

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Jijel

Faculté des Sciences Exactes et des  
Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie Cellulaire et  
Moléculaire



جامعة جيجل

كلية العلوم الدقيقة وعلوم الطبيعة والحياة

قسم البيولوجيا الجزيئية والخلوية

Mémoire de Fin d'Etudes pour l'Obtention du Diplôme de  
Master II en Biologie

Option : *Microbiologie Appliquée*

Thème :

Screening de souches bactériocinogènes de  
*Lactobacillus* isolées à partir de selles  
d'enfants

Membres du Jury :

Présidente : Dr. Laggoune S.

Encadreur : Mme Bousdira F.

Examinatrice : Mme Azzouz W.

Réalisé par :

Benhadji Ilhem

Charef Meryem

## *Remerciements*

*Tout d'abord, nous remercions Allah tout puissant de nous avoir donné la force, la patience et la volonté pour accomplir ce travail.*

*Nous exprimons nos remerciements les plus sincères à Mme **Bousdira Fathia** chargé de notre encadrement. Nous tenons à la remercier vivement pour sa patience durant ce travail, pour son soutien lors des moments difficiles pour faire évoluer ce projet. Nous la remercions encore pour son encadrement, sa disponibilité, sa pédagogie, ses compétences, sa modestie et son aide précieuse tout au long de ce projet.*

*Nous adressons également nos s'insères remerciements aux membres de jury **Dr. Laggoune. S** et **Mme Azzouz. W** qui ont accepté d'évaluer notre travail.*

*Nos remerciements vont également à **Dr Idoui. T** pour nous avoir aidé dans le laboratoire durant ce travail.*

*Nous adressons nos remerciements à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à notre formation.*

# Sommaire

|                            |   |
|----------------------------|---|
| Introduction générale..... | 1 |
|----------------------------|---|

## Synthèse bibliographique

### Chapitre I : Les bactéries lactiques

|  |   |
|--|---|
| I. Définition et généralité.....                                 | 2 |
| I.1. Classification des bactéries lactiques.....                 | 2 |
| I.2. Le genre <i>Lactobacillus</i> .....                         | 3 |
| I.2.1. Caractères généraux.....                                  | 3 |
| I.2.2. Habitat.....  | 5 |
| I.2.3. Identification .....                                      | 5 |
| I.3. intérêt des <i>Lactobacillus</i> .....                      | 5 |
| I.3.1. <i>Lactobacillus</i> dans les produits alimentaires ..... | 5 |
| I.3.2. Les Lactobacilles dans la santé.....                      | 5 |
| I.4. Les <i>Lactobacillus</i> en tant que probiotiques .....     | 5 |
| I.4.1. Définition des probiotiques.....                          | 5 |
| I.4.2. Critères de choix des probiotiques.....                   | 6 |
| I.4.3. Mécanisme d'action des probiotiques.....                  | 6 |

### Chapitre II : Les bactériocines

|  |    |
|--|----|
| II.1. Historique.....  | 7  |
| II.2. Définition des bactériocines .....   | 7  |
| II.3. Bactériocines des bactéries Gram-positives .....                               | 7  |
| II.4. Nomenclature et classification des bactériocines des bactéries lactiques ..... | 8  |
| II.4.1. Nomenclature des bactériocines des bactéries lactiques .....                 | 8  |
| II.4.2. Classification des bactériocines des bactéries lactiques.....                | 8  |
| II.4.2.1. Classe I : antibiotiques ou bactériocines modifiées.....                   | 8  |
| II.4.2.2. Classe II : peptides courts, thermiquement stables et non modifiés.....    | 9  |
| II.4.2.3. Classe III : protéines de taille importante (> 30kDa) thermosensibles..... | 10 |
| II.4.2.4. Classe VI : bactériocines complexes.....                                   | 10 |

|  |    |
|--|----|
| II.5.La biosynthèse des bactériocines.....                               | 10 |
| II.6.Les mécanismes d'action des bactériocines.....                      | 12 |
| II.7. La production et le conditionnement des bactériocines.....         | 13 |
| II.7.1 la production des bactériocines.....                              | 13 |
| II.7.2.Le conditionnement des bactériocines.....                         | 14 |
| II.8.Les différentes applications des bactériocines.....                 | 14 |
| II.8.1.L'application des bactériocines dans les aliments .....           | 15 |
| II.8.2.L'application probiotique des bactériocines.....                  | 16 |
| II.8.3.L'application des bactériocines dans le secteur de la santé ..... | 16 |
| II.9.Limite d'utilisation des bactériocines .....                        | 16 |

## **Etude expérimentale**

### I. Matériel et méthodes

|  |    |
|--|----|
| I.1. Matériel .....  | 18 |
| I.1.1. Matériel biologiques.....                               | 18 |
| I.1.1.1. Les selles d'enfants.....                             | 18 |
| I.1.1.2.Les souches bactériennes indicatrices.....             | 18 |
| I.1.2.Milieus de cultures .....                                | 19 |
| I.1.3.Réactifs.....  | 19 |
| I.1.4.Matériel et appareillages .....                          | 19 |
| I.2.Méthodes .....   | 20 |
| I.2.1.Analyse des échantillons et technique des dilutions..... | 20 |
| I.2.1.1.Analyse des échantillons .....                         | 20 |
| I.2.1.2.Techniques des dilutions .....                         | 20 |
| I.2.2. Isolement et purification.....                          | 20 |
| I.2.2.1.Enrichissement .....                                   | 20 |
| I.2.2.2 Isolement .....  | 20 |
| I.2.2.3.Purification .....                                     | 21 |
| I.2.3.Identification des souches de <i>Lactobacillus</i> ..... | 21 |
| I.2.3.1.Etude des caractères morphologiques .....              | 21 |

|  |    |
|--|----|
| I.2.3.2. Tests biochimiques .....  | 21 |
| a. Recherche de la catalase.....   | 21 |
| b. Recherche du type fermentaire .....   | 22 |
| c. Profil de fermentation des sucres .....   | 22 |
| d. Recherche de l'activité arginine dihydrolase ADH .....  | 22 |
| I.2.3.3. Test physiologique .....  | 22 |
| a. Température de croissance.....  | 22 |
| I.2.4. Pouvoir antagoniste des souches .....   | 23 |
| I.2.5. Étude de l'activité bactériocinogène.....   | 23 |
| I.2.5.1. Préparation du surnageant .....   | 23 |
| I.2.5.2. Détermination de l'activité bactériocinogène du surnageant .....                                      | 24 |
| I.2.6. Caractérisation des extraits bactériocinogènes .....  | 24 |
| I.2.6.1. Détermination du pH optimum d'action des surnageants neutralisés et traités par catalase (SNTC) ..... | 24 |
| I.2.6.2. Thermorésistance des SNTC.....  | 25 |
| I.2.6.3. Effet des enzymes protéolytiques sur le SNTC.....   | 25 |
| I.2.6.4. Sensibilité au stockage du SNTC.....  | 25 |
| <br>   |    |
| I. Résultats et discussion   |    |
| I.1. Mesure du pH .....  | 26 |
| I.2. Isolement des souches de <i>Lactobacillus</i> .....   | 26 |
| I.3. Identification .....  | 26 |
| I.3.1. Étude des caractères morphologiques.....  | 26 |
| I.3.1.1 Examen macroscopique.....  | 26 |
| I.3.1.2. Examen microscopique .....  | 27 |
| I.3.2. Tests biochimiques.....   | 27 |
| I.3.2.1. Recherche de la catalase.....   | 27 |
| I.3.2.2. Recherche du type fermentaire.....  | 27 |
| I.3.2.3. Profil fermentaire des sucres .....   | 28 |
| I.3.2.4. Recherche de l'activité de l'arginine dihydrolase (ADH) .....   | 28 |
| I.3.3. Test physiologique .....  | 29 |
| I.3.3.1. Croissance à différentes température .....  | 29 |

|  |           |
|--|-----------|
| I.3.4. Identification des espèces.....   | 31        |
| I.4. Activité antibactérienne.....   | 33        |
| I.5. Détermination de l'activité bactériocinogène .....  | 35        |
| I.6. Caractérisation de l'extrait bactériocinogène .....   | 38        |
| I.6.1. Détermination du pH optimum d'action des surnageants neutralisés et traités par catalase (SNTC) ..... | 38        |
| I.6.2. Thermorésistance des surnageants neutralisés et traités par catalase (SNTC) .....                     | 39        |
| I.6.3. Effet des enzymes sur l'activité antimicrobienne des surnageants.....                                 | 44        |
| I.6.4. Effet du stockage sur l'activité bactériocinogène des surnageants .....                               | 46        |
| Conclusion .....   | 48        |
| <b>Références bibliographiques.....</b>  | <b>49</b> |

