire.

Mes remerciements vont aussi aux Docteurs Hafida Hassaine et Nihel Khelil, toutes deux Maitres de conférences classe A à l'Université de Tlemcen et respectivement responsables des équipes de recherche « Hygiène hospitalière » et « Bactéries extrémophiles » au niveau du LAMAABE, d'avoir accepté, malgré leurs nombreuses occupations et tâches d'enseignement et d'encadrement, de lire et de juger ce travail. Qu'elles trouvent ici l'expression de mes sincères sentiments de gratitude et de respect.

Mes remerciements vont également à madame Nahida Bendimerad maitre assistante « A » à l'Université de Tlemcen d'avoir pris de son temps pour m'aider dans le cadre de ce travail. Je suis particulièrement reconnaissante et honorée par sa participation au jury de ce mémoire en tant qu'invitée.

Un remerciement spécial et chaleureux à mes amies : Didouh Nassima, Cherif Antar Asma et Benhmed Meriem doctorantes au LAMAABE et membres de l'ER « Sécurité microbienne des aliments » pour tous les bons moments partagés ensemble, pour leur soutien et pour leur amitié sincère.

Un spécial clin d'œil à ma chère amie Khadidja Medjahdi, pour son soutien sans faille, sa compréhension et ses encouragements.

Enfin Ma profonde gratitude, mes sentiments les plus amicaux et mes infinis remerciements vont à tous et toutes mes collègues et ami(e)s des quatre équipes du LAMAABE pour l'ambiance amicale et conviviale qu'ils ont su tisser au sein du laboratoire.

## الملخص

في هذا العمل قمنا بحساب وتعريف ببكتيريا لبنية معزولة من حليب غير طازج للأبقار والنعجة تنتمي إلى مزرعة توجد بنواحي تلمسان. إن العدد المتوسط الذي تحصلنا عليه يتراوح من  $10^7 * 10,4$  إلى  $10^7 * 16,8$  UFC/ml أما بالنسبة لحليب النعجة فيقدر ب  $10^8 * 10,9$  UFC/ml أما العدد المتوسط لبكتيريا الضارة بالنسبة للنعجة  $10^7 * 3,9$  UFC/ml وللأبقار  $10^7 * 7$  UFC/ml. من بين 22 سلالة تم تنقية وتعريف خمسة أجناس هي : (4) Leuconostoc, (5) Lactococcus, (9) Lactobacillus (1) Streptococcus, (2) Pediococcus سمحت لنا دراسة الخصائص البيوكيميائية والفيزيولوجيا بتعريف وترتيب أنواع مختلفة. ست سلالات تقوم بإنتاج العطر وهي: (*Lactobacillus paracasei* (*Lactococcus lactis subsp paracasei*, *Lactobacillus sp*) deux Lactococcus (*Lactococcus lactis subsp lactis biovar diacetylactis*, *Lactococcus lactis subsp cremoris*) et deux Pediococcus (*Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus dextrinicus*). البحث عن ببكتيريا لبنية المنتجة ل (bactériocine) بطريقة diffusion en puits باستعمال *E.Coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 أظهرت عدم وجود أي نتيجة موجبة لكل السلالات المدروسة.

**Mots clés:** حليب طازج , ببكتيريا لبنية , lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus, Bactériocines

## Résumé

Le dénombrement de la flore mésophile aérobie totale de laits cru de vache et de brebis de la région de Tlemcen a révélé une charge variant entre  $7 \times 10^7$  UFC/ml pour le lait de vache et  $3.9 \times 10^7$  UFC/ml pour le lait de brebis. Le dénombrement des bactéries lactiques dans ces mêmes laits a montré que le nombre moyen des bactéries lactiques varie de  $1,04 \times 10^8$  à  $1,68 \times 10^8$  UFC/ml dans le lait de vache, tandis que dans le lait de brebis, il est en moyenne de  $1,09 \times 10^9$  UFC/ml.

A partir des dénombrements des bactéries lactiques, une collection de 22 souches isolées et purifiées a été mise au point. Cinq (05) genres ont pu être identifiés : lactobacillus comprenant 9 souches, Lactococcus : 5 souches, Leuconostoc : 4 souches, Pediococcus : 2 souches et enfin Streptococcus avec une souche isolée.

L'étude de caractéristiques biochimiques et physiologiques a permis d'identifier six souches présentant une forte production de diacétyle dont deux lactobacilles (*Lactobacillus paracasei subsp paracasei*, *Lactobacillus sp*) deux Lactococcus (*Lactococcus lactis subsp lactis biovar diacetyllactis*, *Lactococcus lactis subsp cremoris*) et deux Pediococcus s(*Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus dextrinicus*). La recherche des bactéries lactiques productrices de bactériocines par la méthode de diffusion en puits en utilisant quatre souches de référence *E.coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a donné des résultats négatifs pour toutes les souches étudiées.

**Mots clés:** lait cru, bactérie lactique, lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus, bactériocines

## Abstract

Enumeration and identification of lactic acid bacteria isolated from raw cow's milk and sheep belonging to a farm in the region of Tlemcen shows that the average number of lactic acid bacteria range from  $10.4 \times 10^7$  to  $16.8 \times 10^7$  UFC / ml. While the number of colonies in sheep milk is on average  $10.9 \times 10^8$  CFU / ml. For the total flora the number is between  $3.9 \times 10^7$  CFU / ml for sheep and 7107 CFU / ml for cow's milk. A collection of 22 strains isolated and purified was put to point five genera were identified: Lactobacillus (9), Lactococcus (5), Leuconostoc (4), Pediococcus (2) and Streptococcus (1). The study of biochemical and physiological characteristics were identified and classified into different species. Six strains with high production of diacetyl two lactobacilli (*Lactobacillus paracasei subsp paracasei*, *Lactobacillus sp*) two Lactococcus (*Lactococcus lactis subsp lactis biovar diacetylactis*, *Lactococcus lactis subsp cremoris*) and two Pediococcus (*Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus dextrinicus*). Research of lactic acid bacteria producing bacteriocins by well diffusion method using four reference strains **E. coli ATCC 25922**, **Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853**, **Bacillus cereus ATCC 11778** and **Staphylococcus aureus ATCC 25923** gave negative results for all strains studied.

**Keywords:** raw milk, lactic acid bacteria, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus, Bacteriocins

## Liste des abréviations

<b>°C:</b> Degré celsius	<i>Lc. Lactococcus</i>
<b>°D:</b> Degré Dornic	<i>Ln. Leuconostoc</i>
<b>µg :</b> microgramme	<b>Melan:</b> methyllanthionine
<b>µl:</b> microlitre	<b>M.E.T.:</b> microscope électronique à transmission
<b>µM :</b> micromolaire	<b>ml:</b> millilitre
<b>ADN :</b> Acide DéoxyriboNucléique	<b>MRS:</b> Man Rogosa Sharpe
<b>ADNr:</b> ADN ribosomal	<b>NaCL:</b> chlorure de sodium
<b>ADP:</b> Adénosine Diphosphate	<b>NAD+/ NADH, H+</b> Coenzyme d'oxydoréduction nicotinamide adénine dinucléotide
<b>AFNOR:</b> Association Française de Normalisation	<b>NaOH :</b> Hydroxyde de sodium
<b>ARN :</b> Acide RiboNucléique	<i>Pc. Pediococcus</i>
<b>ARNt:</b> ARN de transfert	<b>PCR:</b> Polymerase Chain Reaction
<b>ATP:</b> Adénosine Triphosphate	<b>PEP :</b> Phospho-énolpyruvate
<b>BL:</b> bactérie lactique	<b>pH:</b> potentiel Hydrogène
<b>Carno:</b> <i>Carnobacterium</i>	<b>Pi:</b> phosphate inorganique
<b>Cm:</b> centimètre	<b>PMF:</b> force proton motrice
<b>Cys:</b> Cysteine	<b>PTS :</b> Phosphotransférase
<b>CO2:</b> dioxyde de carbone	<b>qsp:</b> quantité suffisante pour
<b>dATP:</b> Désoxyadénosine Triphosphate	<b>RFLP:</b> Restriction Fragment Length Polymorphism
<b>dCTP:</b> Désoxycytidine Triphosphate	<i>Sc. Streptococcus</i>
<b>DO:</b> Densité Optique	<b>sec:</b> seconde
<b>DHAP:</b> dihydroxyacétone-phosphate	<b>Ser:</b> serine
<b>dTTP:</b> Désoxythymidine Triphosphate	<b>Sp. :</b> espèce non précisée
<b>EMP :</b> Embden- Meyerhof-Parnas	<b>Spp. :</b> plusieurs espèces non précisée
<b>FAO/OMS:</b> Food and Agriculture Organization / Organisation Mondiale de la Santé	<b>Subsp.:</b> Sous espèce
<b>FBP:</b> fructose-1, 6- bisphosphate	<b>T°:</b> Température
<b>FBA:</b> fructose-1, 6- bisphosphate aldolase	<b>Thr:</b> threonine
<b>g :</b> gramme	<b>TPI:</b> triose-phosphate
<b>GAP:</b> glycéraldéhyde- 3 –phosphate	<b>U :</b> unité
<b>G-C :</b> Guanine- Cytosine	<b>UFC:</b> unité formant colonie
<b>GLK:</b> glucokinase	<i>W.: Weissella</i>
<b>GN:</b> gelose nutritif	
<b>H:</b> helicobacter	
<b>Lan:</b> lanthionine	
<i>Lb. Lactobacillus</i>	

## Liste des tableaux

**Tableau 01** : quelques caractéristiques des bactéries lactiques

**Tableau 02** : quelques genres de bactéries lactiques

**Tableau 03** : la nouvelle classification des lactobacilles selon ATLAN (2000)

**Tableau 04** : Principales caractéristiques des bactéries lactiques

**Tableau 05** : les quartes bactériocines de la classe III

**Tableau 06** : Milieux utilisés et conditions d'incubation pour l'isolement des bactéries lactique

**Tableau 07** : caractères des souches de références

**Tableau 08** : le nombre moyen des colonies dénombrées

**Tableau 09** : différentes genres des bactéries lactiques isolées

**Tableau 10** : caractéristiques physiologiques et biochimiques des bactéries lactiques

**Tableau 11** : production d'acide pour les souches isolées

**Tableau 12** : les activités technologiques de bactéries isolées

**Tableau 13** : les différents caractères des lactobacilles isolés

**Tableau 14** : les différents caractères des Lactococcus isolés

**Tableau 15** : les différents caractères des Leuconostoc isolés

**Tableau 16** : les différents caractères des Pediococcus isolés

**Tableau 17** : les différents caractères des Streptococcus isolés

## Liste des figures

**Figure 01 :** 1a. *Lactobacillus* Rosell-11 observé au microscope électronique à transmission (M.E.T.) (x10000). 1b. *Leuconostoc lactis* observé au M.E.T. (x 10000).

**Figure 02 :** Arbre phylogénétique des bactéries Gram positives

**Figure 03 :** les différentes morphologies cellulaires de *Lactobacillus*:

**Figure 04 :** Représentation schématisée des principales voies de fermentation des hexoses chez les bactéries lactiques.

**Figure 05 :** Représentation schématisée de deux antibiotiques la Nisine A et Epilancine K7

**Figure 06 :** Les modèles de formation de pores. (A): pores en forme de coin. (B): pore en forme de tonneau en bois debout).

**Figure 07 :** Les mécanismes cellulaires de production des bactériocines de classe II

**Figure 08 :** Schéma de la méthode de diffusion en puits

**Figure 09 :** photos des bactéries lactiques isolées

**Figure 10 :** répartition des souches lactiques isolées

**Figure 11 :** Photo d'Observation Microscopique d'une bactérie lactique. (A) : des bâtonnets, (B) : des coques

**Figure 12 :** (A) : test d'arginine positive. (B) test de production d'arôme.

**Figure 13 :** photo de test de citratase (A), hydrolyse de l'esculinase (B)

**Figure 14 :** photo de type fermentaire (A) hétérofermentaire (B) homofermentaire

**Figure 15 :** photo de l'utilisation des sucres par les bactéries isolées

**Figure 16 :** courbe de la cinétique d'acidification de BL14, BL16 et BL22.

**Figure 17 :** Photos de résultats de la recherche des bactériocines

## Liste des annexes

**Annexe 01:** milieux de culture

**Annexe 02:** Coloration de Gram

**Annexe 03:** Tableaux de mesure d'acidité et de la cinétique d'acidification

**Annexe 04:** tableau des caractères biochimiques et physiologiques des souches de lactobacillus ayant une activité antimicrobienne isolées à partir de lait cru de vache.

# Table des matières

Dédicaces	I
Remerciements	II
المخلص	III
Résumé	IV
Abstract	V
Liste des abréviations	VI
Liste des figures	VII
Liste des tableaux	VIII
Liste des annexes	IX

## PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction générale.....	01
<b>I. Les Bactéries Lactiques</b>	
1-Introduction :.....	03
2-Définition :.....	03
3-Habitat.....	04
4-Caractéristique générales des bactéries lactiques .....	05
5-Classification :.....	06
5.1-Les coques lactiques.....	08
5.2-Les Lactobacilles.....	09
6- les fermentaires du métabolisme carbonées.....	14
6.1définition.....	14
6.2.1la voie homofermentaire.....	15
6.2.2 la voie hétérofermentaire.....	15
7-Rôles et intérêts des bactéries lactiques .....	16
7.1-domaine alimentaire : .....	16
7.2-domaine de santé : .....	16
7.3-notion des probiotiques .....	17
7.3.1-définition .....	17
7.3.2-rôle des probiotiques.....	18
7.3.3-applications des probiotiques.....	18
<b>II. Les Bactériocines</b>	
Introduction.....	19
1-Définition.....	19
2- Classification : .....	19
2-1 Classe I Lantibiotiques :.....	19
2-2 Bactériocine de classe II :.....	21
2-3 bactériocines de classe III : .....	22
3-Mode d'action : .....	22
3-1 les lantibiotiques : .....	23
3-2 la classe II .....	24
4-Synthèse et sécrétion :.....	25
4-1 les lantibiotiques : .....	25
4-2 les bactériocines de classe II : .....	26
5-immunité.....	27
6- les applications des bactériocines dans l'industrie alimentaire : .....	27
6-1 les propriétés des bactériocines pour une application alimentaire.....	27
6-2 les applications des bactériocines dans le secteur alimentaire:.....	27
7-limites d'utilisations des bactériocines.....	28

8-résistances aux bactériocines.....	29
--------------------------------------	----

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

### **III. Matériels Et Méthodes**

Échantillonnage : .....	30
Dénombrement de la flore totale et la flore lactique.....	30
Isolement : .....	31
Purification : .....	31
Identification :.....	31
1/ caractères cultureux et morphologiques :.....	31
2/caractères physiologiques :.....	31
3/caractères biochimiques :.....	32
4/Conservation des souches :.....	33
5/ caractères technologiques :.....	33
5-a/pouvoir acidifiant :.....	33
a-1/mesure de l'acidité :.....	33
a-2/la cinétique d'acidité : .....	33
5- b/ pouvoir protéolytique : .....	33
5- c/pouvoir aromatisant :.....	33
5-d/ recherche des bactériocines :.....	34
d-1les souches de référence: .....	34
d-2 la méthode de diffusion en puits :.....	35

### **IV. Résultats et discussion**

I. résultats .....	37
1. Dénombrements .....	37
2. isolement.....	37
3. identification.....	38
4. étude de caractères technologiques.....	44
II. discussion des résultats.....	46
1-Identification des souches.....	47
2 -discussion générale.....	49
Conclusion et perspectives.....	51
Références bibliographiques .....	52
Annexes .....	59

## INTRODUCTION

Les bactéries lactiques présentent un grand intérêt dans l'industrie. Elles sont largement utilisées dans l'élaboration des produits alimentaires par des procédés de fermentations lactiques. Les bactéries lactiques assurent non seulement des caractéristiques particulières d'arômes et de texture mais aussi une bonne sanitaire sécurité alimentaire. Cette sécurité est favorisée grâce à la production d'acides organiques (acides lactiques et acétiques) qui font baisser le pH dans le milieu.

Les techniques de biologie moléculaires ont permis de mettre en évidence une forte diversité génomique qui a conduit à la classification récente de treize genres : Carnobacterium, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Oenococcus, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus, Vagococcus, Weissala, Aerococcus, Bifidobacterium (Carine et al., 2009).

Malgré la disponibilité de plusieurs techniques de conservation fiables et adéquates (e.g. réfrigération, congélation, stérilisation, séchage, préservation, etc.). la contamination et la détérioration des produits alimentaires par les micro-organismes n'est pas encore sous contrôle. Par ailleurs, les consommateurs refusent de plus en plus les aliments préparés avec des agents conservateurs d'origine chimique. Ainsi, les industries agroalimentaires se tournent de plus en plus vers des techniques de préservation plus douces qui peuvent conduire à l'obtention d'aliments sécurisés mais présentant un aspect plus naturel et une qualité nutritive affectée au minimum. Ces techniques sont notamment basées sur l'activité antimicrobienne naturelle associée à des souches bactériennes agissant comme des cultures protectrices. C'est le cas des bactériocines des bactéries lactiques qui montrent une activité contre les bactéries qui sont résistantes aux antibiotiques classiques.

Les bactériocines pourraient être des conservateurs alimentaires intéressants à l'échelle industrielle du fait de leur thermostabilité de leur spectre d'activité relativement étroit.

Plusieurs bactéries lactiques sont connues comme productrices de bactériocines qui sont des substances antimicrobiennes de nature peptidique. (Diep et Nes., 2002) mais actuellement seule la nisine (E234) produite par *Lactococcus lactis* est autorisée par certains pays dans le domaine alimentaire comme agent conservateur.

Dans ce cadre, l'équipe Sécurité Microbiologique des Aliments du LAMAABE s'intéresse aux bactéries lactiques locales productrices de bactériocines et ce travail de magister a consisté à poursuivre les recherches initiées au sein de l'équipe sur ce thème.

La présentation des résultats de ce travail sera précédée d'une synthèse bibliographique reprenant des connaissances actuelles sur les bactéries lactiques et les bactériocines. La seconde partie du manuscrit présente le matériel et les méthodes utilisés pour réaliser ce travail. Les résultats obtenus au cours de ce travail sont alors exposés et discutés dans la troisième partie. Une conclusion générale résumera les principaux acquis de ce travail avec ouvrira les perspectives envisagées pour la poursuite de cette thématique de recherche. À travers cette étude nous contribuons à :

- La réalisation d'une collection de souches isolées à partir de lait cru de vache et de brebis de la région de Tlemcen.
- L'étude de leurs caractéristiques phénotypiques (morphologique, physiologique, biochimiques) et technologiques.
- La recherche des bactéries lactiques productrices de bactériocines.
- L'étude de l'effet de bactériocines sur des bactéries néfastes.

# SYNTHE BIBLIOGRAPHIQUE

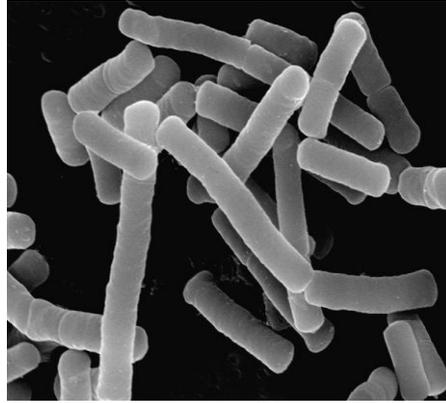
## I-les bactéries lactiques

### 1-Introduction

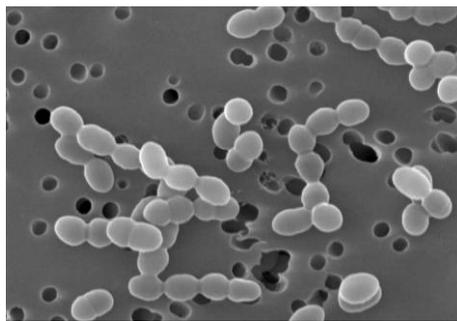
Bien avant que l'on soit conscient de leur existence, les bactéries lactiques, ont toujours été utilisées cependant, comme ferments elles ne sont utilisées que récemment dans la conservation des aliments à base de lait, de viande, de poissons, de légumes et de fruits (**Ross et al., 2002**). C'est à l'époque des grandes découvertes de la microbiologie, à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, que des chercheurs se sont penchés sur la fermentation du lait pour trouver la cause de sa coagulation acide. Conn (1889), Storch (1890) et Weigmann (1896) ont conclu que la présence de bactéries lactiques est responsable de l'acidification du lait et de la maturation de la crème (**De Roissart et Luquet., 1994**).

### 2-Définition des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme. Elles colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, la viande, les végétaux et les céréales et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale. Le groupe des bactéries lactiques, été défini pour la 1<sup>ère</sup> fois par Orla –Jensen en 1919, réunit plusieurs genres de différentes morphologies (Voir figures 1a et 1b) ayant pour caractère commun leur capacité à fermenter le lactose en produisant de l'acide lactique (**Novel., 1993**). Se sont des microorganismes à Gram positif, non sporulant, non mobiles, anaérobies mais aérotolestants et ne possédant pas de catalase. Toutes les bactéries lactiques possèdent un métabolisme fermentaire leur permettant, en utilisant des sucres fermentescibles, de produire principalement de l'acide lactique mais aussi d'autres acides organiques (acide acétique, acide formique.) (**Raynaud., 2006**).



**Figure1. 1a.** *Lactobacillus Rosell-11* observé au microscope électronique à transmission (M.E.T.) (x10000). ([http://www.institut\\_rossell-1\\_allemand.com/uploads/images/souches/lactobacillus\\_R52\\_big.jpg](http://www.institut_rossell-1_allemand.com/uploads/images/souches/lactobacillus_R52_big.jpg)).



**Figure 1. 1b.** *Leuconostoc lactis* observé au M.E.T. (x 10000). (<http://www.oocities.com/cheezyfr/photos/Leuconostoc.jpg>).

### 3-Habitat

Les bactéries lactiques ont pour habitat de nombreux milieux naturels, des végétaux (Plantes et fruits), des animaux et des humains (cavités buccales et vaginales, fèces et dans le lait). Mais certaines espèces semblent s'adapter à un environnement spécifique et ne sont guère trouvées ailleurs que dans leurs habitats naturels (**De Roissart., 1986**). Les espèces du genre *Lactococcus* sont isolées du lait ou des végétaux qui sont les réservoirs naturels de la plupart de ses espèces. L'espèce *Lactococcus lactis subsp. lactis* est isolée pour la première fois à partir du lait fermenté par Lister en 1873 et reconnue comme agent primaire de l'acidification du lait caillé). (**Bergey's manual., 2009**) Parmi les espèces du genre *Streptococcus*, *Streptococcus thermophilus* est isolée du lait pasteurisé, du matériel de laiterie et de levains artisanaux.

Les espèces du genre *Leuconostoc* sont isolées du lait, des produits laitiers, des fruits, des légumes (en particulier la betterave), des végétaux en fermentation (comme la choucroute), des produits de la panification et des solutions visqueuses de sucre dans les sucreries.

Les espèces du genre *Pediococcus* sont présentes surtout dans les végétaux en décomposition, parfois dans les boissons alcoolisées, le lait, les différents fromages (Parmesan et autres fromages italiens) et les préparations culinaires (Saucisses, anchois salés ou sauce de soja). (Bekhouché., 2006).

Les espèces du genre *Lactobacillus* sont présentes dans plusieurs milieux différents : dans le lait et les fromages (*Lb. casei subsp. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. curvatus* et *Lb. brevis*), dans les laits fermentés (*Lb. kefir*, *Lb. brevis* et *Lb. fermentum*), dans les produits végétaux fermentés, les marinades, l'ensilage, le vin et les viandes fraîches ou fermentées (*Lb. brevis*, *Lb. Curvatus*, *Lb. buchneri* et *Lb. san francisco*) (Demazeaud., 1996).

#### 4-Caractéristiques générales:

Les bactéries lactiques sont un groupe de bacilles ou coccobacilles à Gram positif qui ont moins de 55 mol % de contenu G+C dans leur ADN (à l'exception des bifidobactéries (Ammour., 2004). ce sont des procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes. A quelques exceptions près, les bactéries lactiques sont généralement Gram positif, immobiles, asporulées, anaérobies mais aérotolérantes, (voir tableau 1), et ne possédant pas de catalase (certaines souches possèdent une pseudocatalase), de nitrate réductase, et de cytochrome oxydase. Elles ont des exigences nutritionnelles nombreuses (acides aminés, peptides, sels, acides gras et glucides) (Holzapfel et al., 2001 ; Gevers., 2002) .Toutes les bactéries lactiques en utilisant les glucides, elles peuvent produire soit de :

- l'acide lactique exclusivement (bactéries homolactiques strictes),
- l'acide lactique et de l'acide acétique (bactéries hétérolactiques facultatives),
- l'acide lactique, de l'acide acétique ou de l'éthanol et de CO<sub>2</sub> (bactéries hétérolactiques strictes) (Vandamme et al., 1996).

Certaines espèces ou certaines souches peuvent en outre produire de l'acide formique ou de l'acide succinique (De Roissart et Luquet., 1994).

#### 5- Classification des bactéries lactiques :

Traditionnellement, les bactéries lactiques ont été classées sur la base des propriétés phénotypiques : la morphologie, le mode de fermentation du glucose, la croissance à différentes températures, l'isomère de l'acide lactique produit et la fermentation des différents hydrates de carbone (De Roissart et Luquet., 1994; Holzapfel et al., 2001). Cependant, les

études basées sur la comparaison des séquences de l'ARN ribosomal 16S ont montré que certains taxons générés sur la base de la caractérisation phénotypique ne concordent pas avec les relations phylogénétiques suggérées. Ainsi, certaines espèces ne sont pas faciles à distinguer par des caractéristiques phénotypiques (Gevers., 2002). Par conséquent, Les méthodes de typage moléculaire telles que l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE), la réaction de polymérisation en chaîne utilisant des éléments répétés (rep-PCR), ainsi que la méthode de (RFLP) sont extrêmement précieux pour la caractérisation et la détection des bactéries lactiques (Holzapfel et al., 2001).

**Tableau1 ; quelques caractéristiques des bactéries lactiques (d'après Axelsson, 2004)**

Caractéristiques	Bacilles				Coques			
	Camobacterium	Lactobacillus	Aerococcus	Enterococcus	Lactococcus Vagococcus	Leuconostoc Oenococcus	Pediococcus	Streptococcus
Formation des tétrades								
Production de gaz <sup>b</sup>	+ <sup>c</sup>	±	+	+	±	+	-	-
Croissance à 10°C	-	±	-	+			±	
Croissance à 45°C		±			-	-	±	±
Croissance dans 6.5% NaCL	ND <sup>d</sup>	±	-	-	-	±	±	-
Croissance dans 18% NaCL			-	+	-	-	±	-
Croissance à pH 4,4	ND	±	+	+	±	±		-
Croissance à pH 9,6					-	-	-	
Acide lactique	L	D,L,DL <sup>e</sup>	L	L	L	D	L,DL <sup>e</sup>	L

**Notes :**

+ : Positif ; - : négatif ; ± : réponse variable selon les espèces ; ND : non déterminé.

<sup>a</sup> *Weissella* peuvent être également sous forme de bacille.

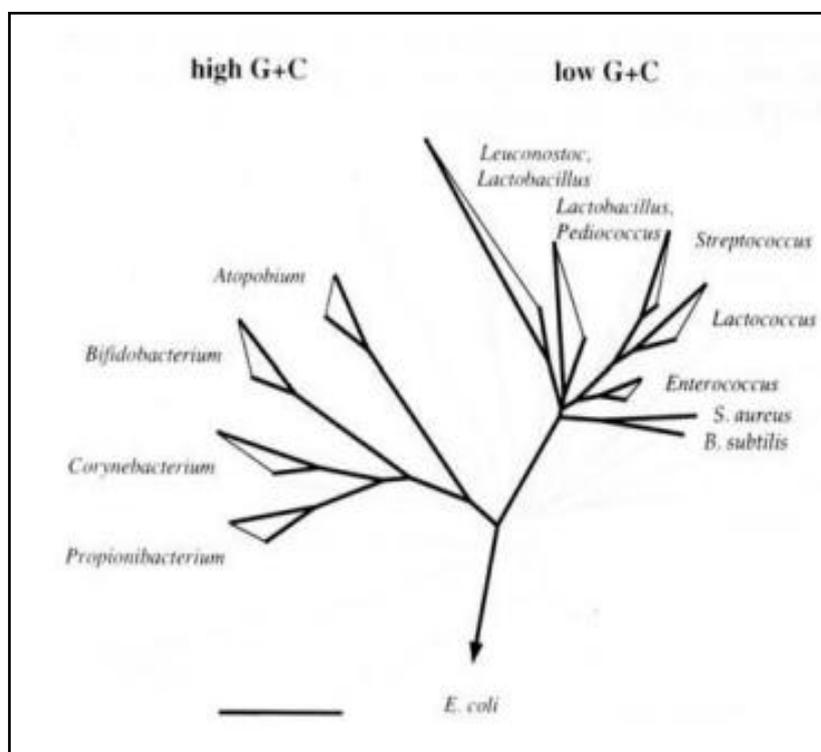
<sup>b</sup> Type de fermentation du glucose : homofermentaire (-) ou hétérofermentaire (+).

<sup>c</sup> Faible quantité de CO<sub>2</sub> produite selon le milieu.

<sup>d</sup> Peuvent ne pas se développer dans 8% NaCL.

<sup>e</sup> Production d'acide lactique D, L, ou DL acide variable selon les es

Sur la base des données de séquençage de 16S et 23S de l'ADNr, les bactéries Gram positif forment deux embranchements (**figure 2**). Un embranchement composé de bactéries Gram positif avec un pourcentage G + C inférieur à 50% (*Clostridium*) et un autre formé de bactéries ayant une teneur en G + C supérieure à 50% (Actinomycètes) (**Holzappel et al., 2001 ; Gevers., 2002**). Les bactéries lactiques typiques ont une teneur en G + C inférieure à 50% alors que le genre *Bifidobacterium* qui, d'un point de vue physiologique, fait partie des bactéries lactiques, appartient à la branche des Actinomycètes qui comprend aussi *Propionibacterium* et *Brevibacterium* (**Vandamme et al., 1996**). Il y a peu de corrélation entre la classification traditionnelle et la parenté phylogénétique des bactéries lactiques. Des genres morphologiquement distincts, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* sont phylogénétiquement entremêlés (**Schleifer et Ludwig., 1995 ; Gevers., 2002**).



**Figure 2:** Arbre phylogénétique des bactéries Gram positives basé sur la comparaison des séquences de l'ARNr 16S. La barre indique une divergence de séquence à 10%. (**Schleifer et Ludwig., 1995**)

Les bactéries lactiques sont définies comme des bactéries qui fermentent le glucose pour produire surtout l'acide lactique. Cependant cette définition couvre plus de taxa que ceux

désignés par bactéries lactiques. C'est surtout leur importance dans la fermentation des aliments et produits alimentaires (viandes, végétaux, fruits, poissons, produits laitiers et ensilage) qui les délimite (**Vandamme et al., 1996**).

Actuellement, les bactéries lactiques regroupent treize genres bactériens différents ; **Lactobacillus, Bifidobacterium, Leuconostoc, Lactococcus, Enterococcus, Streptococcus, Pediococcus, Carnobacterium, Oenococcus, Weissella, Aerococcus, Tetragenococcus, Vagococcus.** (**Carine et al., 2009**). Les principaux genres des bactéries lactiques décrits dans les paragraphes suivants sont classés dans le même phylum, classe et ordre :

Phylum BXIII : *Firmicutes*

Classe I : *Bacilli*

Ordre II : *Lactobacillales*

Seuls varient les familles et les genres qui seront précisés dans chaque partie

Le tableau 2 représente les différents genres de bactérie lactique.

**Tableau 2.** Quelques genres de bactéries lactiques (**Bekhouche., 2006**)

Genres	cellules		fermentation	ADN G+C(%)	Références
	forme	Arrangements			
<b>Streptococcus</b>	Coques	Chaines	Homolactiques	34-46	SCHLEIFER, 1986
<b>Leuconostoc</b>	Coques	Chaines	hétérolactiques	36-43	FARROW et al, 1989
<b>Pediococcus</b>	Coques	Tétrades	Homolactiques	34-42	SCHLEIFER, 1986
<b>Lactobacillus</b>	Bacilles	Chaines	Homolactiques et hétérolactiques	32-53	KANDLER et WEISS 1986

### 5-1. Les coques lactiques

Elles appartiennent à la famille des **Streptococcaceae**. Les cellules sont groupées en paires ou en chaînes et de longueurs variables. La différenciation des genres est basée sur l'arrangement des cellules et sur le type de fermentation lactique (homo ou hétérolactique).

Les coques lactiques ont des exigences nutritives parfois complexes. Certains ont des activités protéasiques et peptidasiques. Actuellement, ils regroupent les genres : *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella* (Stiles et Holzappel., 1997).

**Les genres *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus* :** Ils étaient anciennement groupés en un seul genre *Streptococcus*. Ils sont très fréquents dans l'industrie alimentaire comme contaminant et surtout comme agents de fermentation homolactique (avec production d'acide lactique de type dextrogyre). Ils sont très exigeants sur le plan nutritionnel et se développent bien à 37 °C. Parmi le genre *Streptococcus*, le groupe viridans comprend les agents d'acidification fréquents dans certains fromages et yaourts comme le cas de l'espèce *Sc. thermophilus*. Les *Enterococcus* composés de streptocoques fécaux (*Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*).

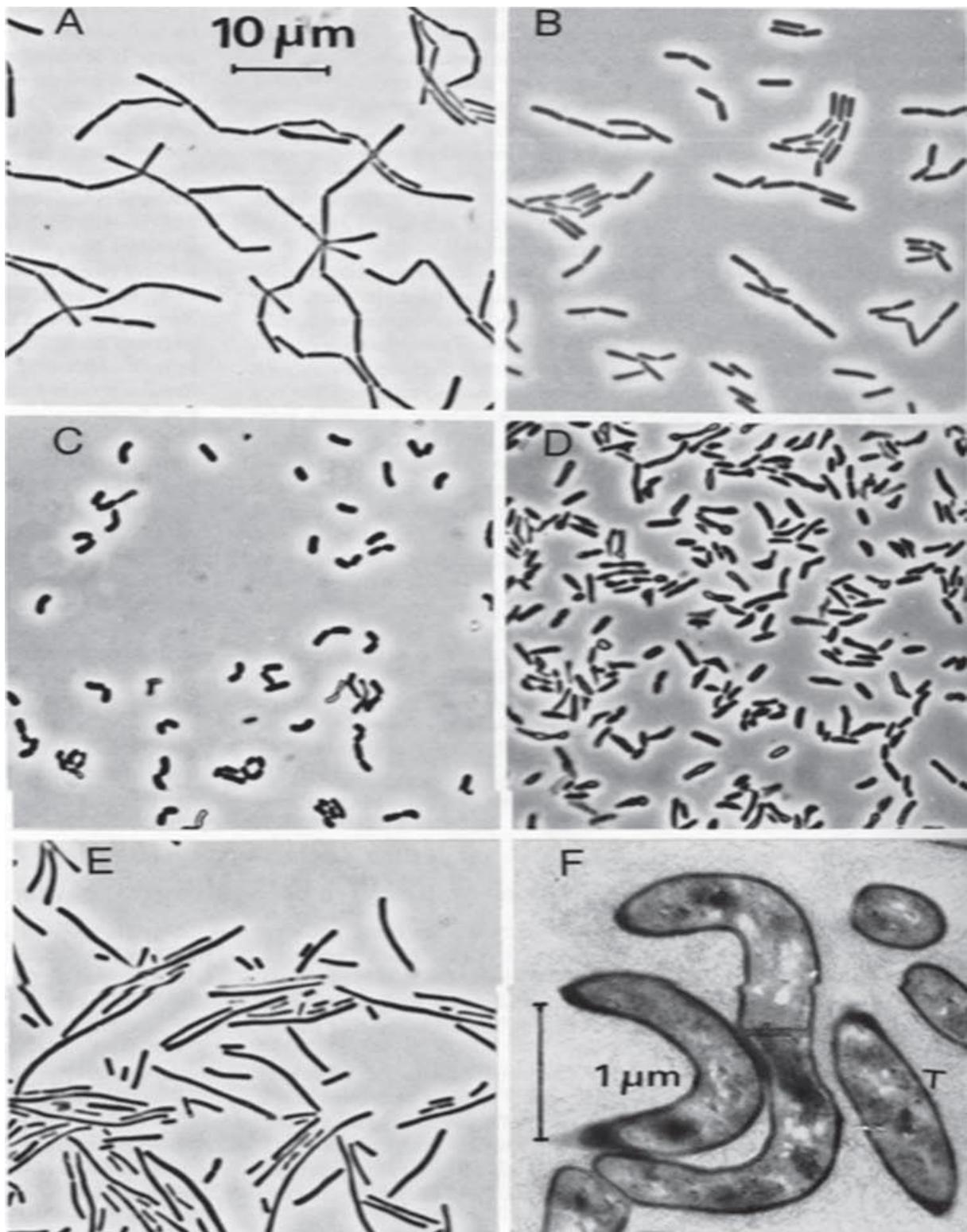
Selon GUIRAUD (1998), le genre *Lactococcus* est représenté par les espèces suivantes : *Lactococcus Lactis subsp. cremoris*, *Lc. Lactis subsp. Lactis* et *Lc. Lactis subsp diacetyllactis*. (Bekhouche., 2006).