## **Annexes**

## Liste des abréviations

**%** : pourcentage

**°C** : degré celcius

**µl**: microlitre

**ADH** : Arginine DiHydrolase

**ADN** : Acide DéoxyriboNucléique

**ADNr** : ADN ribosomal

**API**: Analytic Programme Index

**ARN**: AcideRiboNucléique

**ARNr**: ARN ribosomal

**ATP**: Adénosine Triphosphate

**BAL** : les bactéries lactiques

**CO<sub>2</sub>**: dioxyde de carbone

**OMS**: Organisation Mondiale de la Santé

**g, mg**: gramme, milligramme

**GAM**: Gibson & Abd El Malek

**G+C**: Guanine + Cytosine

**GN** : Gélose nutritive

**GRAS**: Generally Regarded As Safe

**h** :heure

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : peroxyde d'hydrogène (Eau oxygénée)

**HCl** : Acide chlorhydrique

**Lb**: *Lactobacillus*

**MEVAG** : Milieu d'Etude de la Voie d'Attaque des Glucides.

**min** : minute

**ml**: millilitre

**mm** : millimetre

**MRS**: Man Rogosa et Sharpe

**N** : Normalité

**NaOH** : Sodium hydroxide

**pH** : potentiel Hydrogène

**rpm**: rotation par minute

**S** : Souche

**SD** : Stimulation Douloureuse à un niveau constant ou absente

**SI** : Souche indicatrices

**SNTC** : surnageant neutralisés et traités par catalase

**ST** : souche test

**T°**: Température

**Zi** : Zone d'inhibition



# Liste des tableaux

|   |    |
|---|----|
| <b>Tableau (1)</b> : les différents genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques.....  | 3  |
| <b>Tableau (2)</b> : Caractéristiques des trois groupes de <i>Lactobacillus</i> .....   | 4  |
| <b>Tableau (3)</b> : Rôle des protéines impliquées dans la biosynthèse d'une bactériocine.....  | 10 |
| <b>Tableau (4)</b> : Souches bactériennes indicatrices utilisées au cours de ce travail.....  | 18 |
| <b>Tableau (5)</b> : Les valeurs du pH des différents échantillons.....   | 26 |
| <b>Tableau (6)</b> : Les principaux caractères des souches sélectionnées.....   | 30 |
| <b>Tableau (7)</b> : Le nom scientifique des espèces identifiées.....   | 31 |
| <b>Tableau (8)</b> : les résultats de l'antagonisme microbien <i>Lactobacillus</i> contre <i>Lactobacillus</i> .....  | 33 |
| <b>Tableau (9)</b> : les résultats de l'antagonisme bactérien entre les souches de <i>Lactobacillus</i> isolées et les germes tests.....  | 34 |
| <b>Tableau (10)</b> : Activité antimicrobienne des surnageants neutralisés et traités par catalase vis à vis de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> et <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline.....                  | 36 |
| <b>Tableau (11)</b> : Activité bactériocinogène des surnageants neutralisés et traités par catalase vis-à-vis des germes Gram négatif <i>Klebsiella</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> pathogène et <i>Listeria monocytogenes</i> ..... | 37 |
| <b>Tableau (12)</b> : L'effet du pH sur les souches de <i>Bacillus subtilis</i> et <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline.....  | 38 |
| <b>Tableau (13)</b> : Effet de température (en mm) sur le SNTC testés sur le <i>Bacillus subtilis</i> et <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline (zones d'inhibition en mm).....   | 41 |
| <b>Tableau (14)</b> : Effet des enzymes sur les SNCT de nos souches testés sur <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline.....  | 44 |
| <b>Tableau (15)</b> : Effet du stockage à différentes température sur l'activité antimicrobienne des SNTC testés sur SARM.....  | 46 |

# Liste des figures

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure (1)</b> : Séquence et structure de lantibiotiques de type A (nisin) et B (mersacidin) et d'un lantibiotiquea deux peptides (lacticin).....  | 9  |
| <b>Figure (2)</b> : Vue schématique d'un possible système d'une production de bactériocine.....   | 11 |
| <b>Figure (3)</b> : Mode d'action des bactériocines des bactéries lactiques.....  | 13 |
| <b>Figure (4)</b> : Vue d'ensemble des applications potentielles des bactériocines.....   | 15 |
| <b>Figure (5)</b> : Aspect macroscopique des colonies d'une souche de <i>Lactobacillus</i> (B13) isolée et purifiée.....  | 26 |
| <b>Figure (6)</b> : Aspect microscopique d'une souche (B13) de <i>Lactobacillus</i> isolée et purifié (Coloration de Gram, grossissement 100).....  | 27 |
| <b>Figure (7)</b> : La répartition en pourcentage des espèces de <i>Lactobacillus</i> identifiées.....  | 32 |
| <b>Figure (8)</b> : Résultat de l'activité antagonistique des souches de <i>Lactobacillus</i> vis-à-vis <i>Bacillus subtilis</i> .....  | 35 |
| <b>Figure (9)</b> : Activité inhibitrice des surnageants neutralisés et traités par catalase vis-à-vis des souches indicatrices ( <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , SARM).....  | 36 |
| <b>Figure (10)</b> : Mesure de l'activité inhibitrice des <i>Lactobacillus</i> vis-à-vis des souches indicatrices ( <i>Klebsiella</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> )..... | 37 |
| <b>Figure (11)</b> : L'activité résiduelle des SNTC soumis à différents pH sur les souches de <i>Bacillus subtilis</i> et <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline.....                                       | 39 |
| <b>Figure (12)</b> : Effet du pH sur l'activité des surnageants neutralisés et traités par catalase sur une souche de <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline (pH 6).....                                    | 39 |
| <b>Figure (13)</b> : L'activité résiduelle des SNTC soumis à différentes températures sur <i>Bacillus subtilis</i> .....  | 42 |
| <b>Figure (14)</b> : L'activité résiduelle des SNTC, soumis à différentes températures sur SARM.....  | 43 |
| <b>Figure (15)</b> : L'activité résiduelle du SNTC sur <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline après traitement par chaleur (80°C pendant 60 min).....   | 44 |
| <b>Figure (16)</b> : L'activité résiduelle des surnageants neutralisés et traités par les enzymes.....  | 45 |
| <b>Figure (17)</b> : Effet du stockage à différentes températures sur l'activité antimicrobienne des SNTC testés sur SARM.....  | 46 |
| <b>Figure (18)</b> : Effet du stockage à différentes températures sur l'activité antimicrobienne des SNTC testés de la souche A20 sur SARM.....   | 47 |

# Introduction

## générale

Parmi les propriétés métaboliques, à intérêt technologique, attribuées aux *Lactobacillus*, la production de bactériocines, substances antagonistes de germes indésirables ou pathogènes (**Karam et al., 2008**) est importante car ces antimicrobiens pourraient être une alternative aux conservateurs chimiques en industrie alimentaire (**Lachance, 2000**).

En effet, ces molécules de nature protéique et de faible poids moléculaires, dirigées contre des espèces homologues ou plus éloignées, sont l'objet d'une attention particulière depuis une dizaine d'années en raison de l'intérêt tant fondamental qu'appliqué qu'elles suscitent (**Dacosta, 2000; Morisset, 2003**).

Une des méthodes alternatives proposées pour réduire, à long terme, l'utilisation des antibiotiques pour les traitements de maladies infectieuses, tant chez l'homme que chez l'animal, fait appel à la capacité de certaines bactéries à produire ces bactériocines. Récemment, des évidences ont clairement démontré le potentiel de certaines souches de *Lactobacillus* productrices de bactériocines pour la prévention de certains types d'infections bactérienne chez l'humain ; tels que les diarrhées infectieuses chez l'enfant et les infections vaginales chez la femme (**Izquierdo, 2009**).

Représentatifs de la flore intestinale de l'homme, les *Lactobacillus* sont parmi les microorganismes les plus en vue en tant que probiotiques (**Izquierdo, 2009**). Le caractère bactériocinogène est l'un des critères de choix de ces bactéries bénéfiques sur la santé de l'homme. Selon l'OMS, (2001):« les probiotiques sont des micro-organismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate, confèrent un bénéfice pour la santé de l'hôte au-delà de l'effet nutritionnel premier ».

En Algérie, il n'existe pas d'études sur les *Lactobacillus* à caractères probiotiques d'origine humaine, ni sur leur pouvoir bactériocinogène.

Considérant le fort potentiel des *Lactobacillus* à produire des bactériocines à intérêt alimentaire, pharmaceutique et même biotechnologique, nous avons réalisé ce travail ayant pour objectifs :

- D'isoler et identifier des souches de *Lactobacillus* à partir de selles d'enfants.
- De tester le pouvoir bactériocinogène de nos souches locales de *Lactobacillus*.
- De caractériser l'extrait bactériocinogène vis-à-vis de la température, pH, stockage et la digestion par les enzymes.

**Synthèse**

**bibliographique**

# Chapitre I

## Bactéries lactiques

## I. Définition et généralité :

Le groupe des bactéries lactiques ou bactéries de l'acide lactique (BAL) a été défini par ORLA-JENSEN en 1919 (**Leveau et Bouix, 1993**), il s'agit d'un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme (**Dortu, 2008**).

Regroupant des germes très différents, les bactéries de la flore lactique peuvent être aussi bien des coques (appartenant aux genres: *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* et *Leuconostoc*) que des bacilles (appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Carnobacterium*) (**Morisset, 2003**).

Ils sont Gram positifs, généralement immobiles, asporulés, anaérobies mais aérotolérants (**Diop, 2008**), Elles sont non pigmentées et ne possèdent ni catalase (certaines possèdent une pseudocatalase), ni nitrate réductase, ni cytochrome oxydase (**Dortu, 2008**).

Les bactéries lactiques sont incapables de réaliser une respiration, toute leur énergie provient de la fermentation (**Morisset, 2003**). Ainsi la fermentation est dite : homolactique si l'acide lactique est pratiquement le seul produit formé et hétérolactique si d'autres composés sont aussi présents : acide acétique, éthanol, CO<sub>2</sub>... Selon le mode de fermentation obligatoire ou préférentiel, on parle de bactéries homofermentaires ou hétérofermentaires (**Leveau et Bouix, 1993**).

Les bactéries lactiques possèdent un statut GRAS (Generally Recognized As Safe) qui autorise officiellement leur usage dans les applications alimentaires et qui témoigne de leur parfaite innocuité. Elles sont utilisées pour la préservation des aliments ainsi que pour l'amélioration de leurs qualités structurelles et organoleptiques (**Rigaux, 2008**).

### I.1. Classification des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques typiques ont une teneur en G + C inférieure à 50%, ils appartiennent à l'embranchement des *Clostridium* exception du genre *Bifidobacterium* qui, d'un point de vue physiologique, fait partie des bactéries lactiques, mais appartient à la branche des Actinomycètes (**Ouadghiri, 2009**).

Actuellement, les bactéries lactiques regroupent treize genres bactériens différents: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* (**Dortu et Thonart, 2009**). Le **tableau 1** résume les principales caractéristiques de ces genres (**Pilet et al., 1998**).

**Tableau(1) : Les différents genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques. (Pilet et al., 1998)**

| Genre                  | Morphologie       | Fermentation                                | Température optimale             |
|------------------------|-------------------|---|----------------------------------|
| <i>Lactobacillus</i>   | bacilles          | homofermentaires<br>ou<br>hétérofermentaire | thermophiles<br>ou<br>mésophiles |
| <i>Carnobacterium</i>  | bacilles          | hétérofermentaire                           | psychrotrophes                   |
| <i>Lactococcus</i>     | coques            | homofermentaires                            | mésophiles                       |
| <i>Streptococcus</i>   | coques            | homofermentaires                            | mésophiles<br>ou<br>thermophiles |
| <i>Enterococcus</i>    | coques            | homofermentaires                            | mésophiles                       |
| <i>Vagococcus</i>      | coques mobiles    | homofermentaires                            | mésophiles                       |
| <i>Pediococcus</i>     | coque en tétrades | homofermentaires                            | mésophiles                       |
| <i>Tetragenococcus</i> | coque en tétrades | homofermentaires                            | mésophiles                       |
| <i>Leuconostoc</i>     | coques            | hétérofermentaire                           | mésophiles                       |
| <i>Oenococcus</i>      | coques            | hétérofermentaire                           | mésophiles                       |
| <i>Bifidobacterium</i> | forme irrégulière | acide acétique et lactique                  | Mésophiles                       |

## I.2. Le genre *Lactobacillus*

### I.2.1. Caractères généraux

Au sein des bactéries lactiques, les lactobacilles forment un ensemble très disparate. (Tailliez, 2004). Ils appartiennent au groupe des *Firmicutes*, à la classe des *Bacilli*, à l'ordre des *Lactobacillales* et à la famille des *Lactobacillaceae* (Saad, 2010). Le genre *Lactobacillus* a été créé par Beijerinck en 1901 (Pot, 2008).



Ces bactéries se présentent sous forme de bacilles longs et fins (parfois incurvés) allant de 0,5 - 1,2 à 1 -10  $\mu\text{m}$  mais sous certaines conditions de croissance elles peuvent prendre une forme de coccobacilles, qui forment fréquemment des chaînes. Elles sont de formes régulières, non pigmentées, non sporulantes et non mobiles (Givry, 2006). Ils sont généralement facultatifs ou microaérophiles, donnent de l'acide lactique comme produit de fermentation unique ou majeur. De plus ces microorganismes sont auxotrophes avec de fortes exigences en facteurs de croissance tels que des glucides, des acides aminés, des dérivés d'acides nucléiques, des sels et des vitamines (Prescott *et al.*, 2003 ;Saad, 2010).

Le milieu le plus adaptés à leur culture est le milieu Man, Rogosa et Sharpe, MRS. Sur ce milieu, les colonies se développent en 24-48 heures, sont incolores ou blanchâtres et crémeuses ou granuleuses (Tankovic, 2007).

Ils se développent mieux dans des conditions légèrement acide, quand le pH avoisine les 4.5 à 6.4. (Prescott *et al.*, 2003). La plupart des lactobacilles se multiplie dans une gamme de températures comprise entre 15 °C et 42 °C. Certaines souches de lactobacilles dites « thermophiles » restent viables à 55 °C (Tailliez, 2004).

Le métabolisme énergétique des *Lactobacillus* est exclusivement fermentaire. Ce genre classiquement divisé en trois sous genres : *Thermobacterium*, *Streptobacterium* et *Betabacterium*. Cette séparation est basée sur des différences au niveau des voies de fermentation (Tableau 2) (Tankovic, 2007).

Des travaux plus récents de biologie moléculaire ont individualisé trois groupes A, B et C. Ceux-ci ne correspondent pas complètement aux trois groupes décrits précédemment.

La biologie moléculaire a aussi permis de mieux appréhender la grande diversité de ce genre bactérien. C'est ainsi que J-P. Euzéby recensa 134 espèces en octobre 2006 sur son site Internet : LSPN (*List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature*) (Tankovic, 2007).

**Tableau(2) :** Caractéristiques des trois groupes de *Lactobacillus* (Tankovic, 2007).

| Caractéristiques                       | Sous-genre  |  |   |
|--|---|--|---|
|  | <i>Thermobacterium</i>  | <i>Streptobacterium</i>  | <i>Betabacterium</i>  |
| Voie fermentaire                       | Homofermentaire stricte   | Hétérofermentaire facultative  | Hétérofermentaire stricte   |
| Voie de fermentation du glucose        | Homofermentation  | Homofermentation   | Hétérofermentation  |
| Voie de fermentation des pentoses      | Non fermentés   | Hétérofermentation   | Hétérofermentation  |
| Production de gaz carbonique           | Non   | Oui pour les pentoses  | Oui   |
| Culture à 45°C                         | +   | -  | -   |
| Culture à 15°C                         | -   | +  | +   |
| Résistance naturelle aux glycopeptides | Non   | Oui  | Oui   |
| Principales espèces                    | <i>L. acidophilus</i><br><i>L. delbrueckii</i><br><i>L. gasseri</i><br><i>L. helveticus</i><br><i>L. jensenii</i> | <i>L. casei</i><br><i>L. curvatus</i><br><i>L. paracasei</i><br><i>L. plantarum</i><br><i>L. rhamnosus</i> | <i>L. brevis</i><br><i>L. cellobiosus</i><br><i>L. confusus</i><br><i>L. fermentum</i><br><i>L. reuteri</i> |

### **I.2.2.Habitat**

Les lactobacilles sont largement répandus dans la nature, essentiellement au niveau des végétaux, et on les retrouve donc naturellement dans les aliments.

On les retrouve aussi comme commensaux chez l'animal et l'homme, surtout au niveau de la partie supérieure du tractus digestif (cavité buccale, iléon) et du vagin (flore de Doderlein) (Tankovic, 2007).

### **I.2.3. Identification**

Le diagnostic d'espèce peut être difficile à faire par les méthodes biochimiques en raison du très grand nombre d'espèces existantes. Il repose essentiellement sur des tests de fermentation des sucres. La galerie API50CH avec l'utilisation du milieu pour lactobacilles est la méthode biochimique la plus utilisée et probablement la plus fiable (Tankovic, 2007).

L'utilisation des outils de taxonomie moléculaire comme l'hybridation quantitative ADN/ADN et les séquences des gènes d'ARNr 16S ont permis de lever des ambiguïtés et dénommer précisément les quelques espèces de lactobacilles d'intérêt en santé et en alimentation humaines parmi plus d'une centaine d'espèces de lactobacilles actuellement décrites (Tailliez, 2004).

## **I.3. Intérêt des *Lactobacillus***

### **I.3.1. *Lactobacillus* dans les produits alimentaires**

Les lactobacilles sont recherchés en technologie alimentaire pour leurs propriétés acidifiantes et leur pouvoir inhibiteur vis-à-vis des micro-organismes pathogènes ou d'altération.

Ils sont ajoutés comme ferments pour la fabrication des laits fermentés et des fromages. Les *Lactobacillus* mésophiles entrent dans la catégorie des bactéries d'affinage. Ils participent à l'élaboration de l'arôme et de la texture du produit exemple *L. plantarum*, *L. casei*, *L. acidophilus*. *L. rhamnosus* est recommandé pour l'affinage des fromages à faible taux de matières grasses.

Le yaourt est préparé par acidification du lait grâce à *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* en association avec *Streptococcus thermophilus*.