**Le genre *Leuconostoc*** représente les coques hétérofermentaires. La classification des espèces basée sur le GC% a permis de distinguer trois espèces : *Leuconostoc mesenteroides* (et ses trois sous espèces : *subsp. Mesenteroides.*, *subsp. dextranicum* et *subsp. Cremoris*), *Ln. lactis*, *Ln. paramesenteroides* et *Ln. enos* (Leveau et Bouix., 1993).

**Le genre *Pediococcus*** 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. Ce genre est parfois utilisé comme levain lactique pour les charcuteries (Guiraud., 1998).

## **5-2. Les *Lactobacilles***

Ce genre regroupe plus de 70 espèces (dont plusieurs sont divisées en sous-espèces). Le genre *Lactobacillus* est quantitativement le plus important des genres du groupe des bactéries lactiques. Les souches de Lactobacilles sont constituées de bacilles long et fin (parfois incurvés) ou de coccobacilles dont la forme est proche à celle des corynébactéries. Voir (figure 3).



**Figure 3.** Phase contraste (A–E) et électron (F) micrographes montre les différent morphologies cellulaire de lactobacillus: A, *Lactobacillus gasseri*; B, *Lactobacillus agilis*; C, *Lactobacillus curvatus*; D, *Lactobacillus minor*; E, *Lactobacillus fermentum*; et F, involution de lactobacillus dans une section mince de grain du kéfir. (Bergey's manual., 2009)

Les cellules sont généralement immobiles (pour les souches mobiles, la ciliature est péritriche). La production d'acide lactique issue du métabolisme fermentaire représente au moins 50 % des produits de fermentation (Axelsson.,1993) . **Les Lactobacilles homofermentaires stricts** regroupent les espèces de l'ancien sous-genre *Thermobacterium*, qui dégrade les hexoses en acide lactique.

**Les Lactobacilles hétérofermentaires stricts** regroupent les espèces de l'ancien sous-genre *Bêtabacterium*, fermentent les hexoses en acide lactique, en acide acétique ou en éthanol et CO<sub>2</sub> (voie hétérofermentaire de la 6-phosphogluconate déshydrogénase/phosphocétolase). Ils dégradent les pentoses en acide acétique et en acide lactique (voie hétérofermentaire de la glycéraldéhyde-3- phosphate/pyruvate kinase/lactate déshydrogénase). Ces bactéries produisent du CO<sub>2</sub> lors de la fermentation du glucose et du gluconate.

**Les Lactobacilles hétérofermentaires facultatifs** regroupent les espèces de l'ancien sous genre *Streptobacterium*, métabolisent les hexoses en acide lactique par la voie homofermentaire d'Embden-Meyerhof-Parnas EMP et dégradent les pentoses par voie hétérofermentaire. Ils ne produisent pas de CO<sub>2</sub> lors de la fermentation du glucose mais ils en produisent lors de la Fermentation du gluconate (Stiles et Holzappel., 1997). L'établissement d'un arbre phylogénique construit à partir des séquences d'ARN 16S a démontré que les genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* sont très liés (malgré leurs caractères morphologiques et physiologiques très différentes) (Schleifer et Ludwig., 1995).

Selon Atlan (2000), ce critère physiologique a conduit à la classification des Lactobacilles en trois groupes qui diffèrent largement de celle déterminé précédemment par ORLA-JENSEN (1919).

**Le groupe *delbrueckii*** comprend les espèces : *Lactobacillus delbrueckii*, *Lb. helvetis*, *Lb. crispatus*, d'autres lactobacilles homofermentaires et les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs (*Lb. acetotolerans* et *Lb. hamsteri*).

**Le groupe *casei-Pediococcus*** est le groupe le plus large car il regroupe de très nombreux *Lactobacillus* homofermentaires stricts (*Lb. avarius*, *Lb. salivarius*), hétérofermentaires facultatifs (*Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. sake*, *Lb. curvatus*) et des hétérofermentaires stricts (*Lb. brevis*, *Lb. fermentum*, *Lb. buchneri*, *Lb. reuteri*, *Lb. sanfrancisco*, *Lb. parakefir*). Ce groupe contient aussi la plupart des souches de *Pediococcus* (*Pc. damnosus*, *Pc. parvulus*, *Pc. acidilactici*, *Pc. pentosaceus*).

**Le groupe *Leuconostoc*** comprend les Lactobacilles hétérofermentaires stricts et les espèces du genre *Leuconostoc* (*Ln. amelibiosum*, *Ln. carnosum*, *Ln. gelidum*) ainsi que le genre

*Weissella* dans lequel sont regroupés plusieurs Lactobacilles hétérofermentaires (*Lb. confusus*, *Lb. viridescence*, *Lb. halotolerans*) et *Ln. paramesenteroides*. La classification des lactobacilles selon ATLAN (2000) est donnée dans le tableau 3

**Tableau3** : la nouvelle classification des lactobacilles selon ATLAN (2000)

<b>Groupe1 : <i>Delbrueckii</i></b>	<b>Groupe2 : <i>casei-Pediococcus</i></b>	<b>Groupe3 : <i>Leuconostoc</i></b>
<i>Lb. delbrueckii</i>	Homofermentaires stricts	Hétérofermentaires stricts
<i>Lb. Acidophilus</i>	<i>Lb. Avarius</i>	Genre <i>Leuconostoc</i>
<i>Lb. helveticus</i>	<i>Lb. salivarius</i>	<i>Ln. amelibiosum</i>
<i>Lb. crispatus</i>	Hétérofermentaires facultatifs	<i>Ln. carnosum</i>
Autres Homofermentaires	<i>Lb. casei</i>	<i>Ln. gelidum</i>
Hétérofermentaires Facultatifs	<i>Lb. plantarum</i>	Genre <i>Weissella</i>
<i>Lb. Acetotolerans</i>	<i>Lb. sake</i>	<i>Ln. paramesen</i>
<i>Lb. hamster</i>	<i>Lb. curvatus</i>	<i>Lb. confusus</i>
	Hétérofermentaires stricts.	<i>Lb. halotolerans</i>
	<i>Lb. brevis</i>	<i>Lb. viridescens</i>
	<i>Lb. fermentum</i>	
	<i>Lb. buchneri</i>	
	<i>Lb. reuteri</i>	
	<i>Lb. sanfrancisco</i>	
	<i>Lb. parakefir</i>	
	Genres <i>Pediococcus</i>	
	<i>Pc. damnosus</i>	
	<i>Pc. parvulus</i>	
	<i>Pc. acidilactici</i>	
	<i>Pc. Pantosaceus</i>	

En synthèse à ce chapitre, les principales caractéristiques des bactéries lactiques sont résumées sur le tableau 4

**Tableau 4 : Principales caractéristiques des bactéries lactiques (Makhloufi, 2012)**

Bactérie lactique	Propriétés cellulaires		Propriétés biochimiques			Informations génétiques		Référence
	Aspect	Habitat	T° optimale (°C)	CO <sub>2</sub>	Configuration acide lactique	% GC	Taille génome (Mpb)	
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC 15703	bacille	intestin	37	-	D, L, (D+L)	59	2,1	(Suzuki <i>et al.</i> , 2006)
<i>Bifidobacterium longum</i> DJO10A	bacille	intestin, tractus génital	37-41	-	D, L, (D+L)	60	2,3	(Lee <i>et al.</i> , 2008)
<i>Carnobacterium</i> sp. AT7	bacille chaîne	viande, poisson	25-43	-	L	35	2,4	(Bartlett <i>et al.</i> , 2007)
<i>Enterococcus faecalis</i> AR01/DG	coque isolé	intestin	37	-	L	37	2,8	(Feldgarden <i>et al.</i> , 2009)
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334	bacille chaîne	lait, tractus gastrointestinal et vaginal	25-42	+/-	D, L, (D+L)	46	2,9	(Makarova <i>et al.</i> , 2006)
<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	bacille	lait, tractus gastrointestinal et vaginal	25-41	+/-	D, L, (D+L)	51	2,1	(Morita <i>et al.</i> , 2008)
<i>Lactobacillus helveticus</i> DPCe 4571	bacille	fromage	25-36	+/-	D, L, (D+L)	37	2,1	(Callanan <i>et al.</i> , 2008)
<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	bacille isolé	plantes, tractus gastrointestinal	25-35	+/-	D, L, (D+L)	44	3,3	(Kleerebezem <i>et al.</i> , 2003)
<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 20016	bacille chaîne	lait, tractus gastrointestinal et vaginal	25-37	+/-	D, L, (D+L)	38	2	(Copeland <i>et al.</i> , 2007)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	bacille	lait, tractus gastrointestinal et vaginal	25-38	+/-	D, L, (D+L)	46	3	(Kankainen <i>et al.</i> , 2009)
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> 23K	bacille	lait, tractus gastrointestinal et vaginal	25-39	+/-	D, L, (D+L)	41	1,9	(Chaillou <i>et al.</i> , 2005)
<i>Lactobacillus salivarius</i> UCC118	bacille	lait, tractus gastrointestinal et vaginal	25-40	+/-	D, L, (D+L)	32	1,8	(Claesson <i>et al.</i> , 2006)
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> SK11	coque, chaîne, paire	lait, fromage, yaourt	40	-	L	35	2,4	(Makarova <i>et al.</i> , 2006)
<i>Leuconostoc citreum</i> KM20	coque isolé	viande, plante	20-30	+	D	38	1,8	(Kim <i>et al.</i> , 2008)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ATCC 8293	coque isolé, chaîne, paire	viande, plante	40	+	D	37	2	(Makarova <i>et al.</i> , 2006)
<i>Oenococcus oeni</i> PSU-1	coque isolé, chaîne	vin	17-25	+	D	37	1,8	(Makarova <i>et al.</i> , 2006)
<i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC 25745	tétrade*	viande, plante, fromage	30	-	D, L	37	1,8	(Makarova <i>et al.</i> , 2006)
<i>Streptococcus agalactiae</i> A909	coque isolé	peau	37	-	L	35	2,1	(Tettelin <i>et al.</i> , 2005)
<i>Weissella paramesenteroides</i> ATCC 33313	coque isolé	plante	30	+	D, (D+L)	37	1,9	(Qin <i>et al.</i> , 2009)

+ : Production de dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) / - : Absence de production de CO<sub>2</sub>.

D : L'isomère optique formé de l'acide lactique est de configuration D ; L : L'isomère optique formé de l'acide lactique est de configuration L ; D+L : L'acide lactique est sous forme racémique.

\* : Une tétrade est formée lorsque quatre bactéries sont associées entre elles.

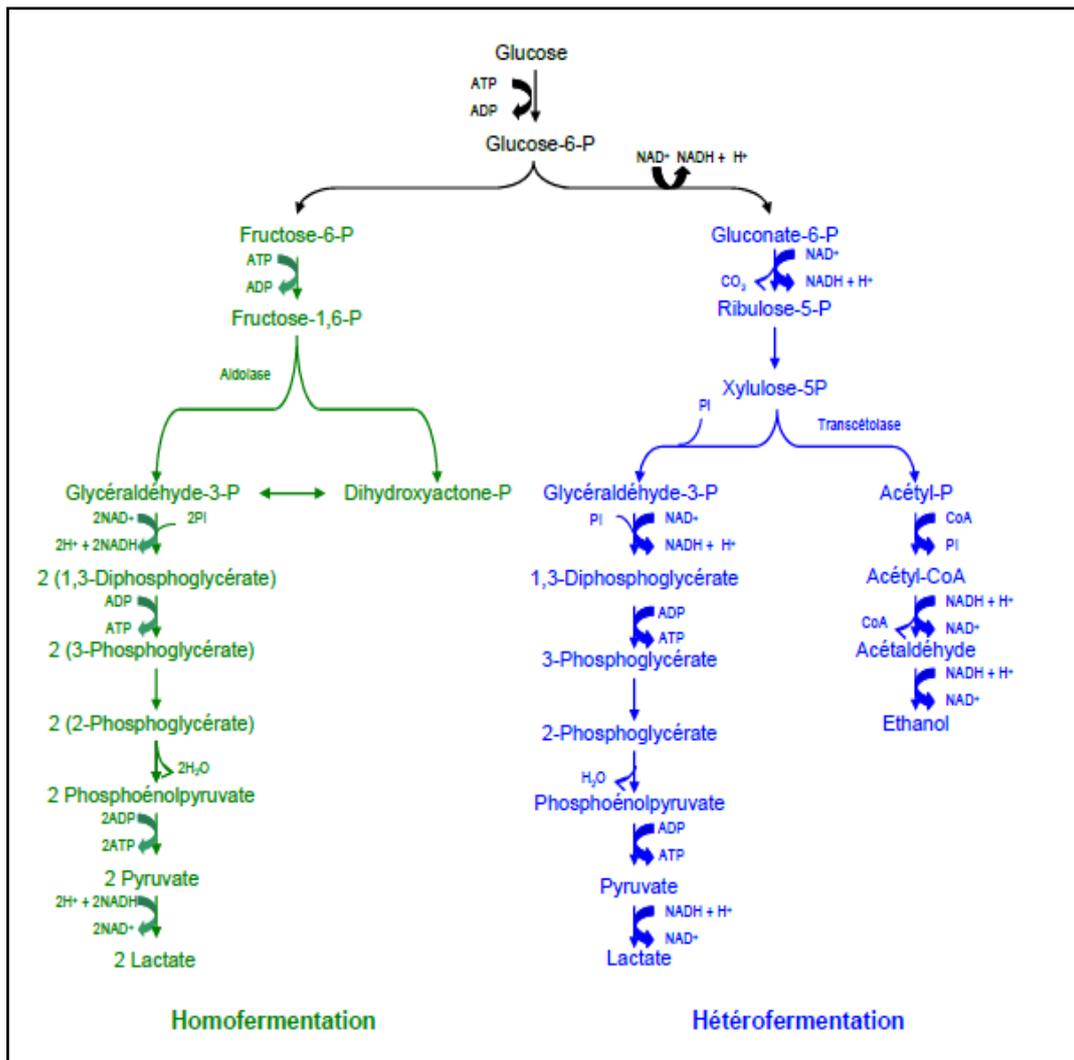
## **6- Les voies fermentaires des bactéries lactiques**

### **6-1 Définition :**

La fermentation est un processus produisant de l'énergie par oxydation de composés organiques, principalement des glucides, où un donneur d'électron, NADH cède ses électrons à un accepteur endogène, le pyruvate. Dans la respiration les électrons sont donnés à un accepteur exogène, l'oxygène pour la respiration aérobie et le nitrate ou le sulfate pour la respiration anaérobie. (Prescott *et al.*, 2003)

### **6- 2. Voies fermentaires générales du métabolisme carboné**

Les bactéries lactiques utilisent principalement l'une des deux voies majeures du métabolisme des sucres (**Fig 4**). Il s'agit des voies homofermentaires (Embden-Meyerhoff- Parnas, EMP) et hétérofermentaire (voie des pentoses-phosphate). Ainsi, les bactéries lactiques sont divisées en deux groupes principaux d'espèces homo ou hétérofermentaires selon la nature et la concentration des produits terminaux issus de la fermentation du glucose.



a

b

**Figure 4 :** Représentation schématique des principales voies de fermentation des hexoses chez les bactéries lactiques.

ATP : adénosine triphosphate.

ADP : adénosine diphosphate.

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

Pi : phosphate inorganique. (Makhloufi., 2012).

### 6.2.1. Voie homofermentaire

Les bactéries lactiques homofermentaires comprennent les espèces de lactocoques, pédiocoques, ainsi que certains lactobacilles. Cette voie conduit dans des conditions optimales de croissance à la production de deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP par molécule de glucose consommée (Thompson et Gentry-Weeks., 1994). Des sucres autres que le glucose peuvent également être fermentés via cette voie : monosaccharides, disaccharides, hexitols. Ces micro-organismes présentent un métabolisme de type homolactique lorsque le lactate représente plus de 90 % des produits de fermentation. Dans

certaines conditions de croissance (certains sucres, limitation carbone.), le métabolisme de ces bactéries se diversifie vers un métabolisme mixte avec production en plus du lactate, de formiate, de CO<sub>2</sub>, d'acétate et d'éthanol (**Cocaign-Bousquet et al., 1996**).

La fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBA), est une enzyme clé présente chez toutes les espèces homofermentaires et indispensable au fonctionnement de la voie EMP. Cette enzyme catalyse la réaction menant à partir du fructose-1,6-bisphosphate (FBP) à deux molécules à 3 carbones, le dihydroxyacétone-phosphate (DHAP) et le glycéraldéhyde-3-phosphate (GAP).

### **6.2.2. Voie hétérofermentaire**

Les bactéries lactiques qui fermentent le glucose en produisant, en plus de l'acide lactique (moins de 1,8 moles par mole de glucose), de l'acétate, de l'éthanol et du CO<sub>2</sub> sont dites hétérofermentaires (**Thompson et Gentry-Weeks., 1994**). Les groupes principaux de bactéries présentant ce type de métabolisme sont les leuconostocs et certains lactobacilles.

Ces microorganismes sont dépourvus d'une FBA, d'une triose-phosphate isomérase (TPI) ainsi que d'un système PTS fonctionnel. Dans ces conditions, le glucose est accumulé par l'intermédiaire d'un transport actif puis subit une phosphorylation intracellulaire par le biais d'une glucokinase (GLK) ATP-dépendante. Le glucose-6-phosphate emprunte ensuite la partie oxydative de la voie des pentoses-phosphate qui conduit à la formation de xylulose-5-phosphate. Le xylulose-5-phosphate est scindé en acétyl-phosphate et glycéraldéhyde-3-phosphate par la D-xylulose-5-phosphate phosphocétolase, enzyme spécifique à la voie hétérofermentaire. Enfin, l'acétyl-phosphate est converti en éthanol ou en acétate, et le GAP qui rejoint la glycolyse est métabolisé en acide lactique. Le métabolisme hétérofermentaire est deux fois moins énergétique que le métabolisme homofermentaire puisqu'une mole de glucose conduit à la production d'une mole de lactate, d'éthanol, de CO<sub>2</sub> et d'un seul ATP.

## **7- rôle et intérêt des bactéries lactiques**

### **7-1domaine alimentaire :**

#### **7-1-1 rôle sur la structure et la texture :**

Se sont les laits fermentés, l'acidification provoque la formation d'un caillé +ou- ferme selon les bactéries lactiques présentes. Selon les produits, la texture recherchées est ferme (yaourt ferme) ou onctueuse (yaourt brassé ; kéfir). Pour obtenir une consistance déterminée ;

l'utilisation des souches plus ou moins acidifiantes peut être couplée à celle des souches productrices de polysaccharides. (**Satura et Federighi., 1998**).

### **7-1-2 rôle dans la conservation :**

**\*production d'acide lactique :** les bactéries lactiques ont un rôle important dans l'inhibition des flores non lactiques.