Les lactobacilles interviennent dans la fermentation lactique de nombreux végétaux. *L. plantarum*, *L. brevis* et *L. bavaricus* sont présents dans la choucroute ou les conserves d'olives vertes. L'ensilage est réalisé par *L. plantarum*. (Larpen et Larpen, 1997).

### **I.3.2.Les Lactobacilles dans la santé**

Un certain nombre d'effets bénéfiques sur la santé sont associés à l'utilisation des *Lactobacillus* probiotiques.

## **I.4.Les *Lactobacillus* en tant que probiotiques**

### **I.4.1.Définition des probiotiques**

Selon l'OMS, 2001, les probiotiques sont des micro-organismes vivants qui administrées en quantités adéquates, sont bénéfiques pour la santé de l'hôte. Ils peuvent être consommés comme un aliment ou comme alicament.

Les probiotiques sont classées en trois grands groupes (Klein *et al.*, 1998)

- Les bactéries lactiques constituées majoritairement par le genre *Lactobacillus*.
- Les levures exemple *Saccharomyces boulardii*.
- Autre bactéries exemple *Escherichia coli* et *Streptococcus thermophilus*.

Parmi les souches *Lactobacillus* utilisées comme probiotiques on cite : *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. reuteri*, *L. gasseri*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. crispatus*, *L. gallinarum*.

#### I.4.2. Critères de choix des probiotiques

Le choix des souches de micro-organismes utilisés comme probiotiques doit reposer sur des critères établis scientifiquement. Ces critères sont :

- Etre d'origine humaine s'ils sont destinés à l'alimentation humaine
- La résistance à l'acidité de l'estomac et la bile
- L'adhérence à la muqueuse intestinale ; l'effet probiotique serait maximal si les organismes adhéraient aux cellules muqueuses intestinales (Denis *et al.*, 2006)
- L'innocuité totale
- L'aptitude à rester viable sur le site cible et à être efficace devrait être vérifiée pour chaque souche potentiellement probiotique (OMS, 2001).
- Exercer un ou des effets démontrés sur la santé de l'hôte.

#### I.4.3. Mécanisme d'action des probiotiques

Les mécanismes d'action des probiotiques se résume comme suit :

- Stabilisation de la flore intestinale par compétition avec des bactéries pathogènes au niveau de la fixation aux récepteurs.
- Stimulation du système immunitaire intestinale de l'hôte
- Neutralisation de produits toxiques (ammoniac, amines et indoles) et diminution des biotransformations des sels biliaires et des acides gras en substances toxiques.
- Inhibition des germes pathogènes ou indésirables par production de métabolites tels que les acides organiques (diminution de pH), peroxyde d'hydrogène et production substances antibactérienne les bactériocines.

Compte tenu de ses différents modes d'action, le rôle bénéfique des *Lactobacillus* probiotiques dans la santé a été rapporté, par différentes études contrôlées, tels que la prévention et le traitement des diarrhées infectieuses et celles associées aux traitements antibiotiques, diminution du risque du cancer colorectal et des maladies inflammatoires de l'intestin, diminution du cholestérol, et prévention des infections respiratoires chez l'enfant (Izquierdo, 2009).

# Chapitre II

## Les bactériocines

## II. Bactériocines

### II.1. Historique

Depuis une dizaine d'années, les bactériocines des bactéries lactiques font l'objet d'une attention toute particulière en raison de l'intérêt tant fondamental qu'appliqué qu'elles suscitent (Morisset, 2003). En effet, les bactériocines de la flore lactique sont des substances antimicrobiennes qui empêchent la croissance des microorganismes pathogènes transmis par les aliments (*Listeria*, *Staphylococcus*,...) et celle des microorganismes de détérioration (Achemchem *et al.*, 2004).

Historiquement, Le premier prototype des bactériocines produites par les bactéries lactiques fût découvert en 1928 lorsque l'inhibition de la croissance de différentes bactéries lactiques par un métabolite produit par *Streptococcus lactis* fut observée (maintenant classifié comme *Lactococcus lactis*) (Dortu, 2008).

En 1933, Whitehead et ses collaborateurs isolèrent un composé à action antibiotique et démontrèrent que ce composé était de nature protéique. Cette protéine était la nisine (Lachance, 2000).

En 1951, Hirsch proposa l'utilisation de la nisine en tant qu'agent de conservation dans les aliments. Il avait démontré que l'utilisation de ferments producteurs de nisine pouvait prévenir la formation de gaz par *Clostridium*, un pathogène alimentaire (Lachance, 2000).

C'est finalement en 1953 que Jacob *et al.* donnèrent le terme de « bactériocine » à cette classe de substances antagonistes (Khaoua *et al.*, 1997; Dortu, 1998).

Ainsi, depuis 1928, date à laquelle fut découverte la nisine, un grand nombre de bactériocines ont été identifiées, surtout à partir de 1990, et la liste n'a de cesse de s'allonger (Dacosta, 2000; Leroi, 2009).

### II.2. Définition des bactériocines

Les bactériocines sont des substances antimicrobiennes de nature protéique (Tagg *et al.*, 1976) ou partiellement protéique (Cenatiempo *et al.*, 1996; Morisset, 2003) et dont l'activité inhibitrice est dirigée contre des espèces taxonomiquement proches du micro-organisme producteur (Tagg *et al.*, 1976; Naghmouchi, 2007; Izquierdo, 2009; Sivakumar *et al.*, 2010). Cette définition risque de changer puisqu'il est aujourd'hui admis que les bactériocines peuvent avoir un spectre plus large incluant des espèces qui ne sont pas proches sur le plan taxonomique du micro-organisme producteur (Lachance, 2000; Naghmouchi, 2007). Leur synthèse par voie ribosomique les différencie des antibiotiques de nature peptidique provenant de l'assemblage enzymatique d'acides aminés libres (Cenatiempo *et al.*, 1996; Morisset, 2003; Diop, 2008; Jasniewski, 2008; Izquierdo, 2009). La famille des bactériocines est très diverse en ce qui concerne la taille, le mode d'action, le mode de libération, le système de régulation de la production ou encore le mécanisme d'immunité du producteur (Izquierdo, 2009). Elle peut être divisée en 2 groupes principaux : les bactériocines produites par les bactéries Gram-négatives et celles produites par les bactéries Gram-positives (Dacosta, 2000; Morisset, 2003; Izquierdo, 2009).

### II.3. Bactériocines des bactéries Gram-positives

Les bactériocines des bactéries Gram-positives répertoriées actuellement dans la littérature sont plus nombreuses que celles des bactéries Gram-négatives, sans doute parce qu'elles ont été plus recherchées (Izquierdo, 2009). Ce sont des peptides ayant une activité bactériostatique ou bactéricide (Cenatiempo *et al.*, 1996; Dacosta, 2000; Naghmouchi, 2007;

Garry *et al.*, 2008) généralement d'une taille inférieure à 10 kDa, cationiques, amphiphiles, et agissent en perméabilisant la membrane des cellules cibles (Morisset, 2003; Naghmouchi, 2007 ; Diop, 2008; Izquierdo, 2009). Parmi ces bactériocines, celles produites par les BAL ont reçu un intérêt particulier en raison des possibilités qu'elles offrent d'applications potentielles comme bioconservateurs dans les industries alimentaires (Diop, 2008; Izquierdo, 2009). En raison de cet intérêt, le nombre de molécules décrites chez les BAL a augmenté de façon exponentielle au cours des vingt dernières années et des souches productrices ont été découvertes chez tous les genres de ce groupe. En plus de l'acidification, la production de bactériocines jouerait en effet un rôle important dans la capacité des BAL à conserver les aliments suite à une fermentation lactique (Izquierdo, 2009). Cette propriété antibactérienne est exploitée depuis longtemps par l'homme de façon consciente ou non (Jasniewski, 2008).

## II.4. Nomenclature et classification des bactériocines des bactéries lactiques

### II.4.1. Nomenclature des bactériocines des bactéries lactiques

La nomenclature des bactériocines est relativement simple. De la même manière que la terminaison "ase" est associée à la dénomination d'enzymes (Naghmouchi, 2007), le suffixe «cine» («cin» en anglais) est ajouté au nom du genre ou de l'espèce dont elles proviennent (Dacosta, 2000) afin de dénoter une activité bactériocinogène (Naghmouchi, 2007); par exemple, pediocine désigne des bactériocines de *Pediococcus*, sakacine des bactériocines de *Lactobacillus sake*. Lorsqu'on veut distinguer des bactériocines produites par plusieurs souches d'une même espèce, on ajoute parfois des lettres pour indiquer l'ordre d'ancienneté de leur découverte (par exemple, lactacin F serait chronologiquement la sixième bactériocine associée à *Lactobacillus acidophilus*), ou l'on précise la souche (par exemple, brévicine 37 pour la bactériocine produite par la souche B37 de *Lactobacillus brevis*) (Dacosta, 2000).

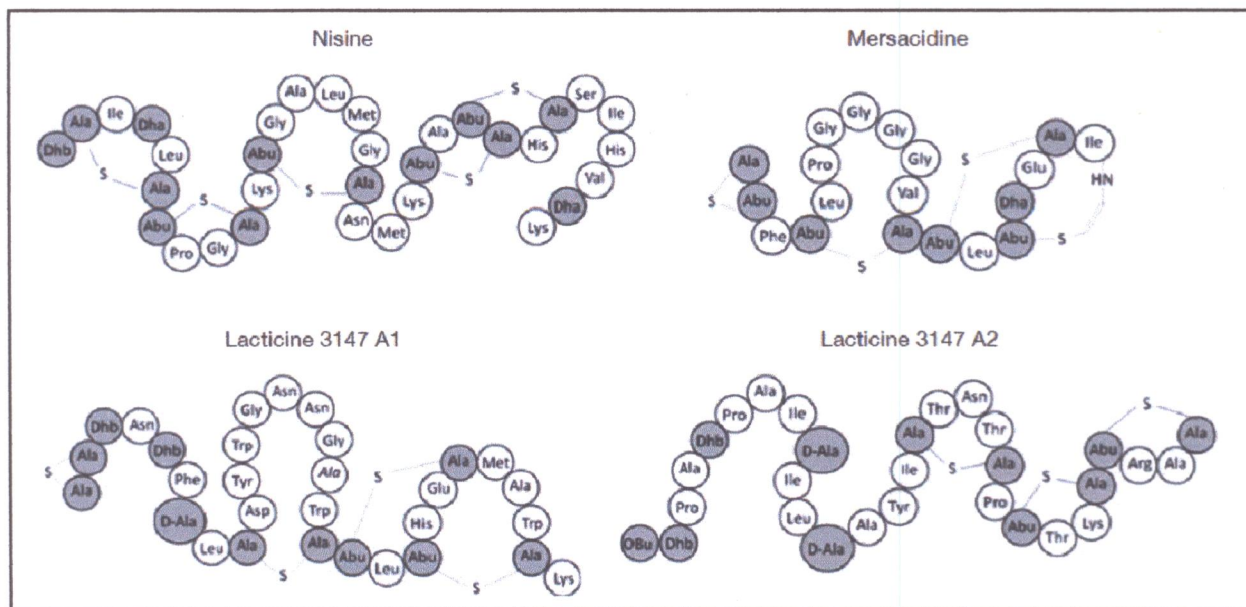
### II.4.2 Classification des bactériocines des bactéries lactiques

La majorité des bactériocines produites par des bactéries lactiques sont caractérisées par leur structure primaire, leur poids moléculaire et leur spectre d'action antimicrobien (Naghmouchi, 2007). Quatre classes de bactériocines produites par des bactéries lactiques ont pu être mises en évidence, cette classification est actuellement fondée sur la taille et le fait que les bactériocines font l'objet ou non de modifications post-traductionnelles (classification proposée par Klaenhammer en 1993, et révisée à la suite du 1<sup>ier</sup> symposium mondial sur les bactériocines de bactéries lactiques, tenu en avril 1995 à Banff, Canada) (Cenatiempo *et al.*, 1996).

#### II.4.2.1. Classe I : lantibiotiques ou bactériocines modifiées

Cette classe se trouve non seulement chez les BAL mais aussi chez de nombreuses autres bactéries à Gram positif (Cenatiempo *et al.*, 1996; Naghmouchi, 2007). Elle est composée de petites bactériocines nommées "lantibiotiques". Il s'agit de peptides de taille inférieure à 5kDa, stable à la chaleur (Lachance, 2000; Morisset, 2003; Diop, 2008; Jasniewski, 2008; Dortu et Thonart, 2009; Izquierdo, 2009) et qui se composent d'un nombre variable d'acides aminés dit inhabituels obtenus par modification post-traductionnelle (Morisset, 2003 ; Lachance, 2000). Ces acides aminés sont la lanthionine, la  $\beta$ -méthyllanthionine et des résidus déshydratés (déhydroalanine et déhydrobutyrine) (Cenatiempo *et al.*, 1996; Lachance, 2000; Naghmouchi, 2007; Dortu, 2008; Izquierdo, 2009). Cette classe est divisée en deux sous classe de type a et b: la classe Ia qui comprend des peptides cationiques hydrophobes allongés contenant jusqu'à 34 acides aminés et la classe Ib qui comprend les peptides globulaires chargés négativement ou sans

charge nette et contenant jusqu'à 19 acides aminés (Naghmouchi, 2007; Dortu et Thonart, 2009). Certains lantibiotiques sont par ailleurs constitués de deux peptides agissant ensemble pour avoir une activité comme la lacticine 3147 (Dortu et Thonart, 2009). Les séquences et structures d'un lantibiotique de chaque type se trouvent à la (Figure 1).



**Figure (1) :** Séquence et structure de lantibiotiques de type A (nisin) et B (mersacidin) et d'un lantibiotique à deux peptides (lacticine) (Izquierdo, 2009).

#### II.4.2.2. Classe II : peptides courts, thermiquement stables et non modifiés

Selon la classification de Klaenhammer (1993), la classe II comprend des peptides de taille inférieure à 10 kDa, thermostables, et qui contrairement aux lantibiotiques, ne contiennent pas d'acides aminés modifiés de manière post-traductionnelle (Lachance, 2000; Morisset, 2003; Naghmouchi, 2007; Jasniewski, 2008). Cette classe de bactériocines est la plus large et la plus diversifiée, ce qui a conduit à sa subdivision (Izquierdo, 2009) en trois sous-classes IIa, IIb et IIc (Morisset, 2003; Dortu, 2008). Les bactériocines de la sous-classe IIa contiennent entre 27 et 48 acides aminés et ont toutes une partie N-terminale hydrophobe contenant la séquence consensus YGNGV ainsi qu'un pont disulfure et une partie C-terminale moins conservée, hydrophobe ou amphiphile qui détermine la spécificité d'action (Dortu et Thonart, 2009). Elles ont toutes une action particulièrement importante contre le pathogène alimentaire *Listeria monocytogenes* (Naghmouchi, 2007; Jasniewski, 2008; Dortu et Thonart, 2009; Izquierdo, 2009). Certaines bactériocines de cette sous-classe contiennent également un deuxième pont disulfure dans leur domaine C-terminale qui semble être important dans la stabilisation de la structure tertiaire. Il semble par ailleurs qu'il leur conférerait une meilleure activité antimicrobienne, une meilleure résistance à l'exposition à des hautes températures et un spectre d'action plus large (Dortu et Thonart, 2009). La sous-classe IIb comprend les bactériocines ayant besoin de deux peptides pour avoir une activité. Deux types de bactériocines de classe IIb peuvent être distingués : le type E (*Enhancing*) où la fonction d'un des deux peptides est d'augmenter l'activité de l'autre et le type S (*Synergy*) où les deux peptides sont complémentaires. La sous-classe IIc contient les bactériocines ne pouvant pas être classées dans les autres sous-classes (Dortu et Thonart, 2009; Izquierdo, 2009).

### II.4.2.3. Classe III : protéines de taille importante (> 30kDa) thermosensibles

Les bactériocines de haut poids moléculaire (>30 kDa) et instables à haute température constituent la classe III (**Lachance, 2000; Naghmouchi, 2007; Jasniewski, 2008**). La structure et le mode d'action de ces bactériocines diffèrent complètement des autres bactériocines produites par les bactéries lactiques. Cette classe ne contient que quatre bactériocines : l'helveticin J produite par *Lactobacillus helveticus* A, l'enterolysin A produite par *Enterococcus faecium*, la zoocin A produite par *Spreptococcus zooepidemicus* et la millericin B produite par *Streptococcus milleri* (**Dortu et Thonart, 2009**).

### II.4.2.4. Classe VI : bactériocines complexes

Les bactériocines de classe IV sont des molécules peptidiques portant une (ou plusieurs) composante non protéique, lipidique et/ou oligosaccharidique, nécessaire à leur activité biologique (**Dacosta, 2000; Lachance, 2000; Morisset, 2003; Jasniewski, 2008**). En effet, cette classe a été ajoutée suite à l'observation de la perte d'activité de certaines bactériocines après leur incubation en présence d'enzymes dégradant les sucres et les lipides (**Lachance, 2000**). La plantaricine S, par exemple, possède une activité antibactérienne sensible à des enzymes lipolytiques et glycolytiques. Cependant, cette dernière classe présentée par Klaenhammer (1993) est contestée par Nes et collaborateurs (1996) puisque aucun de ces peptides n'a été co-purifié avec sa partie glucidique ou lipidique (**Morisset, 2003**).