**\*production de bactériocine :** ces peptides antimicrobiens sont synthétisés par un très grand nombre de souches de bactéries lactique, ils sont généralement thermorésistants.

**7-1-3 rôle sur les caractéristiques organoleptiques :** par production en dehors de l'acide lactique, d'autres produits tels que le diacétyl et l'acétaldéhyde, qui sont responsables des saveurs caractéristiques. (**Boudjemaa., 2008**).

### **7-2 Domaine de santé :**

L'intérêt des bactéries lactiques en matière de santé humaine a été initialement proposé au début du siècle, en 1907 par le Russe Metchnikoff, selon lui les *Lactobacillus sp* pouvaient réduire la putréfaction intestinale en modifiant la flore intestinale. Le rôle des bactéries lactiques sur la santé était dans le cadre des probiotiques. Les bienfaits des bactéries lactiques sont de plus en plus étudiés, certains sont bien établis d'autres restent encore à confirmer :

\*Améliore la digestion de lactose.

\*Le traitement de certaines infections ou diarrhées.

\*Diminution du cholestérol sérique et dé-conjugaison des sels biliaires.

\*Utilisation dans l'élaboration des vaccins (**Calvez et al., 2009**).

### **7-3 Les bactéries lactiques comme probiotiques:**

#### **7- 3-1 Définitions :**

Les probiotiques sont définis comme des micro-organismes vivants qui lorsqu'ils sont ingérés en quantité appropriée 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**).

### 7-3-2 Rôle du probiotique

\*Ils participent à l'activation de l'immunité et à la réduction d'allergies chez les sujets à risque.

\*La résistance à l'acide gastrique et à la bile, permet aux probiotiques de survivre dans le tube digestif où réside une partie de l'immunité

\*Les probiotiques participent au développement du système immunitaire chez le nourrisson et l'améliorent chez la personne âgée en augmentant le nombre de phagocytes et de lymphocytes Natural killer, premières défense contre un agent exogène.

\*Ils agissent également sur l'immunité en colonisant le tractus intestinal, réalisant ainsi « un effet barrière » empêche d'une part la colonisation de l'épithélium par des pathogènes et renforce d'autre part l'immunité au niveau des muqueuses intestinales en augmentant la production d'IgA et de mucus, défenses locales au niveau des muqueuses. (Makhloufi., 2012).

### 6-3-3 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*.

- **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) .

- **Traitements gastriques**

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* (*H. pylori*), une bactérie impliquée dans la survenue et les récurrences des gastrites et ulcères gastro-duodénaux. 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.

### **8- les caractères bioindustrielles des bactéries lactiques :**

Les bactéries lactiques sont la base de la fabrication des différents produits alimentaires tels que les produits laitiers (yaourt, fromage, ...), les produits carnés, et les produits végétaux, aussi elles procurent une meilleure conservation pour ces denrées alimentaire. Ainsi elles sont dotées de plusieurs pouvoirs.

## II- les bactériocines

### Introduction

Compte tenu de la chute de l'efficacité des antibiotiques classiques en raison d'une propagation et l'augmentation des mécanismes de résistance antibactérien, des peptides sont de plus en plus d'intérêt que les antibiotiques potentiels. Un bon nombre de ces peptides montrent une activité impressionnante contre les bactéries qui sont résistantes aux antibiotiques classiques. Plusieurs bactéries lactiques sont connues comme productrices des bactériocines qui sont des substances antimicrobiennes de nature peptidiques. (**Diepet Nes, 2002**). Un large éventail d'activités bactéricides a été décrit pour les bactériocines allant de la modulation des activités enzymatiques, l'inhibition de prolongement des spores, l'activité transporteur d'anions à la formation de pores sélective ou non sélective. Ces peptides peuvent avoir un spectre de cibles large ou étroite. Dans ce dernier cas, leur activité est souvent présumée être associée avec une molécule récepteur-like à la surface de la cellule cible.

### 1-Définition

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

La plupart des bactériocines sont de petites molécules, stable à la chaleur, cationique, amphiphile et perméables. Ils ont un spectre d'activité limité contre les espèces de même genre mais dans certain cas, l'effet inhibiteur inclue les bactéries altérantes et pathogènes de l'aliment. (**Field et al., 2007**). Les bactériocines produit par les bactéries lactiques ont un grand intérêt dans ces dernières années grâce à leur potentiel d'application dans les industries alimentaires comme préservatives naturel qui se produit directement dans la culture alimentaire.

### 2- Classification :

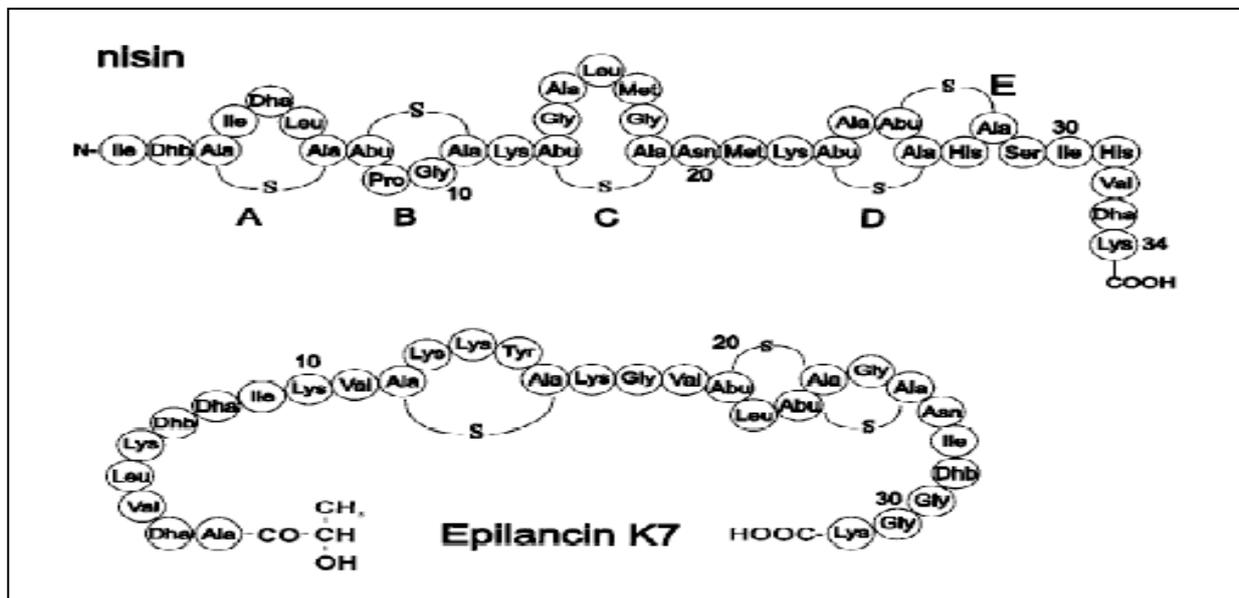
Plusieurs classifications ont été proposées. La première en **1993 par klaenhammer** divise les bactériocines en quatre classes, puis cette classification est modifiée par **Nes et al en 1996**. En **2005 Cotter et al** ont proposé une autre classification de cinq classes de

bactériocine, mais l'avance de la recherche a permis d'affiner cette classification la menant actuellement à trois classes de bactériocines (Calvez et al., 2009)

### 2-1 Classe I Lantibiotiques :

Possèdent une masse moléculaire comprise entre 1.8KDa et 4.1KDa et contiennent des acides aminés particuliers obtenus par modification post-traductionnelle (Van Der Meer et al., 1993), qui sont la lanthionine, la  $\beta$ -méthyl-lanthionine, la déhydrobutyryne et la déhydroalanine (Carine et al., 2009). La classe des lantibiotique est divisée en six groupes en fonction de leur homologie de séquence, on trouve les quartes groupes décrit, par Towmey et al (groupe nisine, lacticine 481, lactocine S et celui des lantibiotiques à deux composants) (Towmey et al., 2002).

**Groupe nisine :** Des lantibiotiques de type linéaires ; cationique structurées en hélice  $\alpha$  amphiphiles et de masse moléculaire comprise entre 2,1 et 3,5 KDa.



**Figure 5:** représentation schématique de deux lantibiotiques la Nisine A et Epilancine K7 (Moll et al.,1999)

### Groupe lacticine 481 :

Ont une masse moléculaire comprise entre 2,3 et 3,5 KDa et présentent une structure linéaire en position N-terminale et globulaire dans la partie C-terminal.

### Groupe Mersacidine :

Ces lantibiotiques ont une masse moléculaire comprise entre 1,8 et 2,0 KDa et possèdent une forme globulaire (Towmey et al., 2002).

### **Groupe cinnamycine :**

Ce groupe comprend des lantibiotiques ayant une masse moléculaire comprise entre 1,9 et 2,0 KDa et sont sécrétés par des bactéries appartenant au genre *Streptomyces*.

### **Groupe lactocine :**

Un lantibiotique de 37 A.A avec une masse moléculaire de 3,7 KDa, produit par *Lb.sakei* (Mortvedt et al.,1995). La lactocine S présente structure linéaire avec deux anneaux localisés en position C-terminal.

### **Groupe à deux composants :**

Ce groupe correspond aux lantibiotiques possédant deux composés peptidiques. La masse moléculaire de ces peptides est comprise entre 2,6 et 4,2 KDa. Les deux peptides ont un effet synergique sur les cellules cibles. (Quadri et al.,1994)

## **2-2 Bactériocine de classe II :**

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

### **Sous classe IIa :**

Sont des peptides composés de 36 à 48 acides aminés (Drider et al., 2009). Ont une partie N-terminal hydrophobe contenant la séquence consensus YGNGV ainsi qu'un pont disulfure et une partie C-terminale moins conservée, hydrophobe ou amphiphile qui détermine la spécificité d'action (Fimland et al., 2000 ; Richard et al., 2006). Les bactériocines de classe IIa sont actives contre les bactéries des genres *Listeria*, *Enterococcus*, *Lactococcus* (Calvez et al., 2009).

### **Sous classe II b :**

La sous classe II b représente les bactériocines à deux composants peptidiques qui y a un nombre d'acides aminés compris entre 30 et 40. Ces peptides, sont cationiques et portent des régions amphiphiles et ou hydrophobes (Calvez et al., 2009).les deux types de bactériocines, type E (Enhancing) ou la fonction de l'un des deux peptides est d'augmenter l'activité de l'autre et le type S (Sunergy) ou les peptides sont complémentaires (Carine et al., 2009).

### **Sous classe IIc :**

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

### 2-3 bactériocines de classe III :

Ont une masse moléculaire supérieure à 10KDa et sont thermosensibles. (Calvez .2009) la structure et le mode d'action de ces bactériocines diffèrent complètement des autres bactériocines produites par les bactéries lactiques. Cette classe ne contient que quatre bactériocines (Nigutova et al., 2007) voir tableau 5

Tableau 5 : les quartes bactériocines de la classe III (Moll et al.,1999)

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

### 3-Mode d'action :

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

### 3-1 les lantibiotiques :

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

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

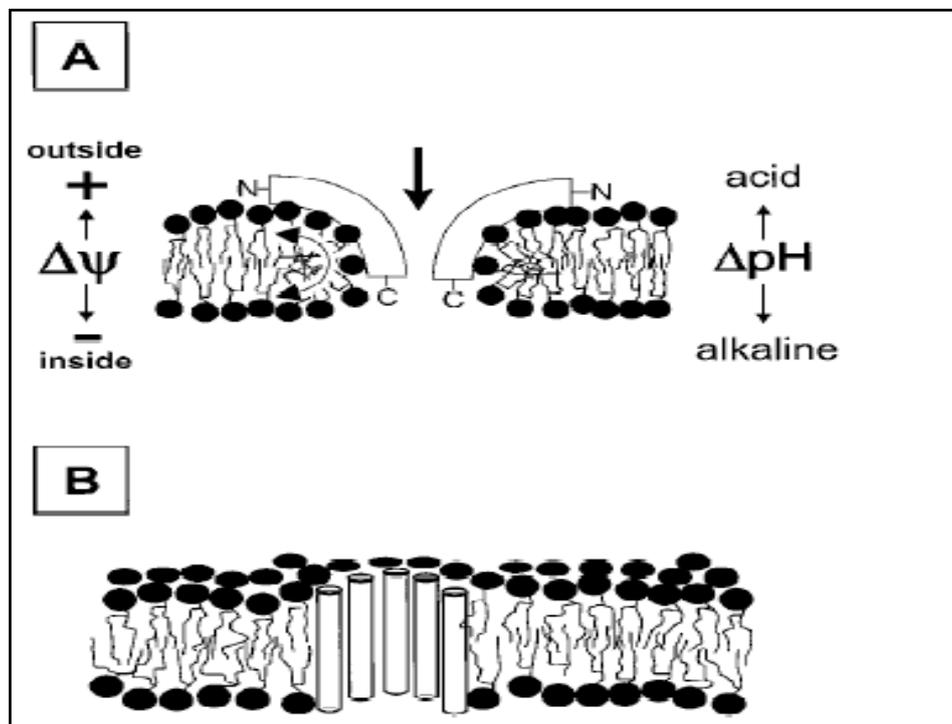
### **3-2 la classe II**

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

**Sous classe IIb :** elles forment des pores et rendent la membrane perméable à différentes petites molécules des cations monovalents ou des anions, ce qui dissipe une ou les deux composantes de la force proton motrice (Oppegard et al., 2007).

**Sous classe IIc :** les études portant sur le mode d'action de ces bactériocines montrent qu'il existe plusieurs modes d'action en fonction de la bactériocine. Par exemple la lactococine A provoque une dissipation du potentiel de membrane et la sortie d'acides aminées dans le milieu extracellulaire (Calvez et al., 2009).

**Formation des pores :** Différents modèles de formation des pores ont été proposés au cours des années. Pour la lantibiotique nisine, la formation de pore se produit à travers une série des étapes distinctes. Le modèle coin-interstitielle (wedge-like) de la nisine induite la formation des pores (**Driessen et al., 1995**) peuvent impliquée une force proton motrice motif conduit à une Co-insertion des lipides et des domaines nisine (Figure 6A). La charnière (s) dans la molécule de nisine peut permettre la flexion de la partie C-terminale et donc son insertion dans la membrane. Multiples molécules de la nisine inséré peut donner lieu à une perturbation locale importante de l'organisation de la bicouche lipidique entraînant la formation de pore lipide-protéine transitoires. Ces structures sont intrinsèquement instables en raison des forces hydrophobes qui conduiront le réarrangement des lipides dans leur organisation originale. Lors de l'insertion membranaire, les bactériocines de classe II On pense qu'il ya formation d'un faisceau de peptides  $\alpha$ -hélice beaucoup plus proche d'un tonneau de bois debout (barrel-stave) (figure 6B). (**Moll et al., 1999**)



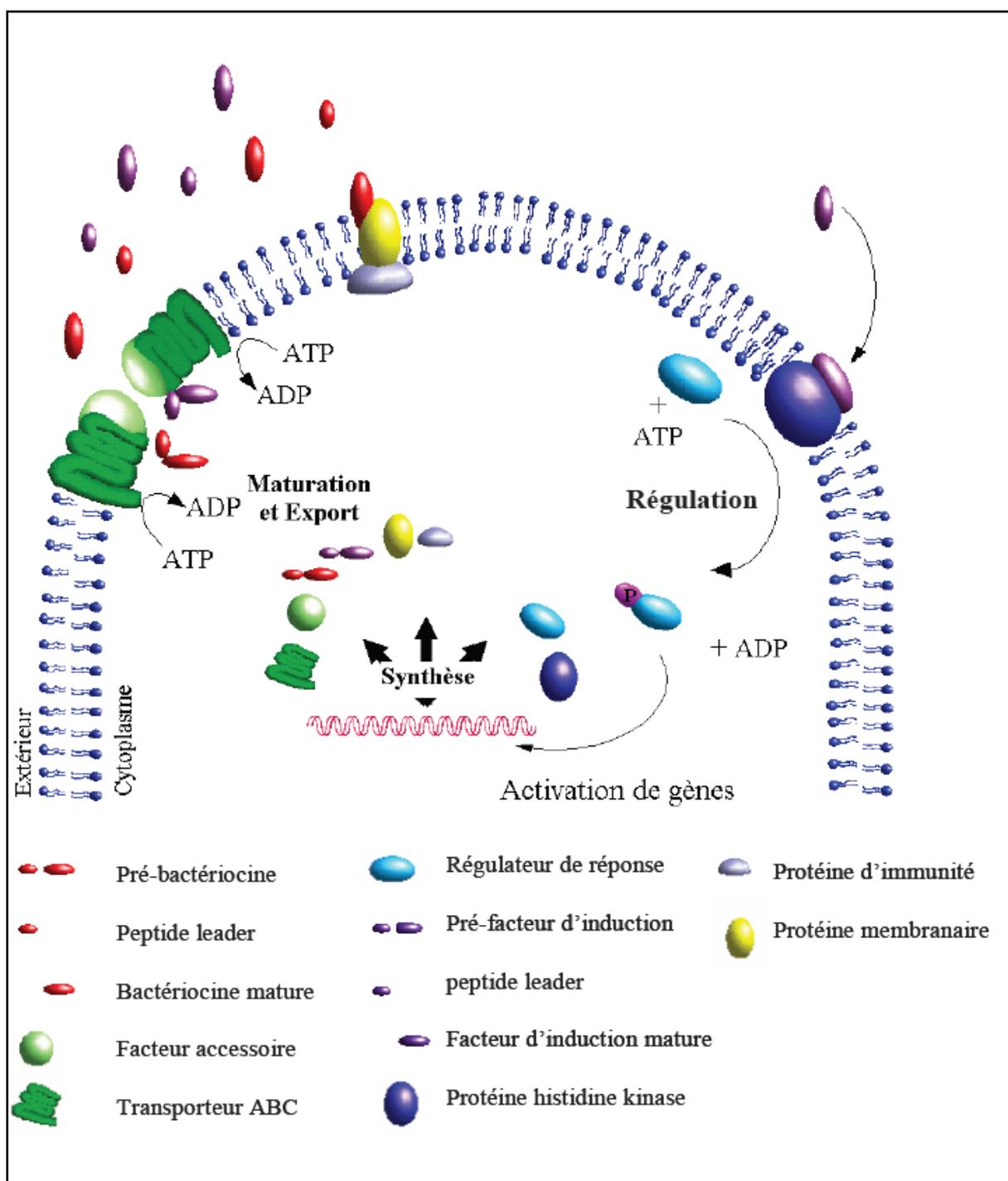
**Figure 6:** Les modèles de formation de pores. (A): pores en forme de coin. (B): pore en forme de tonneau en bois debout). (**Moll et al., 1999**)

#### **4-Synthèse et sécrétion :**

**4-1 les lantibiotiques :** les bactériocines sont généralement produites à la fin de phase exponentielle et au début de la phase stationnaire de croissance (**Carine et al., 2009**). on remarque que les gènes responsables de la production des bactériocines sont fréquemment associés avec des éléments mobilisables, sur le chromosome en association avec les transposons ou sur les plasmides. c'est le cas de la plupart des bactériocines lantibiotiques qui sont synthétisées initialement avec un peptide leader N-terminal (**Deegan et al., 2006**). ce précurseur subit des modifications post traductionnelles, les Ser (serine) et Thr (thréonine) sont déshydratées et réagissent avec une Cys (cystéine) aboutissant à la formation d'un pont thioéther et donnent respectivement les acides aminés spécifiques, lanthionine (Lan) et méthyllanthionine (Melan) (**Calvez et al., 2009**).