## II.5. La biosynthèse des bactériocines

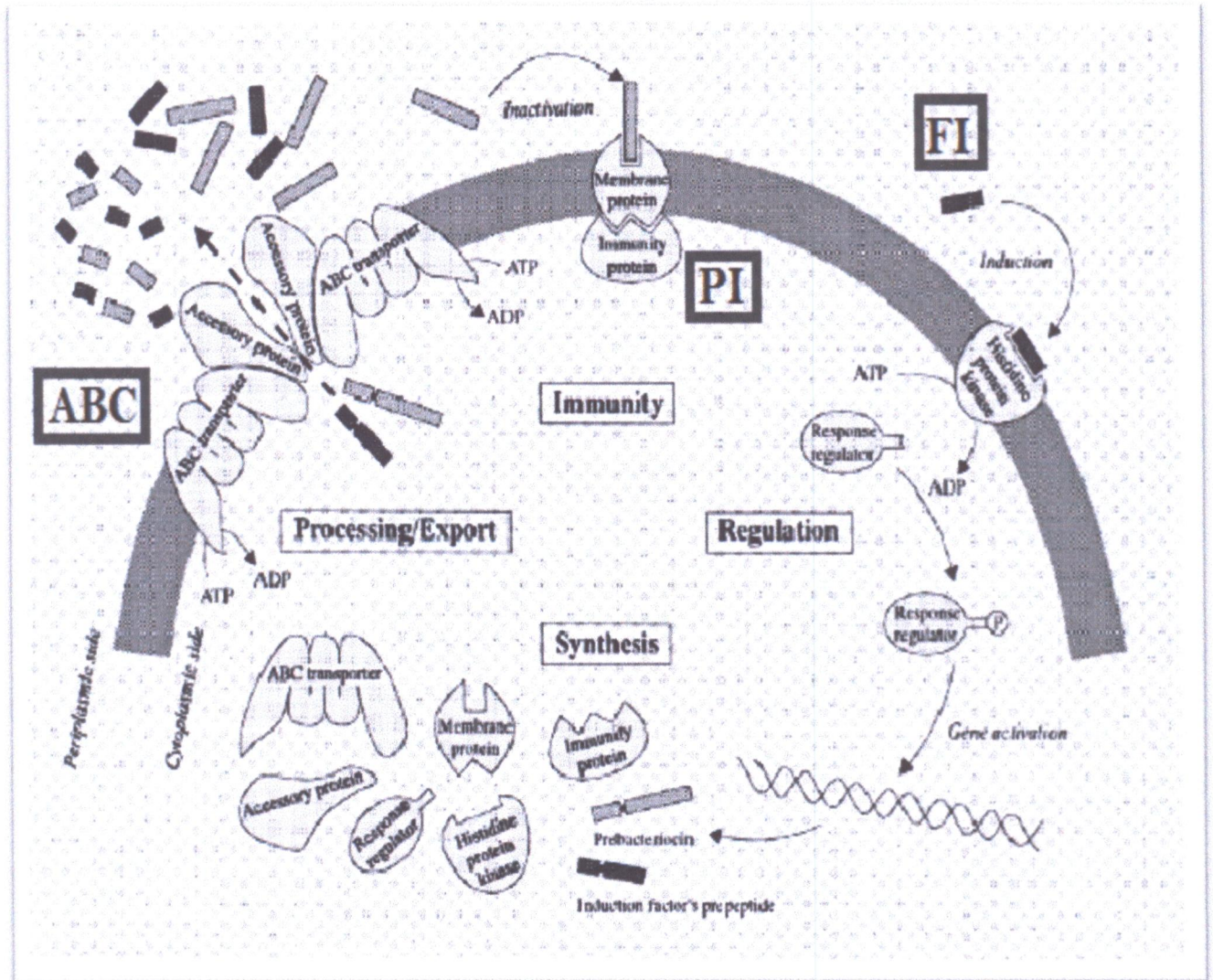
Plusieurs étapes sont nécessaires à la production d'une bactériocine mature par une bactérie (**Lachance, 2000**). L'induction de la biosynthèse, la transcription en ARN et la traduction en protéines des différentes composantes du système de biosynthèse, la modification des acides aminés dans le cas des lantibiotiques, la maturation et finalement le transport de la bactériocine vers l'extérieur de la cellule constituent les différentes étapes de biosynthèse. Il faut aussi inclure dans ces étapes l'immunité, qui rend la cellule productrice résistante à sa propre bactériocine (**Lachance, 2000; Izquierdo, 2009**). La comparaison des clusters génétiques de plusieurs bactériocines révèle un certain nombre de gènes conservés codant pour des protéines avec des fonctionnalités similaires (**Tableau 3**) toutes impliquées dans la biosynthèse des bactériocines (**Izquierdo, 2009**).

**Tableau (3):**Rôle des protéines impliquées dans la biosynthèse d'une bactériocine (**Lachance, 2000**).

| Protéine(s)  | Rôle  |
|--------------|---|
| Induction    | Reçoit un signal de l'inducteur (externe à la cellule)et provoque la transcription des gènes codant pour la biosynthèse de la bactériocine. |
| Structure    | code pour la bactériocine immature.   |
| Modification | dans le cas des lantibiotiques, modifie des acides aminés sur la bactériocine immature.   |
| Transport    | Transporte la bactériocine à l'extérieur de la cellule.   |
| Clivage      | coupe la bactériocine immature de son signal N-terminal.  |
| Immunité     | rend la cellule productrice résistante à sa bactériocine.   |



Ces clusters constituent en effet des opérons qui peuvent être portés par un chromosome, par un plasmide ou par des transposons. L'organisation du locus impliqué dans la production d'une bactériocine consiste au minimum en un gène de structure. Généralement co-transcrit avec son gène d'immunité qui protège le producteur des effets de la bactériocine. Habituellement, un autre groupe de gènes comporte les éléments nécessaires au transport dédié et parfois un troisième locus correspond à un système de régulation qui permet l'induction de la production de la bactériocine. Dans le cas des lantibiotiques on trouve aussi les gènes codant pour les enzymes responsables des modifications post-traductionnelles (Izquierdo, 2009).



**Figure (2) :** Vue schématique d'un possible système d'une production de bactériocine : système de régulation à trois composants, synthèse, maturation et immunité tiré d'Ennahar *et al.* (2000).

FI : facteur d'induction, PI : protéine d'immunité, ABC : transporteur ABC.

(Naghmouchi, 2007)

Les bactériocines des BAL sont souvent synthétisées sous forme d'une pré-bactériocine, sorte de pré-peptide inactif dont l'extension N-terminal, ou peptide leader, est clivée pour libérer la bactériocine au cours de l'étape de maturation (Figure 2). Le peptide leader maintient vraisemblablement la bactériocine sous une forme inactive à l'intérieur de la cellule productrice pour la protéger de l'action de sa bactériocine et il facilite l'interaction avec la (ou les) protéine(s) dont la fonction est de cliver le pré-bactériocine, de modifier ou de transférer la bactériocine à travers la membrane bactérienne. La maturation de la bactériocine se déroule

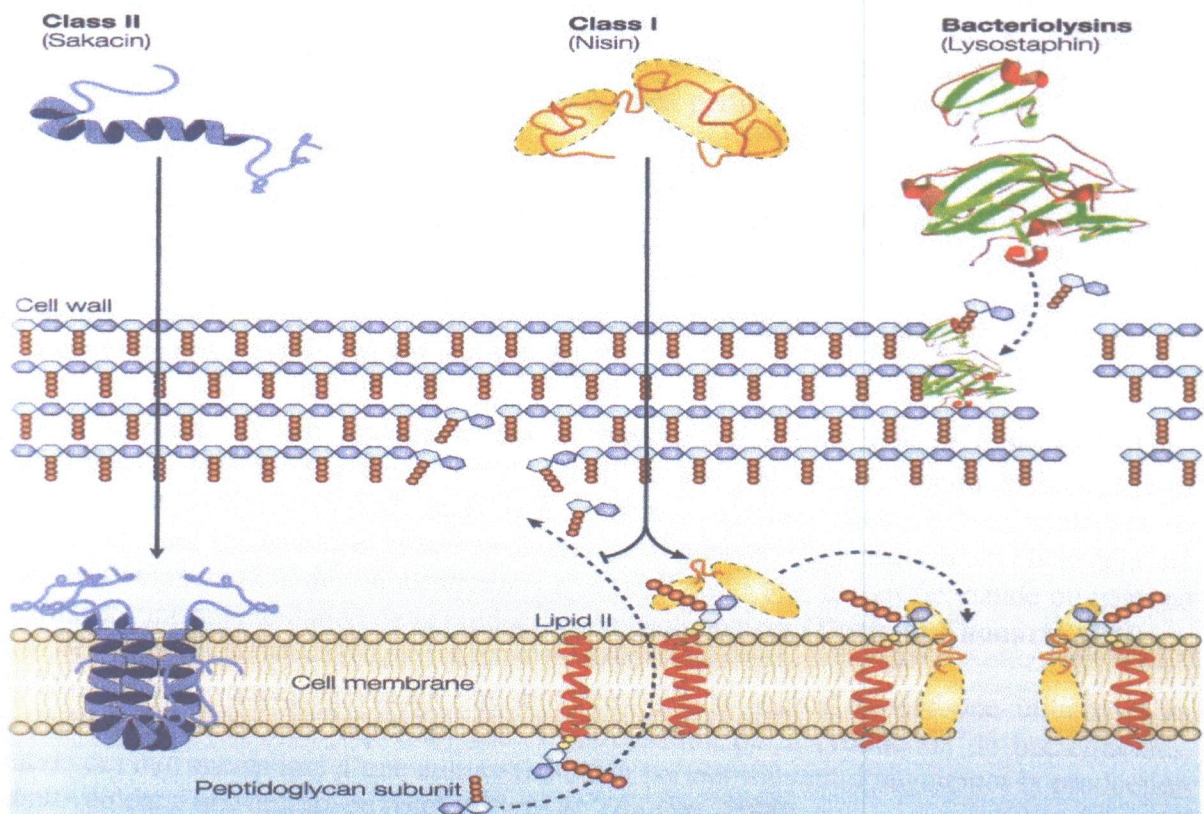
pendant ou immédiatement après sa sécrétion, moment où le peptide leader est clivé qu'il s'agisse d'un système de transport dédié, ou, moins fréquemment du système général de sécrétion (*sec*) de la cellule (Izquierdo, 2009).