Pour le groupe 1 : les modifications sont assurées par Lan B qui permet la déshydratation des résidus Thr et Ser, alors que l'enzyme Lan C est requise pour la formation de Lan (**Calvez et al., 2009 ; Mc Auliffe et al. 2001**) la sécrétion de la bactériocine mature ou du prépeptide est assurée par le transporteur ABC caractérisé par deux domaines membranaires associés et une ATPase ayant un domaine de fixation de l'ATP très conservé. L'hydrolyse de l'ATP en C terminal de ces deux domaines membranaires fournit l'énergie nécessaire à l'exportation du lantibiotique. par contre lacticine 481 lantibiotique de groupe 2 ou un seul enzyme, Lan M qui assure les actions. Dans un cas spécial des lantibiotiques à deux composants (ex lacticin3147) deux enzymes Lan M peuvent être requises, l'un pour chaque peptide (**Mc Auliffe., 2001**).

**4-2 les bactériocines de classe II :** sont synthétisées sous forme de précurseur inactif ou à activité plus faible que la bactériocine, portant un peptide leader en position N-terminale comme vu chez les lantibiotiques. La séquence N-terminale très conservée, appelée séquence signal et contenant une vingtaine d'acides aminés sera clivée du côté C-terminale d'un motif GG par le domaine protéasique de l'ABC transporteur lors de l'excrétion pour donner le peptide biologiquement actif (**Ennahar et al., 2000 ; Ruch et al., 2007**). Certaines bactériocines de classe II sont excrétées par le (sec-dependent pathways) revu par Keyser et al 2003 et basée sur la translocation du peptide par un pore aqueux composé de plusieurs protéines (**Van Wely et al., 2001 ; Ruch et al., 2007**).



**Figure 7:** Les mécanismes cellulaires de production des bactériocines de classe II ( Ennahar et al., 2000).

## **5-Immunité :**

À l'évidence, les producteurs des bactériocines doivent se protéger contre l'action de leurs bactériocines. Il s'agit accompli par la production de l'immunité dédié protéines. Deux types d'immunité ont été décrits pour lantibiotiques, on dépend d'une protéine immunité spécifique, Lan I, tandis que l'autre dépend de son propre système multi-composant des transporteurs ABC (LanEFG). Certains groupe de lantibiotique n'ont que la protéine d'immunité unique, comme c'est le cas pour Pep5, tandis que d'autres, telles que la nisine, possèdent à la fois les deux mécanismes. On pense que la protéine Lan I antagonise l'action de lantibiotique, en quelque sorte empêcher l'insertion de lantibiotique dans la membrane cellulaire, tandis qu'il a été suggéré que le transporteur ABC travaille en expulsant le peptide antimicrobien de la cellule ou la membrane. (Deegan et al., 2006). Classe II des bactériocines généralement ont une protéine unicellulaire d'immunité associée à la membrane qui offre une immunité totale (Quadri et al., 1994). Basé sur l'étude de Carnobacteriocine B2 (Classe IIa), il semble que la majorité de la protéine d'immunité est situé à l'intérieur du cytoplasme et qu'il peut interagir avec une autre protéine, un récepteur peut-être, à la face cytoplasmique de la membrane cellulaire. (Deegan et al., 2006).

## **6- les applications des bactériocines dans l'industrie alimentaire :**

### **6-1 les propriétés des bactériocines pour une application alimentaire :**

Les bactériocines sont habituellement reconnues comme sûres, sont sensibles aux protéases digestives et ne sont pas toxiques pour les cellules eucaryotes (Wijaya et al., 2006). Elles ont une grande tolérance aux variations de pH et aux traitements thermiques. Leur spectre antimicrobien peut être large ou étroit, elles peuvent donc cibler sélectivement des bactéries pathogènes ou altérantes sans inhiber les bactéries indispensables et ont un mode d'action bactéricide. Les bactériocines doivent cependant être considérées comme un moyen de préservation complémentaire à ceux déjà existant (Deegan et al., 2006).

### **6-2 les applications des bactériocines dans le secteur alimentaire:**

Les bactériocines purifiées ou semi-purifiées sont appliquées après production en fermenteur, purification ou semi-purification et conditionnement par les techniques adéquates, qui peuvent être relativement coûteuses.

D'un point de vue législatif, une telle préparation est considérée comme un additif alimentaire. Jusqu'à présent, seule la nisine, un lantibiotique, est acceptée comme additif alimentaire (E234) (**Guinane et al., 2005**).

Les bactériocines peuvent également être appliquées sous la forme d'un concentré obtenu après fermentation par la souche productrice et atomisation d'un substrat alimentaire tel que le lait, par exemple. Cette préparation sera considérée comme un ingrédient fermenté. Elle contiendra la bactériocine mais également d'autres métabolites microbiens tels que l'acide lactique. La pédiocine, une bactériocine de classe IIa, est commercialisée sous cette forme sous le nom ALTA 2341. Des essais ont été récemment fait avec la lacticine 3147, un lantibiotique (**Deegan et al., 2006 ; Galvez et al., 2007**). Au niveau législatif, cette forme ne nécessite pas d'approbation. Cependant, si la culture n'est pas traditionnellement consommée, il faudra se référer à la législation sur les « *novel food* » (**EC258/97**).

## **7. Limites d'utilisation des bactériocines**

L'application des bactériocines constitue certes une méthode « naturelle » de conservation des aliments, mais sa mise en œuvre n'est pas aisée. En effet, les nombreuses propriétés des bactériocines favorisant leur utilisation dans le domaine agroalimentaire et/ ou médical n'empêchent pas l'existence de contraintes relatives à leur utilisation. Le coût élevé de préparations de bactériocines pures prêtes à l'emploi entraîne de loin la limite la plus importante. D'où l'utilisation plus commune des souches productrices plutôt que des bactériocines isolées.

La composition de l'aliment représente le premiers facteur pouvant réduire ou totalement dissiper l'activité inhibitrice de la bactériocine en raison de son adsorption sur des composants du produit, la limitation de sa solubilité et de sa diffusion, sa dégradation par des protéases, l'interaction avec des additifs alimentaires ou des ingrédients et/ ou un pH inapproprié.

Les traitements appliqués aux produits constituent un deuxième facteur pouvant limiter l'effet antimicrobien de la bactériocine dans un produit alimentaire. En effet, des traitements thermiques trop élevés peuvent dégrader les bactériocines bien que la majorité d'entre elles soient résistantes à la chaleur (**Carine et al., 2009 ; Gálvez et al., 2007**).

Le dernier facteur limitant l'activité des bactériocines est la présence de bactéries résistantes et de microorganismes qui dégradent les bactériocines par l'effet de protéases qu'elles produisent à l'état physiologique. De plus, dans les produits solides, les bactéries forment des

biofilms dont la résistance aux bactériocines peut être plus élevée (**Schöbitz et al., 2003**). D'autre part, il sera également important de considérer l'impact de la bactériocine sur la flore résidente. La sensibilité de la flore à la bactériocine entraîne un déséquilibre qui peut conduire à la croissance et la prolifération de microorganismes pathogènes résistants aux bactériocine. (**Carine et al., 2009**).

#### **8- Résistance aux bactériocines :**

Il existe pour les bactériocines trois types de résistants :

1/ les résistants naturels, c'est-à-dire les souches qui sont insensibles à une bactériocine donnée sans adaptation particulière, par exemple *Leuconostoc citreum* CIP103405 est insensible à la mesentéroïne 52 A.

2/ les résistants induits, qui sont produits lorsqu'une souche naturellement sensible à une bactériocine présente un phénotype de résistance lié à une adaptation, comme c'est probablement le cas *Ln. Mesenteroides subsp mesenteroides* LMA 7AR vis à vis de la mesenteroïne 52 A ou à des mutations comme chez *Lactococcus lactis*.

3/ souches dites immunisées c'est-à-dire celles qui produisent une protéine d'immunité simultanément à une bactériocine, cas de toutes les bactéries productrices de peptides antibactériens (**Jasniewski., 2008**).

## PARTIE EXPERIMENTALE

### III-Matériels et Méthodes :

Les travaux présentés dans cette thèse ont été effectués au Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire au Biomédical et à l'environnement (LAMAABE) Tlemcen.

#### Échantillonnage :

Les prélèvements de lait provenaient de vache et de brebis au niveau des fermes de la wilaya de Tlemcen. Quatre échantillons de lait ont été prélevés dont trois de lait de vache et un de lait de brebis. Après lavage à l'eau savonneuse, rinçage à l'eau puis séchage du pis, le lait a été recueilli dans des flacons stériles (100ml /flacon). Les échantillons sont transportés au laboratoire dans une glacière.

#### Dénombrement de la flore totale et la flore lactique :

Le dénombrement des bactéries lactiques a été réalisé sur milieu MRS (Man-Rogosa-Sharpe) et milieu gélose nutritif pour la flore totale par la méthode des dilutions décimales. Ces dilutions sont réalisées dans une solution de Ringer au 1/4 stérile. L'incubation se fait à 37C°/48h pour la flore totale et 30C°/24 à 72h pour la flore lactique.

**Tableau6:** Milieux utilisés et conditions d'incubation pour l'isolement des bactéries lactiques (Badis et al.,2004)

Microorganismes	Milieux d'isolement	T°C	Durée (h)	Incubation
<b>Streptocoques lactiques</b>	M17	42-48	72	Aérobiose
<b>Lactocoques</b>	Elliker	30	72	Aérobiose
<b>Leuconostoc</b>	Hypersaccharose	25	72-144	Aérobiose
<b>Pédiocoques</b>	M17	30	72	Aérobiose
<b>Lactobacilles mésophiles</b>	MRS	30	24-36	Anaérobiose
<b>Lactobacilles thermophiles</b>	MRS	45	24-36	Anaérobiose

**Isolement :**

les prélèvements de lait cru, ont été laissés à l'étuve 30°C/ 24 à 48h pour une éventuelle coagulation. Après 48h d'incubation ,0.1ml du lait coagulé est ensemencé dans un bouillon MRS et M17 à 30°C 24h à 72h. On étale par des stries à la surface de gélose MRS et M17.

**Purification :**

Après incubation, une colonie est prélevée de la surface puis réensemencée dans un bouillon MRS et M17 à 30°C 24 à 48h. Des passages successifs et alternes bouillon /gélose sont effectués pour purifier la souche.

**Identification :****1/ caractères cultureux et morphologiques :**

- ❖ Aspect macroscopique : observation sur boîte Pétri : l'aspect de colonie, la couleur...
- ❖ Aspect microscopique : on réalise une coloration de Gram pour les souches isolées puis on fait une observation au microscope et ce sur des cultures de 72h sur MRS

**2/caractères physiologiques :**

- Etude de croissance à différentes températures : les souches sont ensemencées sur gélose MRS et M17 incubées 24h à 48h à des températures variées : 10°C après incubation de 5-7 jours, 30°C, 37°C, 40°C et 45°C après incubation de 24h à 48h.
- Etude de croissance à différents pH : réaliser une gamme de pH et en suivre la croissance bactérienne 4.2, 4.5, 4.8, 6.5, 7, 8 pendant 2-3 jours incubation à 30°C
- Etude de croissance en milieu salé : le milieu de culture est enrichi de sel et la croissance est suivie à différentes concentrations : 2%, 3%, 4%, 6.5% pendant 2-3 jours incubation.

### **3/caractères biochimiques :**

**a/mise en évidence de catalase :** On ajoute quelques gouttes d'eau oxygénée sur les colonies bactériennes. Le dégagement de gaz indique la présence de l'enzyme catalase.

**b/Test de fermentation :** Les souches sont ensemencées dans un bouillon M17 ou MRS contenant les cloches du Durham, puis incubés à 30°C/24h. L'absence de gaz dans les cloches montre qu'il s'agit d'un métabolisme homofermentaire alors que la présence de gaz indique qu'il s'agit d'un métabolisme hétérofermentaire.

**c/hydrolyse de l'arginine :** En ensemence les bactéries lactiques sur milieu M16 BCP après incubation à 30°C/24H en anaérobiose. Le virage de milieu de violet vers le jaune indique qu'il n'y a pas d'hydrolyse de l'arginine. Par contre les colonies de couleur blanches hydrolysent l'arginine.

**d/hydrolyse d'esculine:** Est réalisée pour les souches des genres *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Enterococcus*, *Leuconostoc* et *Lactobacillus*. Elle est mise en évidence sur le milieu gélosé à la bile esculine après incubation des cultures à 30 °C pendant 72 h. L'hydrolyse de l'esculine libère l'aglycone qui est décelé par une réaction chimique en présence de sel de fer et donne une coloration noire au milieu de culture.

**e/utilisation de citrate :** elle est vérifiée sur milieu (KMK) verte l'apparition de la colonie bleue et le virage du milieu vert à bleu après une incubation 30°C/24h.

**f/Test d'utilisation des sucres :** Les cultures bactériennes revivifiées sur MRS subissent une 1<sup>ère</sup> centrifugation à 4000 t/min pendant 10 min après élimination du surnageant, 5ml d'eau physiologique stérile ajoutés au culot puis une 2<sup>ème</sup> centrifugation suivie de l'ajout de 5ml d'eau physiologique stérile au culot bien agité au vortex pour obtenir une suspension homogène. Bouillon MRS ou M17 sans sucre + le pourpre de bromocrésol (0,04g/l) repartit dans des tubes à raison de 10 ml par tube. Dans chaque tube on met quelques gouttes de suspension bactérienne + quelques gouttes de sucre testées. On crée l'anaérobiose par l'addition de l'huile de paraffine stérile à la surface puis incubés 30°C/24h à 72h. L'utilisation des sucres se traduit par un virage de l'indicateur coloré (virage au jaune). Les sucres étudiés sont : Glucose, D(-) fructose, D(-) arabinose, D(+) galactose, lactose, maltose, cellulose, mannitol, amidon, saccharose. Les sucres sont préparés à des concentrations de 1%.

#### 4/Conservation des souches :

**Conservation à courte durée :** sur un milieu M17 ou MRS incliné, les souches sont ensemencées puis incubées à 30°C pendant 24h et conservées au réfrigérateur à 4°C. un repiquage doit être réalisé toutes les quatre semaines.

**Conservation à longue durée :** le milieu de conservation contient 70% de lait écrémé (enrichi par 0.05% d'extrait de levure 0.05% du glucose) et 30% du glycérol. Les souches sont centrifugées à 4000 tour/ min pendant 10min après le surnageant est éliminé et 5ml du mélange est rajouté au culot, le tout est rempli dans des tubes épidorques à température de -20°C. (Badis et al.,2004)

#### 5/ caractères technologiques :

##### 1/pouvoir acidifiant :

##### 1-1/mesure de l'acidité :

L'activité d'acidification des bactéries lactiques est mesurée sur milieu de lait écrémé (110g/l d'eau distillé) est stérilisé par autoclavage 110°C pendant 10 min. 5ml de lait écrémé stérile est inoculé par (2%) de chaque bactérie lactique isolée. Puis incubées à 30°C/24h. Les souches à coagulation rapide après 18h. Les souches à coagulation lente jusqu'à 24h. 1 ml de chaque tube est ensemencé dans 50 ml de lait écrémé incubées 18h à 30°C et 6h à 45°C. La mesure de l'acidité se fait par la méthode normalisée de NaOH (N/9) normal exprimée en ° Dornic. Elle est réalisée par la titrimétrie, Un échantillon précis de 10 ml de lait est placé dans un bécher de 100 ml 2 à 3 gouttes de la solution phénolphthaléine sont rajoutées. Le volume de soude est mesuré après apparition d'une couleur rose persistante.

0,1ml NaOH N/9 → 1D° (degré Dornic)

1D° → 0,01% d'acide lactique

##### 1-2/la cinétique d'acidité :

Après avoir sélectionnées les souches fortement acidifiantes on teste l'acidité de trois souches lactiques après chaque 2h d'incubation et en mesure on parallèle le pH de lait.

## 2/ pouvoir protéolytique :

Les souches sont ensemencées dans des puits creusés dans la gélose YMA à fin de mettre en évidence leur activité protéolytique. Cette dernière si elle existe, se traduit par la formation d'une zone transparente autour des souches testées.

## 3/pouvoir aromatisant :

Est détectée par la réaction de Voges Proskauer sur le bouillon lactosé et citraté. Elle concerne les souches appartenant aux genres *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus*. La mise en évidence de l'acétylméthylcarbinol (ou acétoïne) est obtenue après une culture de 72 h à 30 °C. 1 ml de culture est additionné de 0,5 ml de réactif à l' $\alpha$  naphthol et 1 ml de NaOH à 16 %.

## 7/ recherche des bactériocines :

Pour la recherche de l'activité inhibitrice en milieu liquide, surnageant, la méthode de diffusion en puits a été utilisée par Tagg et Mac Given, (1971) (Mami, 2010). Elle permet de mettre en contact le surnageant de la souche lactique productrice de substances antimicrobiennes avec la souche test.