## II.6. Les mécanismes d'action des bactériocines

Le mode d'action le plus connu et le plus répandu chez les bactériocines des BAL implique une action visant la fonction de barrière de la membrane, mais il existe des exceptions à ce mode général (Izquierdo, 2009).

Les bactériocines de la classe II représentent le cas typique de bactériocines agissant sur la membrane cytoplasmique des cellules sensibles et cela par la formation de petits pores membranaire (Izquierdo, 2009). Le résultat de cette action est un efflux rapide des petits composés cytoplasmiques tels que les ions, les acides aminés, l'ATP, etc. Cette augmentation de la perméabilité membranaire va conduire à la disparition des deux composantes de la force proton motrice FPM qui joue un rôle central dans la synthèse de l'ATP, le transport actif et la mobilité bactérienne et donc à la cessation rapide des activités cellulaires et à la mort de la cellule (Naghmouchi, 2007 ; Diop, 2008 ; Dortu et Thonart, 2009 ; Izquierdo, 2009).

Deux étapes peuvent en réalité être distinguées : d'abord, les molécules de bactériocine se fixent à la surface de la membrane et quand la concentration locale est élevée, l'orientation des molécules change et elles sont insérées dans la membrane causant la déstabilisation de la structure de la bicouche et la formation de pores (Figure 3). Ceci résulte en un flux d'ions, d'acides aminés et d'ATP vers l'extérieur de la cellule par annulation de toutes les réactions énergie-dépendantes. A concentrations proches de la concentration minimale inhibitrice, les bactériocines tuent les bactéries beaucoup plus rapidement que les antibiotiques conventionnels (Izquierdo, 2009).



D'un autre côté, certains lantibiotiques, comme par exemple la nisine, montrent un mode d'action double : d'une part elles s'attachent au lipide II, le principal transporteur des unités de peptidoglycane du cytoplasme à la paroi cellulaire, ce qui empêche la synthèse correcte de la paroi cellulaire, causant la mort de cellule; d'autre part elles utilisent le lipide II comme point d'encrage pour initier le processus d'insertion dans la membrane et la formation de pore provoquant la mort rapide de la cellule. Les bactériocines à deux peptides, comme par exemple la lacticine 3147, peuvent avoir cette activité double partagée entre les deux peptides. Une exception au mode d'action membranaire est représentée par les bactériocines de la classe III (bactériolysine), telles que la lysostaphine, dont l'action bactéricide consiste à cliver la partie peptidique du peptidoglycane des cellules cible (**Figure 3**) (**Izquierdo, 2009**).

## II.7. La production et le conditionnement des bactériocines

### II.7.1 la production des bactériocines

Les bactériocines sont généralement produites à la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire de croissance. Elles peuvent ensuite être dégradées par les protéases produites par la bactérie lactique productrice ou être adsorbées à sa surface ce qui mène à la baisse de la concentration de bactériocines dans la culture. Les facteurs influençant la production de bactériocines sont principalement la souche productrice, la température, le pH, la composition du milieu et la technologie de fermentation employée (**Dortu et Thonart, 2009**).

Comme l'ont montré Moretro *et al.* (2000) pour la production de sakacin P par *Lb. sakei*, une même bactériocine peut être produite par des souches ou espèces différentes dont la capacité de production peut être variable. Lors d'une optimisation de production, si différentes souches sont disponibles, le choix de celle-ci pourra être déterminant. Les conditions de culture influencent fortement la production de bactériocines, en effet, l'optimisation de la croissance ne résulte pas nécessairement en l'optimisation de la production de bactériocines. Il a même été suggéré que des conditions de croissance défavorables permettent de stimuler leur production (**Dortu et Thonart, 2009**).

Les températures et pH optimaux de production sont souvent inférieurs à ceux optimaux pour la croissance. C'est par exemple le cas pour la production de bactériocine par *Lb. curvatus* LTH1174, *Leuconostoc mesenteroides* L124, *Lb. curvatus* L442, de sakacin P par *Lb. sakei* CCUG42687, d'amylovorin L471 par *Lb. amylovorus* DCE471 et de pediocin PA-1 par *Pediococcus damnosus* (**Dortu et Thonart, 2009**).

La composition du milieu, tout particulièrement les sources et concentrations de carbone et azote, affectent fortement la production de bactériocines. Les bactéries lactiques productrices requièrent de nombreux nutriments pour leur croissance et des milieux riches, contenant de l'extrait de viande, de levure et des hydrolysats de protéines, sont nécessaires. Il a déjà été montré que l'augmentation des concentrations en extrait de levure, extrait de viande ou peptone peut permettre une augmentation de la production de bactériocines (**Dortu et Thonart, 2009**).

D'autre part, quelques études ont montrées que la source de carbone utilisée et sa concentration est un facteur important dans l'optimisation de la production de bactériocines. L'ajout de ces nutriments lors d'une culture fed-batch permet souvent d'augmenter la production comparativement à une culture en batch (**Dortu et Thonart, 2009**).

L'utilisation de la technique des cellules immobilisées peut permettre d'augmenter la durée et la stabilité de la production de bactériocines. Les cellules peuvent être immobilisées

dans des biofilms ou des billes d'alginate de calcium. Cette technique a déjà été utilisée avec succès pour la lactacin 3147 et la nisine (Dortu et Thonart, 2009).

### II.7.2. Le conditionnement des bactériocines

Il est très difficile de conditionner les bactériocines sous une forme purifiée. La purification des bactériocines est une procédure longue et coûteuse qui nécessite la mise en œuvre de nombreuses techniques à savoir une précipitation des protéines au sulfate d'ammonium, différentes combinaisons de chromatographies sur colonne telles que des échanges d'ions ou des interactions hydrophobes et une étape finale de chromatographie liquide à haute performance en phase inverse. Ces traitements ne sont pas applicables à l'échelle industrielle. La stratégie souvent mise en œuvre consiste dès lors en l'adsorption de la bactériocine sur la cellule productrice suivie d'une centrifugation ou d'une ultrafiltration de la culture et de la désorption de la bactériocine par abaissement du pH à 2 et augmentation de la concentration en chlorure de sodium. Les bactériocines semi-purifiées peuvent alors être conditionnées sous forme sèche par atomisation ou lyophilisation par exemple. La nisine, la seule bactériocine légalement approuvée comme additif alimentaire, est commercialisée sous une forme semi-purifiée (Dortu et Thonart, 2009).

### II.8. Les différentes applications des bactériocines

Les bactériocines de la flore lactique présentent un potentiel non négligeable pour les industries de l'agro-alimentaire et de la santé. En effet grâce à leurs propriétés biologiques et physico-chimiques (Morisset, 2003), les bactériocines des bactéries lactiques sont des agents de conservation très prometteurs car plusieurs d'entre eux résistent aux températures élevées, et restent actives dans une large gamme de pH rencontrée dans les aliments, de nature protéique non toxiques, elles n'ont aucun impact sur la qualité organoleptique du produit alimentaire auquel elles sont ajoutées (Naghmouchi, 2007).

Les bactériocines des BAL ne présentent aucun danger pour le consommateur. Parmi les arguments jouant en faveur de leur innocuité, on citera d'une part leur présence naturelle dans les produits fermentés par les bactéries productrices de tels peptides (Lachance, 2000) et d'autre part leur inactivation par les enzymes protéolytiques du système digestif (Naghmouchi, 2007).

En effet, la sensibilité de ces bactériocines aux protéases digestives sécurise leur utilisation puisqu'elles ne modifient pas l'écologie du tractus digestif et ne présentent pas les risques associés à la prise d'antibiotiques. De plus, leurs utilisations permettent de répondre aux nouvelles exigences des consommateurs qui favorisent de plus en plus l'utilisation de produits naturels en remplacement des agents chimiques (Naghmouchi, 2007).

La **figure 4** présente un schéma qui regroupe les applications potentielles des bactériocines et de leurs souches productrices. Ces applications sont diverses et peuvent aller de la sécurité alimentaire (en utilisant les bactériocines comme additif ou les souches productrices comme starters ou comme cultures associées), à la santé du tractus gastro-intestinal (à travers l'utilisation de souches probiotiques productrices de bactériocines). Cependant, bien que l'utilisation des bactériocines dans la médecine ait été envisagée, cet aspect ne s'est pas encore développé (Izquierdo, 2009).