### 7/1 Les souches de référence utilisées :

Les souches de références utilisées appartiennent à la collection de laboratoire LAMAABE. Elles sont de nombre quatre, deux à GRAM positive et deux à GRAM négative classées dans le tableau suivant :

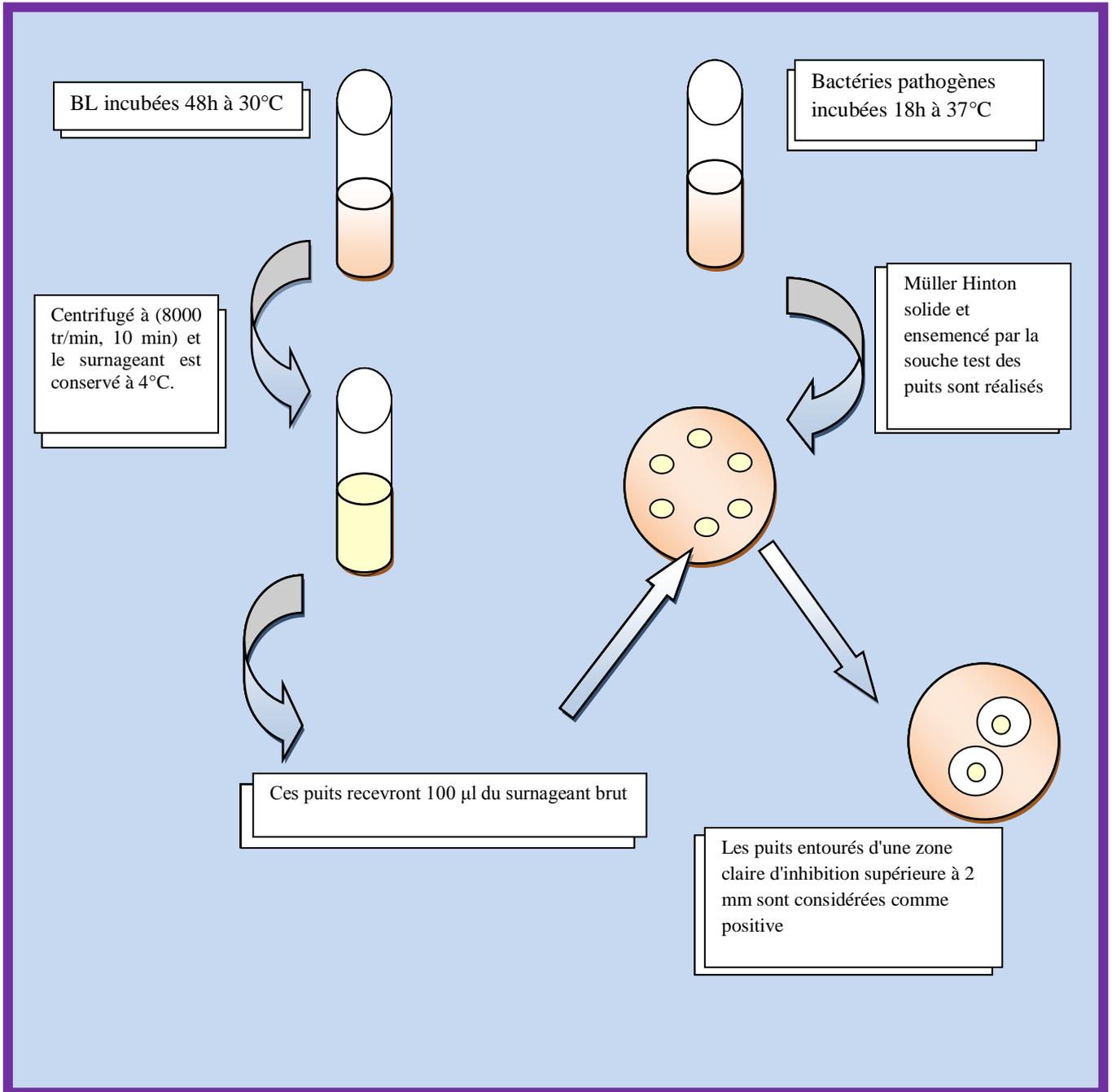
**Tableau 7 :** caractères des souches de références :

La souche	GRAM	catalase	Type respiratoire
<b>E.coli ATCC 25922</b>	<b>Coccobacille G -</b>	-	<b>Aero anaérobies facultatifs</b>
<b>Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853</b>	<b>Bacille G -</b>		<b>aérobies stricts</b>
<b>Bacillus cereus ATCC 11778</b>	<b>Bacille a spore G-</b>	+	<b>Aero anaérobie</b>
<b>Staphylococcus aureus ATCC 25923</b>	<b>Cocci en grappe de raisin G+</b>	+	<b>Aero anaérobie</b>

## **7/2 la méthode de diffusion en puits:**

Cette méthode consiste à :

- 1/ Les souches productrices de substances inhibitrices sont cultivées dans du milieu MRS liquide et incubées pendant 48 heures.
- 2/ Après incubation, le milieu est centrifugé (8000 tr/min, 10 min) et le surnageant est conservé à 4°C.
- 3/ Dans une boîte de Pétri contenant du Müller Hinton solide et ensemencé par la souche test, des puits sont réalisés avec un emporte pièce.
- 4/ Ces puits recevront 100 µl du surnageant brut de la culture lactique à tester.
- 5/ les boîtes sont incubées pendant 24 h à 30°C.
- 6/ Les puits entourés d'une zone claire d'inhibition de la souche test et ayant un diamètre supérieur à 2 mm sont considérées comme positive .voir figure 8



**Figure 8 :** schéma de la méthode de diffusion en puits

## I-Résultats :

### 1/ Dénombrements

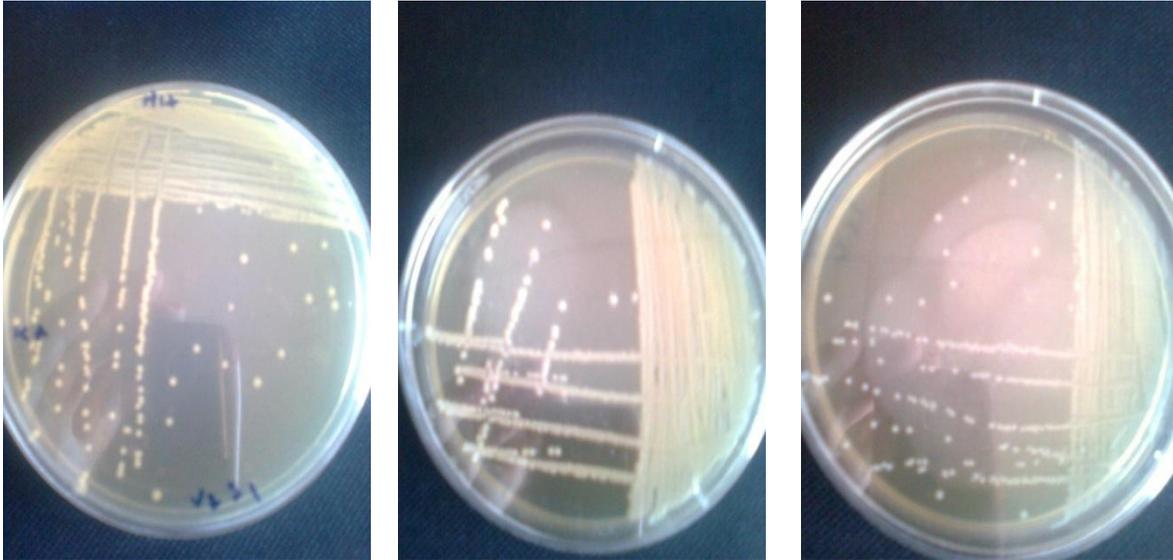
Les résultats du dénombrement pour le lait de vache et le lait de brebis sont rassemblés dans le **Tableau 8**. Le dénombrement montre que le nombre moyen des bactéries lactiques varie de  $1,04 \cdot 10^7$  à  $1,68 \times 10^8$  UFC/ml dans le lait de vache, tandis que dans le lait de brebis ce nombre est de  $1,09 \times 10^8$  UFC/ml en moyenne. La flore aérobie mésophile totale moyenne est de  $3,9 \cdot 10^7$  UFC/ml pour le lait de brebis et  $7 \cdot 10^7$  UFC/ml pour le lait de vache.

**Tableau 8:** Nombre moyen de colonies dénombrées (UFC/ml de lait) dans le lait de chaque Vache

	date de prélèvement	lieu	origine	dénombrement
Prélèvement 1	14/06/2011	ouزيدane	vache	la flore mésophile $6 \cdot 10^7$ Bactérie Lactique $1,68 \cdot 10^8$
Prélèvement 2	14/06/2011	ouزيدane	vache	la flore totale $6,9 \cdot 10^7$ Bactérie Lactique $1,04 \cdot 10^8$
Prélèvement 3	14/06/2011	ouزيدane	vache	la flore mésophile $7 \cdot 10^7$ Bactérie Lactique $1,68 \cdot 10^8$
Prélèvement 4	20/06/2011	henaya	brebis	la flore mésophile $3,9 \cdot 10^9$ Bactérie Lactique $1,09 \cdot 10^9$

### 2/ Isolement

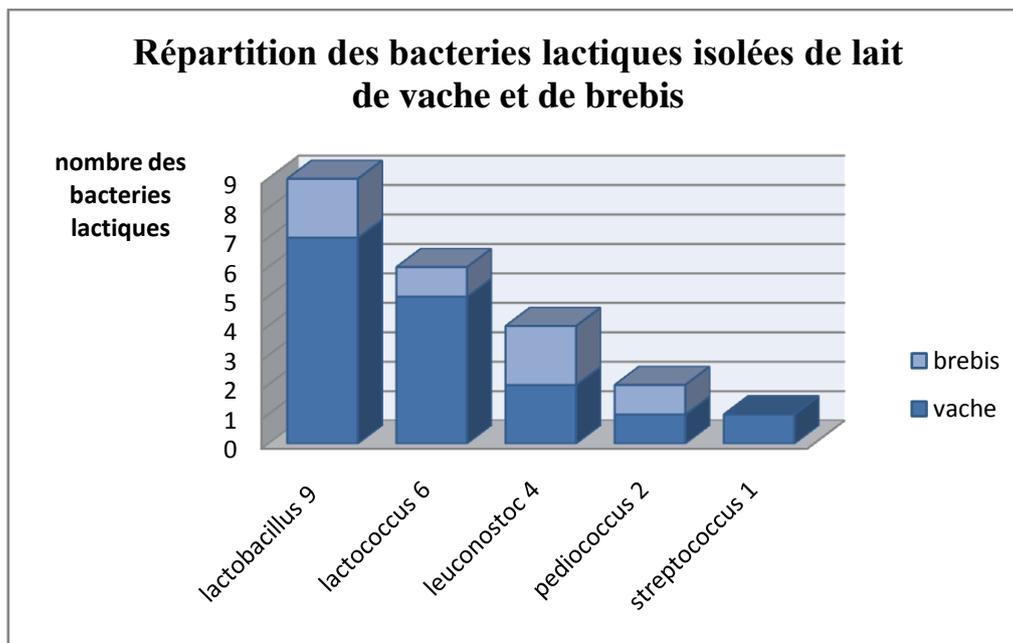
22 colonies isolées sont de taille variable, de forme circulaire avec un pourtour régulier ou irrégulier ou érodé et de couleur blanche, transparente ou blanc grisâtre (voire fig. 10) ont subi une série de purification pour l'objet d'une identification phénotypique qui a donné cinq genre : *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*.



**Figure 9:** photos des bactéries lactiques isolées

### 3/ Identification

L'observation microscopique a révélé deux formes de cellules (Coques et Bâtonnets). Les Coques (diplocoques et en chaînette ou tétrade) constituent 59% de l'effectif total et sont représentées par les genres *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*. Les formes bâtonnets observés sont représentées par le genre *Lactobacillus* avec 41% de l'effectif total. Cinq genres présents dans le lait de vache *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*. Par contre dans le lait de brebis on trouve les genres suivants : *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, et *Lactococcus*. Voir tableau 9 et la figure 10

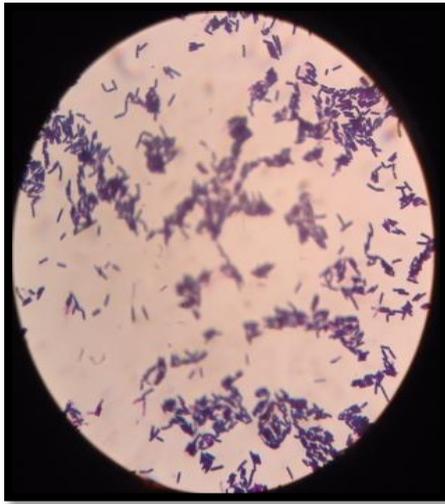


**Figure 10** : répartition des souches lactiques isolées de lait de vache et de brebis

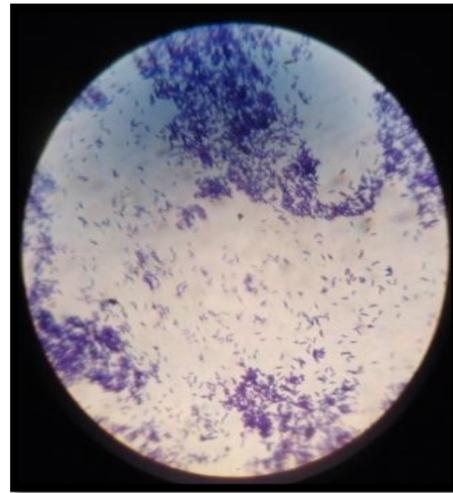
**Tableau 9** : les différents genres de bactéries lactiques isolées :

La souche	L'origine de la souche	
	vache	brebis
<b>Lactobacillus (9)</b>	BL 1, 9, 16, 17 ; 18, 19, 20 (7souche)	BL 11, 22 (2 souche)
<b>Lactococcus (6)</b>	BL 2,5, 6, 8, 10 (5 souche)	BL 12 (1souches)
<b>Leuconostoc (4)</b>	BL 3, 7, (2 souche)	BL 13, 14 (2souches)
<b>Pediococcus (2)</b>	BL 15 (1 souche )	BL 21 (1souche)
<b>Streptococcus (1)</b>	BL 4 (1 souche )	

Les 22 souches sont Gram positif (**fig. 11**), immobiles, catalase négative, peroxydase négative. La croissance à différentes températures a révélé treize souche se développe à 40°C et six souches se croit à 45 °C, ces derniers ont subit un test de thermorésistante qui y a donné quatre souche thermorésistante, une Streptococcus, deux lactobacillus et une Lactococcus.



(A)



(B)

**Figure 11** : Photo d'Observation Microscopique d'une bactérie lactique. (A) : des bâtonnets, (B) : des coques

Sept souches sont capables de se croître à températures de 10°C BL14, BL10, BL12, BL13, BL19, BL20, BL21.

Deux souches ont poussé à concentration de NaCl 6.5% BL16 et BL18 alors que deux autres souches ont poussé à pH 4.2 BL10 et BL18 (voir tableau 10).

L'étude des caractères biochimiques des bactéries isolées ont donné une souche ADH positive (BL2, BL4, BL5, BL10, BL11, BL15, BL17, BL18, BL21.), six souches productrices d'arôme qui sont : (BL8, BL12, BL15, BL16, BL17, BL20). (Voir figure 12)



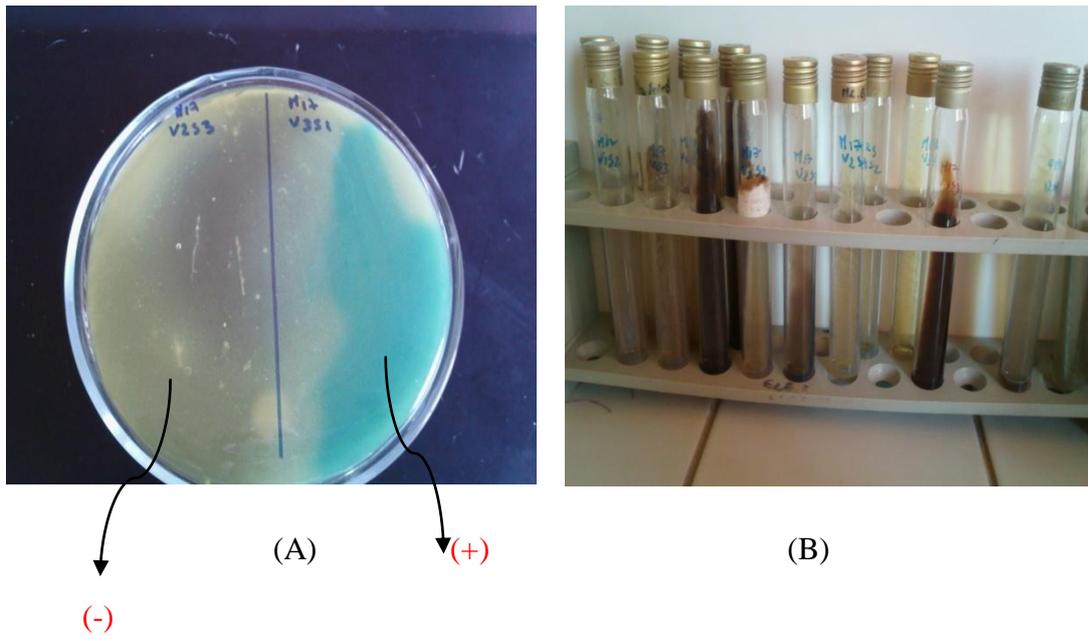
(A)



(B)

**Figure 12** : (A) : test d'arginine positive. (B) test de production d'arôme.

Alors que les souches esculinase positives sont (BL4, BL6, BL10, BL15, BL17, BL20) contrairement au (BL2, BL3, BL5, BL8, BL15) qui sont citratase positive voir figure 13



**Figure 13:** photo de test de citratase (A), hydrolyse de l'esculinase (B)

**Tableau 10:** Caractéristiques physiologiques et biochimiques des souches lactiques isolées.

Espèces présumés	Obs micro	10°C	30°C	37°C	40°C	45°C	Res	pH 4,2	pH 4,5	pH 4,8	pH 6,5	pH 7	pH 8	2%NaCL	3%NaCL	4%NaCL	6,5%NaCL	catalase	GAZ	ADH	ESC	CIT	VP	Saccharose	D-arabinose	lactose	Glucose	D+galactose	Maltose	Mannitol	D-fructose	cellulose	amidon	
BL 1	B	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	F	F	-	+	-	-	+	-	-	+	-	
BL 2	CC	F	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
BL 3	CC	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
BL 4	CC	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	F	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
BL 5	CC	F	+	+	ND	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	F	+	F	+	+	F	F	-	-	+	-
BL 6	CC	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	F	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
BL 7	CC	F	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-
BL 8	CC	F	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	F	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
BL 9	B	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	F	-	-	F	-	-	F	+	F	-	-	F	-	F
BL 10	CC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-
BL 11	B	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	F	-	-	-	+	+	F	+	-	-	-	-	-
BL 12	CC	+	+	+	+	+	-	-	+	F	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	F	F	-	F	F	-
BL 13	CC	+	+	+	+	-	-	-	+	F	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	F	-	F	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-
BL 14	CC	-	+	+	+	-	-	-	+	F	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	F	-	F	+	+	-	+	F	-	-	-	+	-
BL 15	CT	F	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BL 16	B	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	F	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BL 17	B	-	+	+	ND	+	+	F	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BL 18	B	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BL 19	B	+	+	-	-	-	-	-	+	F	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BL 20	B	+	+	-	+	-	-	-	+	F	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BL 21	CT	+	+	+	+	-	-	-	ND	F	+	+	ND	-	-	-	ND	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BL 22	B	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

**NOTES :**(+) : réaction positive, (-) : réaction négative, F : Faible, ND : non déterminée, CC : cocci en chaine, CT : cocci en tétrade, B : bacille, Obs micro : Observation Microscopique, Res : résistance à 63°C /30min, GAZ : production de gaz à partir du glucose, ADH : production de l'arginine dihydrolase, ESC : hydrolyse de l'esculine, CIT : dégradation de citrate, VP : Voges Proskauer,

Le test de type fermentaire a montré six souche hétérofermentaire (BL3, BL7, BL12, BL13, BL14, BL19.) et seize souche homofermentaire se qui y a orienté vers les différentes genres de bactérie lactique.



(A)



(B)

**Figure 14** : photo de type fermentaire (A) hétérofermentaire (B) homofermentaire

Le dernier test biochimique est l'étude de l'utilisation de sucre par la souche qui nous a permis de s'orienté vers les différentes espèces lactiques. (Voire tableau 10)



**Figure 15** : photo de l'utilisation des sucres par les bactéries isolées

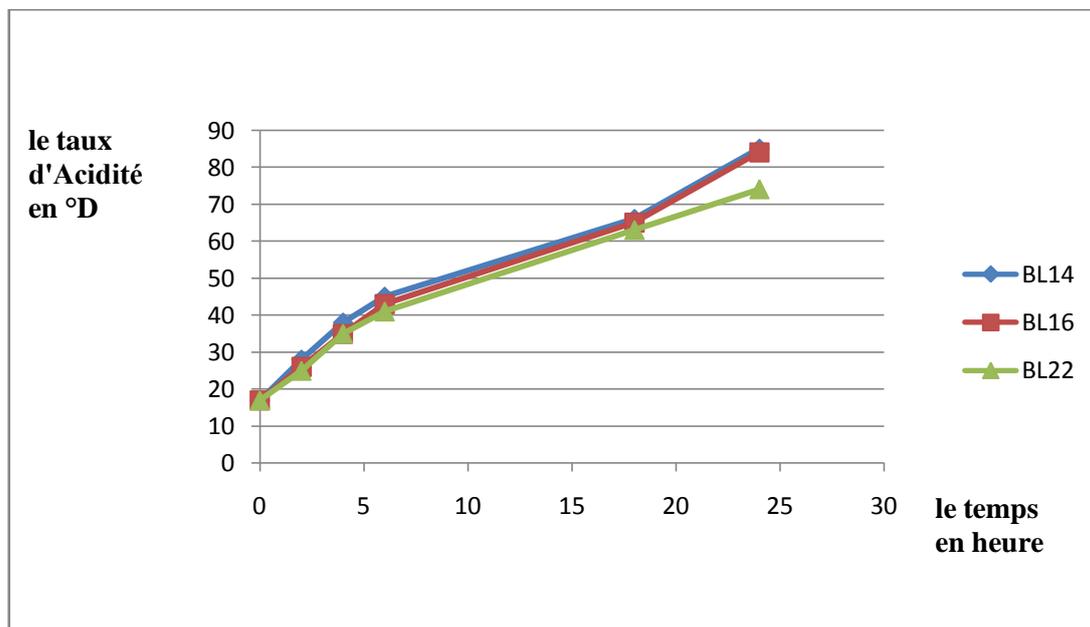
#### 4/ Etude de caractères technologique :

**Pouvoir acidifiant** : Etude de pouvoir acidifiant à montre une différence d'acidité entre les souches étudiées. L'Acidité est entre 12 et 49°D (voir tableau 11). Les souches mésophiles présentent des acidités proches sauf pour la souche BL 18, elle est entre 30 et 49°D.

**Tableau11** : production d'acide pour les souches isolées.

Production d'acide (°D)	<30	30 - 40	>40
<b>Bactéries lactiques</b>			
<b>Lactobacillus</b>	4	1	4
<b>Lactococcus</b>	2	2	2
<b>Leuconostoc</b>		2	2
<b>Pediococcus</b>		1	1
<b>Streptococcus</b>	1		
<b>total</b>	7	6	9

La sélection des souches les plus acidifiantes a donné trois souches deux lactobacilles BL16 et BL22 et un cocci leuconostoc BL14. Cette dernière est la plus acidifiant puis BL22 et BL16 qui ont subi une cinétique ou en mesure l'acidité de la souche après chaque deux heures. La figure 16 montre les résultats de la cinétique d'acidification où on remarque les deux souches BL14, BL16 ont presque la même cinétique.



**Figure 16** : courbe de la cinétique d'acidification de BL14, BL16 et BL22.

**Pouvoir aromatisant :** l'apparition d'un anneau rose persistant sur les vingt deux souches isolées a été observée chez six souches présentant une forte production de diacetyl dont deux lactobacilles, deux lactococcus (*Lactococcus lactis subsp lactis biovar diacetylactis*, *Lactococcus lactis subsp cremoris*) et deux pediococcus (*Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus dextrinicus*). Le reste des souches ont une activité entre faible et nul, voir tableau 12.

**Pouvoir protéolytique :** observation d'une zone claire autour de puits indique que nos souches ont la capacité de dégrader les caséines trouvées dans le milieu, ainsi dix isolats ont donnée des zones entre 2.5 et 1.4 mm. Les résultats sont représentés dans le tableau12.

**Tableau12:**Les activités technologiques (pouvoir protéolytiques et aromatiques)

	Pouvoir protéolytiques	Pouvoir aromatisant
<b>Lactobacillus</b>	5	2
<b>Lactococcus</b>	4	2
<b>Leuconostoc</b>		
<b>Pediococcus</b>	1	2
<b>Streptococcus</b>		

**Production des bactériocines :**

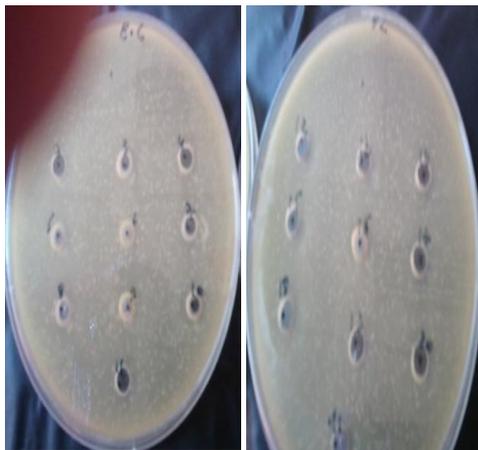
Aucune souche des bactéries lactiques isolées n'a présentée un effet positif sur les quartes souches pathogènes utilisées ce qui montre les photos de la figure 17.



*Pseudomonas aeruginosa*



*Bacillus cereus*



*Escherichia coli*



*Staphylococcus aureus*

**Figure17** : résultats de la recherche des bactériocines

## II. discussion des résultats:

### 1-Identification des souches:

L'identification des lactobacilles se fait à l'aide de la collection des lactobacillus de laboratoire de microbiologie appliquée université d'Oran Algérie (Mami., 2010) voir annexe 4 et les souches de références de **bergy's manual 2009**.

**Lactobacillus** : Parmi les *Lactobacillus*, seul La souche **BL19**, est classés dans le groupe C hétérofermentaire obligatoire par la production de CO<sub>2</sub> sur milieu glucosé, se développent à 10 °C mais pas à 45 °C et fermente l'ensemble des sucres testés est classés parmi l'espèce *Lactobacillus brevis*. Le reste des lactobacillus sont des homofermentaire qui diffère du précédent par le non production de gaz, La souche **BL17** se développe à 45 °C VP positif se rapprochent de l'espèce *Lactobacillus paracasei subsp paracasei*

**Tableau 13** : les différents caractères des lactobacilles isolés

Espèces présumés	Obs micro	Température					Res	pH					NaCl				catalase	GAZ	ADH	ESC	CTR	VP
		10°C	30°C	37°C	40°C	45°C		pH 4,2	pH 4,5	pH 4,8	pH 6,5	pH 7	pH 8	2%NaCl	3%NaCl	4%NaCl						
BL 1	B	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	F	F
BL 9	B	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	F	-	-	F
BL 11	B	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	F	-	-
BL 16	B	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	F	-	-	+
BL 17	B	-	+	+	N D	+	+	F	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+
BL 18	B	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	F
BL 19	B	+	+	-	-	-	-	-	+	F	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
BL 20	B	+	+	-	+	-	-	-	+	F	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-
BL 22	B	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

**Lactococcus** : au total six isolats ont été identifiés au Lactococcus par rapport au test de l'ADH et la production de l'acétoïne ils ont été subdivisées en espèces et sous espèces.

1-ADH<sup>+</sup> ACT<sup>+</sup> : BL8 isolats de *Lactococcus lactis subsp lactis biovar diacetylactis*.

2-ADH<sup>+</sup> ACT<sup>-</sup> : BL6 isolats de *Lactococcus lactis subsp lactis* (croissance à 4% de NaCl) et BL 2 isolats de *Lactococcus lactis subsp hordoniae* (pas de croissance à 4% de NaCl).

3-ADH<sup>-</sup> et ACT<sup>+</sup> : BL12 isolats *Lactococcus lactis subsp cremoris* utilisant les carbohydrates.

**Tableau 14 :** les différents caractères des Lactococcus isolés

Espèces présumés	Obs micro	10°C	30°C	37°C	40°C	45°C	Res	pH 4,2	pH 4,5	pH 4,8	pH 6,5	pH 7	pH8	2%NaCL	3%NaCL	4%NaCL	6,5%NaCL	catalase	GAZ	ADH	ESC	CTR	VP	
BL 2	CC	V	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	✓
BL 5	CC	V	+	+	ND	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	✓
BL 6	CC	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	V	+	+	-	+	-	-	-	V	+	-	-	-
BL 8	CC	V	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	V	-	+	+	+
BL 10	CC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
BL 12	CC	+	+	+	+	+	-	-	+	V	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

**Leuconostoc :** Toutes les quatre souches de *Leuconostoc* présentent un développement positif à 37 °C et à 40°C sauf BL7 et BL 3. Elles sont ADH négatif, esculine négatif, VP négatif se développent à 2% de Nacl (sauf BL13 se développe aussi à 4% de Nacl) dont BL7, BL13, BL14 ont présentées les caractères de *leuconostoc lactis* alors que la souche BL3 présentes les même caractères de *leuconostoc mesenteroides subsp cremoris* selon les souches de référence de **bergy's manual 2009**

**Tableau 15 :** les différents caractères des leuconostoc isolés

Espèces présumés	Obs micro	10°C	30°C	37°C	40°C	45°C	Res	pH 4,2	pH 4,5	pH 4,8	pH 6,5	pH 7	pH8	2%NaCL	3%NaCL	4%NaCL	6,5%NaCL	catalase	GAZ	ADH	ESC	CTR	VP	
BL 7	CC	V	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
BL 3	CC	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
BL 13	CC	+	+	+	+	-	-	-	+	V	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	V	-	-	V
BL 14	CC	-	+	+	+	-	-	-	+	V	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	V	-	-	V

**Pediococcus :** deux espèces de *Pediococcus* ont été isolées. L'observation sur microscope révèle une forme caractéristique de cocci en tétrade. Les deux souches identifiées sont :  
La BL15 *Pediococcus pentosaceus* se diffère à la souche de référence de **Bergy's et manual (2009)** par la croissance à 4% de Nacl. La BL21 est une *Pediococcus dextrinicus* se diffère par la fermentation de D-arabinose

**Tableau 16 :** les différents caractères des pediococcus isolés

Espèces présumés	Obs micro	10°C	30°C	37°C	40°C	45°C	Res	pH 4,2	pH 4,5	pH 4,8	pH 6,5	pH 7	pH8	2%NaCL	3%NaCL	4%NaCL	6,5%NaCL	catalase	GAZ	ADH	ESC	CTR	VP	
BL 15	CT	V	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
BL 21	CT	+	+	+	+	-	-	-	ND	V	+	+	ND	-	-	-	ND	-	-	+	-	-	-	+

**5/Streptococcus** : Pour les *Streptococcus*, les résultats des tests réalisés sont très variables. Sur la base de la thermorésistance et la production des cellules à 45 °C, croissance à pH 6,5, pH 4.5, pH 4.8, pas de production d'acétoïne et fermentes les différentes sucres testes BL4 peuvent être classée parmi l'espèce *Streptococcus thermophilus*. Selon les données de la souche de références de **Bergy's et manual (2009)**

**Tableau 17** : les différents caractères des Streptococcus isolés

Espèces présumés	Obs micro	10°C	30°C	37°C	40°C	45°C	Res	pH 4,2	pH 4,5	pH 4,8	pH 6,5	pH 7	pH 8	2%NaCL	3%NaCL	4%NaCL	6,5%NaCL	catalase	GAZ	ADH	ESC	CTR	VP
	BL 4	CC	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-

## 2- discussion générale:

Les résultats de dénombrement observé sont entre  $10.4 \cdot 10^7$  à  $16.8 \cdot 10^7$  UFC/ml les même valeurs sont donnée par (**Bekhouché., 2005**). l'étude des caractères culturaux, biochimiques et physiologiques des vingt deux souches sélectionnées à partir de lait crus de vache et de brebis nous ont permis de mettre en évidence cinq genres avec la dominance de lactobacillus (9 isolats) suivie de lactococcus (6) , leuconostoc(4), pediococcus (2) et streptococcus (1).

Parmi les neuf lactobacilles isolées, deux sont identifiées jusqu'au l'espèce, *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus paracasei subsp paracasei*. Les coques isolées sont représenté par cinq lactococcus ou on a peu identifiés jusqu'à l'espèce quatre isolats donnant les caractères *Lactococcus lactis subsp lactis biovar diacetylactis*, *Lactococcus lactis subsp lactis*, *Lactococcus lactis subsp hordonaie*, *Lactococcus lactis subsp cremoris* cette dernière est décrites aussi au Maroc, à l'est de l'Europe et en Algérie car ses souches deviennent rare dans les pays industrialisés (**Badis, 2005**). Alors que les quatre leuconostoc à donné trois

*Leuconostoc lactis* et une *Leuconostoc mesenteroides subsp cremoris*. Les deux cocci en tétrades identifiées sont : *Pediococcus pentosaceus* et *Pediococcus dextrinicus* et une seul

Streptococcus : *Streptococcus thermophilus*. Ces mêmes résultats sont observés sur le lait cru de vache produit en Algérie par **Saïdi 1998** et en Constantine par **Bekhouché en 2005**. En remarque que les mêmes genres sont trouvées dans le lait de brebis sauf pour **Streptococcus thermophilus**. L'absence de germes de contamination comme Enterococcus nous pouvons le déduire par les conditions hygiéniques de la traite qui sont défavorables à ce type de bactérie (le nombre de vache dans la ferme est de dix isolées et elles sont bien nettoyer.

La capacité de l'acidification des isolats mésophiles obtenu était relativement homogène, après 18 h d'incubation, Par rapport aux souches thermophiles ou le taux d'acidité est faible. Cependant, les valeurs variaient entre 30 °D et 49 °D. L'étude de la cinétique d'acidification de trois souches *Leuconostoc* et deux *Lactobacillus* montre qu'elles ont une acidification lente ou *Leuconostoc* atteint 80 °D après 24 h d'incubation, comparant aux résultats obtenu par **Badis 2005** ou le taux de production d'acide atteint 60°D et plus après 18 h d'incubation. L'activité protéolytique appréciable pour huit souches avec un diamètre entre 1.4 et 2 mm. La recherche des bactériocines par la méthode de diffusion en puits a révèle que les vingt deux souches étudiés n'ont pas activité inhibitrice contre les souches pathogènes utilisées même les souches qui présente une forte acidité n'ont pas arrivée à inhibé ces souches pathogènes.

## Conclusion :

L'identification des différentes souches a montrée une répartition très variée des espèces dans les quatre échantillons de lait appartenant aux trois vaches et une brebis. Cinq genres ont été identifiés avec une dominance de lactobacillus suivie de Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus. Parmi les Lactococcus isolées une Lactococcus lactis subsp cremoris qui est devenue une espèce rare.

A partir de cet étude on a pu conclure que :

- les 22 bactéries identifiées ne présente aucune activité inhibitrice contre les germes pathogènes utilisées et même les souches qui ont une acidité n'ont pas pu les inhibés.
- L'identification des souches isolées dans cette étude a nécessité l'utilisation de plusieurs techniques phénotypique. ces derniers ne donnent pas une identification fiable et sûre, et qu'on est besoin toujours d'une identification moléculaires.

Pour compléter ce travail sur la flore microbienne du lait cru et ses dérivés, nous proposons :

- \*D'augmenter le nombre des souches isolées

- \*D'utiliser des techniques moléculaires pour la confirmation de l'identification de ces bactéries isolées.

- \*D'élargir Les compétences acquises dans ce domaine sur lait cru des autres espèces animales (chèvre, chamelle) et leurs dérivés traditionnels consommés.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A/

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

**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

B/

**Badis. A ; Guetarni.D ; Moussa Boudjemaa.B ; Henni. D. E ; Kihal. M . (2004).** Identification and technological properties of lactic bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. Food Microbiology 21 (2004) 579-588

**Badis. A ; Laouabdia-Sellami.N ; Guetarni ; ; Ouzrout.R., 2005.** Carcterisation phénotypiques des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales « arabia et kabyle ». Sciences & technologie C – N° 23 pp 30-37.

**Bekhouche Farida. (2006).** Bactéries lactiques du lait cru de vache et Microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes : 1. Isolement et Identification biochimique. 2. Evaluation et Optimisation de la production d'enzyme polygalacturonase. Thèse de doctorat d'état en microbiologie et enzymologie option : génie alimentaire. Université De Mentouri Constantine Institut De La Nutrition De L'alimentation Et Des Technologies.

**Bergy's manual. (2009) ).** Systematic of bacteriology. Second Edition. Volume three the fermicutes. Edition springer

**Boudjemaa Khaled. (2008).**Essai d'optimisation de la production d'acide lactique sur lactisérum par streptococcue thermophilus. Mémoire de magister. option biochimie et microbiologie appliquées. Université M'Hmed Bougara -Boumerdés

## C/

**Calvez. S ; Belguesmia. Y ; Kergourley. G.(2009).** in bactériocines : de la synthèse aux applications in bacteries lactiques :physiologique , metabolisme,genomique et applications industrielles edition : Economica .2009. p 100-122.

**Carine. D ; Tonart. P., 2009.** Les bactériocines des bactéries lactiques caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. BASE. VOLUME 13.

**Cocaign-Bousquet M., Garrigues C., Loubière P., Lindley N.D. (1996)** Physiology of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis*. *Antonie van Leeuw*. 70: 253-267

## D/

**De Roissart H.B. (1986).** Les bactéries lactiques. Dans : le lait et les produits laitiers. Luquet F. M., 3, Ed. Techniques et Documentations Lavoisier. Paris, pp: 343-407

**De Roissart, H. et Luquet, F.M. (1994).** Les bactéries lactiques. Uriage, Lorica, France, vol. 1. pp. 1-286

**Deegan. L. H; Cotter. P. D; Hill. C; Ross. P. (2006).** Bacteriocins: biological tools for bio preservation and shelf-life extension. International. Dairy. Journal.

**Desmazeaud, M. (1996).** Les bactéries lactiques dans : L'alimentation humaines : utilisation et innocuité. *Cahiers Agricultures*, 5, pp: 331-343.

**Diep, D.B., NES, I.F., 2002.** Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Current Drug Targets* 3, 107–122.

**Dridier .D ; Prévost. H. (2009).** Bactéries lactiques : physiologique, métabolisme, génomique et applications industrielles Edition : Economica

**Driessen et al 1995.** In. Bacteriocins :mechanism of membrane insertion and pore formation .*Antonie Van Leeuwenhoek* 76: p 186.1999

## E/

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

**Ennaher et al.2000 ; Ruch et al., 2007.** In Les bactériocines des bactéries lactiques caractéristiques et intérêts pour la bio conservation des produits alimentaires. BASE.VOLUME 13.*Environ.13*: 143-154 F.M.) Lorica, Uriage, France.

## **F/**

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

**Field et al ., 2007.** in construction of a new shuttle vector and its use for cloning AND expression of two plasmide encoded bacteriocins from *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* BGSJ2-8.*Int.J.Food Microbiol.*

**Filmond et al 2000, Richard et al 2006.** In .Bacteriocins : mechanism of membrane insertion and pore formation .*Antonie Van Leeuwenhoek* 76: p 186.1999

## **G/**

**Galvez. A; Abriouel. H; Lucas López. R; Ben Omaret. N. (2007).** Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int J Food Microbiol.120*: 51-70.

**Gevers. D. (2002).** Tetracycline resistance in lactic acid bacteria isolated from fermented dry sausages. Thèse Doc. Univ. Gent. Fac. Sci. Gent. Belgium.

**Guinane . C. M; Cotter. P. D; Hill. C; Ross. P. (2005).** Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. *J Appl Microbiol.98*: 1316-1325.

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

## **H/**

**Holzappel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J. and Schillinger, U. (2001).** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr. 73(suppl)*: 365S–73S.

## **J/**

**Jasnieski. J. (2008).** Etude de mecanisme d'action des bacteriocine de la sous classe Iia. Thèse de doctorat. Université Nancy.

## **K/**

**Kahina Maya (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)

**Klaenhammer., 1988** in les bacteriocines des bacteries lactiques ,caracteristiques et interets pour la conservation des produits alimentaires . BASE.VOLUME 13. **2009**

## **L/**

.

**Leveau, J.Y. et Bouix, M. (1993).** Les levures. Dans : Microbiologie industrielle, les micro-organismes d'intérêt industriel. Eds.Tech. et Doc. Lavoisier. Paris, pp : 2-39.

.

## **M/**

**Mami. A ;Hamedi. A ;Henni.J .Kerfouf. A ;Kihal. M. (2010).** Activité antibacterienne de *Lactobacillus plantarum* isolée du lait cru de chèvre d'Algérie vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*.LES TECHNIQUES DE LABORATOIRE -2010, volume 5, N°21

**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)

**Mc Auliffe 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

**Morisset et al (2002).** in bacteries lactiques : physiologique, metabolisme, genomique et applications industrielles edition : Economica .**2009**.

**Mortvedt-Abild Gaard. C et al. (1995).** .in bacteries lactiques : physiologique, metabolisme, genomique et applications industrielles edition : Economica .2009. p 100

N/

**Nigotova .K et al (2007).** In Les bacteriocines des bacteries lactiques caracteristiques et interets pour la bioconservation des produits alimentaires. BASE.VOLUME 13

**Novel, G. (1993).** Les bactéries lactiques. Dans : Microbiologie industrielle, les microorganismes d'intérêt industriel. Leveau, J.Y, Bouix, M., Tech. et Doc. Lavoisier Paris, pp: 170-374.

O/

**Oppegard et al (2007).** In Les bactériocines des bactéries lactiques caractéristiques et intérêts pour la bio conservation des produits alimentaires. BASE.VOLUME 13.

P/

**Patton et al ., (2005).** In Les bactériocines des bactéries lactiques caractéristiques et intérêts pour la bio conservation des produits alimentaires. BASE.VOLUME 13

**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 et al (2003).** microbiologie.2<sup>ème</sup> Edition française. Traduction de la 5<sup>ème</sup> Edition américaine par Claire-Michelle-Bacq-Calberg et Jean Dussart. Edition de Boeck

Q/

**Quadri LE ., et al (1994)** .in bactéries lactiques : physiologique , métabolisme, génomique et applications industrielles Édition : Economica .2009. p 100

## R/

**Raynaud. S. (2006).** Régulation métabolique et transcriptionnelle de l'autoacidification chez *Lactococcus lactis*. Thèse de Doctorat, Spécialité : Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries Toulouse N° d'ordre : 826 pages : 309

**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.

**Ross.P. R ; Morgan, S. et Hill, C. (2002).** Preservation and Fermentation: present and future. *Int. J. Food. Microbiol.* **79**: 3 – 16.

## S/

**Saïdi, n., (1998)** bactéries lactiques des laits d'Algérie: isolement, identification, caractéristiques technologiques. Mise en évidence de bactériocines et d'ADN plasmique. Thèse magister université d'Oran.

**Satura et Federighi (1998).** In Essai d'optimisation de la production d'acide lactique sur lactosérum par *Streptococcus thermophilus*. Mémoire de magister. Option biochimie et microbiologie appliquées. Université M'Hmed Bougara -Boumerdés

**Schleifer, K. H. and Ludwig, W. (1995).** Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria, p. 7-18. In B. J. B. Wood and W. H. Holzapfel (eds.), the lactic acid bacteria, vol.2: The genera of lactic acid bacteria. Blackie Academic and Professional, Glasgow.

**Schobitz et al (2003).** Effects of a bacteriocin-like inhibitory substance from *Carnobacterium piscicola* against human and salmon isolates of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol.***84**: 237-244.

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

## T/

**Thompson J., Gentry-Weeks C.R. (1994)** Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. Dans : Bactéries lactiques, Vol. I, p 239-290 (Editeurs : De Roissart H., Luquet

**Towmey D et al., (2002)** .in bacteries lactiques :physiologique , metabolisme,genomique et Applications Industrielles Edition : Economica .2009. P 100

**V/**

**Van Der Meer JR.et al .(1993)** .in bacteries lactiques : physiologique, metabolisme, genomique et applications industrielles edition : Economica .**2009**. p 100

**Van Wely Et al ,2001 ; Ruch et al. 2007.** In Les bactériocines des bactéries lactiques caractéristiques et intérêts pour la bio conservation des produits alimentaires. BASE.VOLUME 13.

**Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., DeVos, P., Kersters, K. and Swings, J. (1996).** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* **60**: 407.

**W/**

**Wijaya et al.(2006).** In Les bactériocines des bactéries lactiques caractéristiques et intérêts pour la bio conservation des produits alimentaires. BASE.VOLUME 13.

([http://www.institut\\_rossell-allemand.com/uploads/images/souches/lactobacillus\\_R52\\_big.jpg](http://www.institut_rossell-allemand.com/uploads/images/souches/lactobacillus_R52_big.jpg))

(<http://www.oocities.com/cheezyfr/photos/Leuconostoc.jpg>).

## LES ANNEXES

### Annexe 1 : milieux de culture

#### Composition du milieu M.R.S (Man Rogosa et Sharpe, 1960)

- Extrait de viande 10g
- Extrait de levure 5g
- Acétate de sodium: 5g inhibiteur
- Phosphate bipotassique 2g
- Citrates d'ammonium 2g
- sulfate de magnésium 0.25g
- Sulfate de manganèse 0.05g
- Glucose 20g
- Tween 80 1ml : agent sélectif
- Eau distillée 1000 ml
- pH 5.

#### Composition du milieu M17 (Terzaghi et Sandine,1975)

- Extrait de levure 2.5g
- Extrait de viande 5g
- Tryptone 2.5g
- Peptone papainique de soja 2.5g
- Peptone pepsique de viande 5g
- Peptone de caseine 10g
- Acide ascorbique 0.5g

-Lactose 5g

-Glycérophosphate de sodium 19g

-MgSO<sub>4</sub> 0.25g

-Agar-agar 15g

-Eau distillée 1000 ml

-pH 7.1

### **Composition du milieu M16 BCP (Thomas 1973)**

-Extrait de levure 2.5g

-Extrait de viande 5g

-Peptone papainique de Soja 5g

-Bipolytone 5g

-Acide ascorbique 0.5g

-Lactose 2g

-L'arginine 4g

-Pourpre de bromocrésol 0.05g

-Agar-agar 15g

-Eau distillée 1l

-pH6.8

### **Composition du milieu KMK**

-Poudre de lait écrémé 10g

-Bipolytone 2.5g

-Glucose 5g

-Agar-Agar 1.5g

-Eau distillée 1l

-Ph 6.6

Au moment d'utilisation on ajoute

-1ml de solution aqueuse de ferricyanure de potassium 10% (p/v)

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

Ces solutions sont stérilisées par filtration (Millipores 0.22um) et conservées à l'obscurité à

+ 4°C

**Composition de milieu esculine :**

-Extrait de viande

-peptone de viande

-Bile de bœuf

-Esculine

-Fer 3 citrate

-agar agar

64g/l autoclaver 15 min à 121°C pH 6,6 +/- 0,2 à 25°C

## **Annexe 2 : Coloration de Gram**

- 1- Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre
- 2- Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec la goutte d'eau, strier et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène
- 3- Couvrir le frottis par du cristal violet pendant 60 secondes
- 4- Laver l'excès du colorant avec de l'eau distillée
- 5- Couvrir de lugol pendant 30 secondes
- 6- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes
- 7- Rincer immédiatement le frottis avec le mélange alcool - acétone en inclinant la lame et par goutte à goutte jusqu'à disparition complète de la coloration violette
- 8- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes
- 9- Couvrir avec de la fuschine pendant 15 secondes
- 10- Laver à l'eau distillée pendant 10 secondes
  
- 11- Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope à un fort grossissement. Les cellules Gram+ absorbent la couleur du cristal violet et demeurent bleues violettes en apparence, contrairement aux cellules Gram- qui apparaissent distinctement rosâtres.

**Annexe 3 : Tableaux de mesure d'acidité et de la cinétique d'acidification**

**Tableau de mesure de la cinétique d'acidification**

1ml NaOH —————> 10 D° (degré dornique)

1 D° —————> 0.01% d'acide lactique

La souche	Le temps (heure)					
	0	2	4	6	18	24
	Acidité initial (D°)	Acidité (D°)	Acidité (D°)	Acidité (D°)	Acidité (D°)	
BL14	17	28	38	45	66	85
BL16	17	26	35	43	65	84
BL22	17	25	35	41	63	74

## Tableau de mesure de l'acidité

**1ml NaOH**  
**1 ° D**

**10 ° D (degre dornic)**  
**0,01% d'acide l'actique**

**Acidité initial: 17 ° D**

**F: fort**

**M: moins**

**Ph initial:**

**Fa: faible**

	mesure de l'acidité			$\Delta A$	$\Delta A - A_i$	classement des souches	acide lactique %
	1	2	3				
BL 2	46	48	50	<b>48,00</b>	<b>31,00</b>	BL 14	<b>0,31</b>
BL3	50	54	54	<b>52,67</b>	<b>35,67</b>	BL 22	<b>0,36</b>
BL 5	55	64	67	<b>62,00</b>	<b>45,00</b>	BL 16	<b>0,45</b>
BL 6	60	60	60	<b>60,00</b>	<b>43,00</b>	BL 5	<b>0,43</b>
BL 7	60	57	59	<b>58,67</b>	<b>41,67</b>	BL 21	<b>0,42</b>
BL 8	57	48	54	<b>53,00</b>	<b>36,00</b>	BL 6	<b>0,36</b>
BL 9	45	47	49	<b>47,00</b>	<b>30,00</b>	BL19	<b>0,30</b>
BL 13	54	50	50	<b>51,33</b>	<b>34,33</b>	BL7	<b>0,34</b>
BL 14	67	68	65	<b>66,67</b>	<b>49,67</b>	BL15	<b>0,50</b>
BL 15	60	58	56	<b>58,00</b>	<b>41,00</b>	BL8	<b>0,41</b>
BL 16	67	63	66	<b>65,33</b>	<b>48,33</b>	BL3	<b>0,48</b>
BL 18	33	35	36	<b>34,67</b>	<b>17,67</b>	BL2	<b>0,18</b>
BL 19	63	57	57	<b>59,00</b>	<b>42,00</b>	BL13	<b>0,42</b>
BL 20	63	61	60	<b>61,33</b>	<b>44,33</b>	BL20	<b>0,44</b>
BL 21	53	47	49	<b>49,67</b>	<b>32,67</b>	BL9	<b>0,33</b>
BL 22	55	70	71	<b>65,33</b>	<b>48,33</b>	BL10	<b>0,48</b>
BL 1	31,5	30	27	<b>29,50</b>	<b>12,50</b>	BL18	<b>0,13</b>
BL 4	35	33	34	<b>34,00</b>	<b>17,00</b>	BL4	<b>0,17</b>
BL 10	34	35	37	<b>35,33</b>	<b>18,33</b>	BL12	<b>0,18</b>
BL 11	33	31,5	30	<b>31,50</b>	<b>14,50</b>	BL17	<b>0,15</b>
BL 12	35	31	33	<b>33,00</b>	<b>16,00</b>	BL11	<b>0,16</b>
BL 17	32	32,5	32	<b>32,17</b>	<b>15,17</b>	BL1	<b>0,15</b>

**Annexe 4:** tableau des caractères biochimiques et physiologiques des souches de lactobacillus ayant une activité antimicrobienne isolées à partir de lait cru de vache .collection des lactobacillus de laboratoire de microbiologie appliquée université d'Oran Algérie (Mami. 2010)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	55	+	-	-	+/+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	55*	+	-	-	-/	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	2	+	-	-	-/+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	22	+	-	-	-/+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i>	31	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	54	+	-	-	+/+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	52	+	-	-	+/+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>Lactobacillus fermentum</i>	7	+	-	+	-/+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	68	+	-	-	+/+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	58	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lactobacillus casei</i>	13	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+

1= Strains code, 2 = Gram, 3 = Catalase, 4 = Arginine, 5 = Growth 15/45, 6 = Production Of gaz, 7 = Acétones, 8 = Esculine, 9 = Galactose, 10 = Fructose, 11 = Arabinose, 12 = Raffinose, 13 = Mannose, 14 = Mannitol, 15 = Maltose, 16 = Xylose, 17 = Cellobiose, 18 = Sucrose, 19 = Ribose, 20 = Saccharose, 21 = Mélibiose, 22 = Sorbitol, 23 = Glucose, 24 = Lactose

## المخلص

في هذا العمل قمنا بحساب وتعريف ببكتيريا لبنية معزولة من حليب غير طازج للأبقار والنعجة تنتمي إلى مزرعة توجد بنواحي تلمسان. إن العدد المتوسط الذي تحصلنا عليه يتراوح من  $10^7 * 10,4$  إلى  $10^7 * 16,8$  UFC/ml أما بالنسبة لحليب النعجة فيقدر ب  $10^8 * 10,9$  UFC/ml أما العدد المتوسط لبكتيريا الضارة بالنسبة للنعجة  $10^7 * 3,9$  UFC/ml وللأبقار  $10^7 * 7$  UFC/ml. من بين 22 سلالة تم تنقية وتعريف خمسة أجناس هي: (9) Lactobacillus, (5) Lactococcus, (1) Streptococcus, (2) Pediococcus, (4) Leuconostoc. سمحت لنا دراسة الخصائص البيوكيميائية والفيزيولوجيا بتعريف وترتيب أنواع مختلفة. سلالات تقوم بإنتاج العطر وهي: (Lactococcus lactis) (Lactobacillus paracasei subsp paracasei, Lactobacillus sp) deux Lactococcus (Lactococcus lactis subsp lactis biovar diacetylactis, Lactococcus lactis subsp cremoris) et deux Pediococcus (Pediococcus pentosaceus, Pediococcus dextrinicus). البحث عن ببكتيريا لبنية المنتجة ل (bactériocine) بطريقة diffusion en puits باستعمال *E.Coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 أظهرت عدم وجود أي نتيجة موجبة لكل السلالات المدروسة.

**Mots clés:** lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus, Bactériocines, ببكتيريا لبنية, حليب طازج

## Résumé

Le dénombrement de la flore mésophile aérobie totale de laits cru de vache et de brebis de la région de Tlemcen a révélé une charge variant entre  $7 \times 10^7$  UFC/ml pour le lait de vache et  $3,9 \times 10^7$  UFC/ml pour le lait de brebis. Le dénombrement des bactéries lactiques dans ces mêmes laits a montré que le nombre moyen des bactéries lactiques varie de  $1,04 \times 10^8$  à  $1,68 \times 10^8$  UFC/ml dans le lait de vache, tandis que dans le lait de brebis, il est en moyenne de  $1,09 \times 10^9$  UFC/ml.

A partir des dénombrements des bactéries lactiques, une collection de 22 souches isolées et purifiées a été mise au point. Cinq (05) genres ont pu être identifiés : lactobacillus comprenant 9 souches, Lactococcus : 5 souches, Leuconostoc : 4 souches, Pediococcus : 2 souches et enfin Streptococcus avec une souche isolée.

L'étude de caractéristiques biochimiques et physiologiques a permis d'identifier six souches présentant une forte production de diacétyle dont deux lactobacilles (*Lactobacillus paracasei subsp paracasei*, *Lactobacillus sp*) deux Lactococcus (*Lactococcus lactis subsp lactis biovar diacetylactis*, *Lactococcus lactis subsp cremoris*) et deux Pediococcus (*Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus dextrinicus*). La recherche des bactéries lactiques productrices de bactériocines par la méthode de diffusion en puits en utilisant quatre souches de référence *E.coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a donné des résultats négatifs pour toutes les souches étudiées.

**Mots clés:** lait cru, bactérie lactique, lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus, bactériocines

## Abstract

Enumeration and identification of lactic acid bacteria isolated from raw cow's milk and sheep belonging to a farm in the region of Tlemcen shows that the average number of lactic acid bacteria range from  $10.4 \times 10^7$  to  $16.8 \times 10^7$  UFC / ml. While the number of colonies in sheep milk is on average  $10.9 \times 10^8$  CFU / ml. For the total flora the number is between  $3.9 \times 10^7$  CFU / ml for sheep and  $7.1 \times 10^7$  CFU / ml for cow's milk. A collection of 22 strains isolated and purified was put to point five genera were identified: Lactobacillus (9), Lactococcus (5), Leuconostoc (4), Pediococcus (2) and Streptococcus (1). The study of biochemical and physiological characteristics were identified and classified into different species. Six strains with high production of diacetyl two lactobacilli (*Lactobacillus paracasei subsp paracasei*, *Lactobacillus sp*) two Lactococcus (*Lactococcus lactis subsp lactis biovar diacetylactis*, *Lactococcus lactis subsp cremoris*) and two Pediococcus (*Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus dextrinicus*). Research of lactic acid bacteria producing bacteriocins by well diffusion method using four reference strains *E. coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus cereus* ATCC 11778 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 gave negative results for all strains studied.

**Keywords:** raw milk, lactic acid bacteria, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus, Bacteriocins