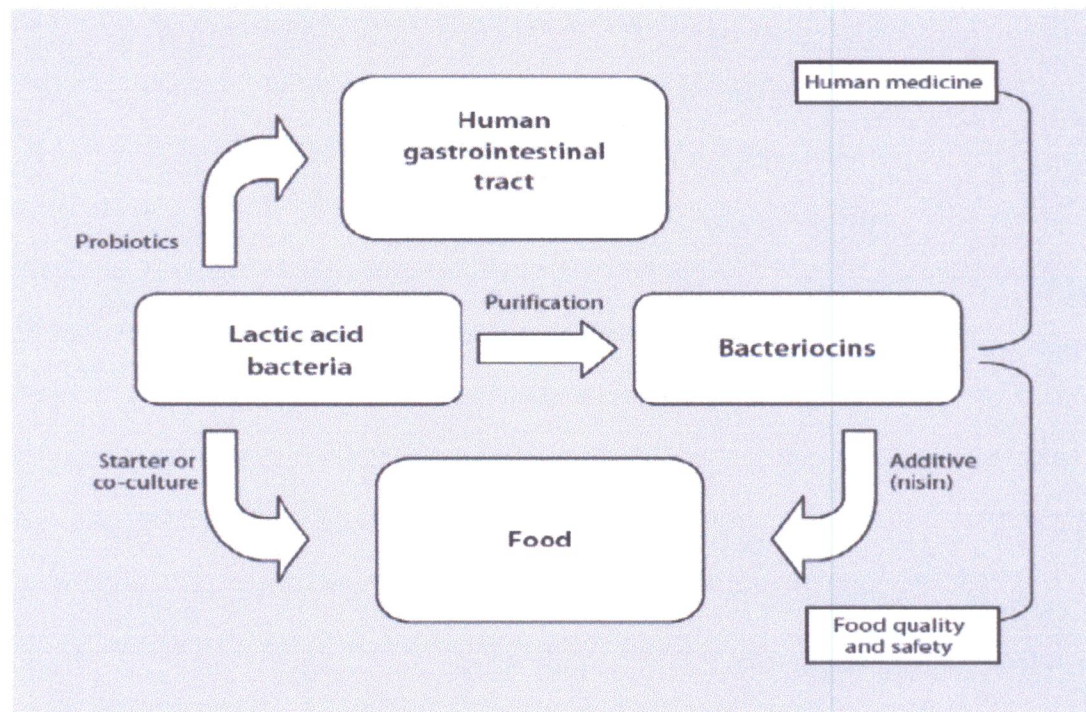


Figure (4) : Vue d'ensemble des applications potentielles des bactériocines (Izquierdo, 2009).

### II.8.1.L'application des bactériocines dans les aliments

L'intérêt des consommateurs pour des aliments « naturel » sans conservateurs chimiques ajoutés, en plus de celui qu'a l'industriel de minimiser le nombre et l'intensité des procédés appliqués notamment les traitements thermiques, tout en garantissant des durées de conservation longues, ont stimulé les recherches visant à découvrir et développer des conservateurs naturels et efficaces. Les bactériocines produites par les bactéries lactiques ont un tel profil (Leroi, 2009 ; Izquierdo, 2009).

Les bactériocines peuvent être employées directement comme additifs alimentaires (Diop, 2008 ; Dortu et Thonart, 2009 ; Izquierdo, 2009) (surnageant de culture d'une souche productrice de bactériocine, préparations de bactériocine partiellement purifiées à partir du surnageant de culture de la souche productrice ou de poudre commerciale de bactériocine comme la nisine) (Diop, 2008) et leur utilisation raisonnée permet sans aucun doute d'améliorer la sécurité microbiologique et la qualité des aliments (Izquierdo, 2009). Cependant, malgré la variété de bactériocines connues à ce jour, la nisine reste la seule ayant l'agrément de nombreux pays pour son utilisation comme additif alimentaire (Lachance, 2000; Izquierdo, 2009).

Comme alternative, les bactériocines peuvent également être produites directement dans les aliments à la suite de l'utilisation du producteur comme culture *starter* ou comme co-culture (Diop, 2008 ; Dortu et Thonart, 2009; Izquierdo, 2009). Plusieurs études ont en effet montré que des *starter* ou des co-cultures de BAL sont capables de produire leurs bactériocines dans les matrices alimentaires et par conséquent de montrer une activité inhibitrice contre des bactéries pathogènes ou d'altération (Diop, 2008; Dortu, 2008; Leroi, 2009; Izquierdo, 2009) pour peu que la composition du produit (nutriments accessibles, pH, additifs alimentaires...) et les conditions de stockage (température, atmosphère, activité d'eau...) permettent la croissance et la production de ces dernières (Diop, 2008; Dortu, 2008).

### II.8.2.L'application probiotique des bactériocines

Les bactéries utilisées pour des applications probiotiques aident à maintenir et/ou rétablir la flore microbienne naturelle de l'hôte (Izquierdo, 2009).

Les critères de sélection des souches probiotiques sont nombreux, qu'ils s'agissent de critères de sécurité, technologiques ou encore de critères fonctionnels. Parmi ces derniers nous citeront : une résistance aux conditions gastriques, l'adhésion à diverses lignées de cellules intestinales et/ou au mucus mais encore un antagonisme vis-à-vis des pathogènes et production de substances antimicrobiennes dont les bactériocines (Annuk, 2002).

L'utilisation potentielle des souches productrices de bactériocines comme probiotique et agents bioprotecteurs a bénéficié récemment d'un intérêt croissant. Elles peuvent cibler spécifiquement certaines souches ou espèces et sont donc particulièrement attractives quand l'objectif de l'application du probiotique est d'éliminer ou d'empêcher l'installation d'un pathogène spécifique, de façon à ne pas altérer de manière significative la flore microbienne endogène de l'hôte (Izquierdo, 2009).

### II.8.3.L'application des bactériocines dans le secteur de la santé

Tel que déjà mentionné, l'utilisation des bactériocines n'est pas restreinte au domaine alimentaire, mais trouve aussi des applications dans le domaine médical et en médecine vétérinaire. Daw et Falkiner (1996) ont rapporté que les bactériocines gagnent une attention particulière pour le traitement des infections des muqueuses causées par des bacilles à Gram négatif tels *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter*. Taylor *et al.* (1949), ont démontré que la nisine s'est avérée efficace contre des infections intra-mammaires dues aux streptocoques et staphylocoques. En 1989, Broadbent a mis en évidence l'efficacité de la nisine contre les pathogènes responsables de la mammité bovine tel que *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* et *Streptococcus uberis*. D'autres études ont montré que la nisine pouvait être utilisée efficacement dans les traitements des infections gastro-intestinales telles que les ulcères gastriques causés par *Helicobacter pylori*. Puisque la nisine est stable dans des conditions acides et résiste à la pepsine, elle maintient son activité antimicrobienne dans l'estomac, et n'est inactivée que par les enzymes de la flore intestinale.

D'autres études ont mentionnées que les bactériocines peuvent être une thérapie naturelle alternative aux antibiotiques. Mota-Meira *et al.* (2000) ont montré que la nisine A et la mutacine B-Ny266 (isolée de *Streptococcus mutans*) ont un potentiel antibiotique en remplacement de la vancomycine et de l'oxacilline, deux antibiotiques reconnus pour causer le développement de résistance chez les souches pathogènes traités (enterococci) (Naghmouchi, 2007).

### II.9.Limite d'utilisation des bactériocines

De nombreux travaux ont souligné l'importance de l'utilisation des bactériocines ou de souches bactériocinogènes en tant qu'additifs alimentaires. Cependant, de nombreux facteurs peuvent réduire l'efficacité des bactériocines contre les bactéries indésirables et les pathogènes pour l'homme (Naghmouchi, 2007; Leroi, 2009). En fait, les cellules sensibles n'ont pas toutes les mêmes concentrations minimales inhibitrices (CMI), pour une bactériocine donnée. Ensuite, les bactériocines produites par les bactéries à Gram positif n'ont pas d'action bactéricide contre les bactéries à Gram négatif (Naghmouchi, 2007) puisque leur membrane externe ne permet pas aux bactériocines d'atteindre la membrane interne, siège de leur activité (Dortu, 2008).

Lors d'une application alimentaire, la composition du produit est un des premiers facteurs pouvant réduire ou totalement dissiper l'activité des bactériocines de par son adsorption sur des composantes du produit, la limitation de sa solubilité et de sa diffusion dans le produit, sa dégradation par les 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'activité inhibitrice des bactériocines dans un produit alimentaire. En effet, des traitements thermiques trop élevés peuvent dégrader les bactériocines présentes. La température de stockage pourra également réduire l'activité des bactériocines, qui varie en fonction de la température (**Dortu, 2008**).

Un autre facteur limitant l'activité des bactériocines est la flore autochtone, principalement sa concentration, la présence de bactéries résistantes, la présence de microorganismes produisant des protéases dégradant la bactériocine et l'état physiologique de cette flore. Un état physiologique stationnaire ou stressé ainsi que la formation de spores peut conduire à une résistance accrue. En outre, dans les produits solides, les bactéries forment des microcolonies ou des biofilms dont la résistance aux bactériocines peut être plus élevée (**Dortu, 2008**).

Ces phénomènes peuvent conduire à (i) une absence totale d'activité antimicrobienne, (ii) une inhibition partielle des bactéries cibles, (iii) une diminution initiale de la concentration des bactéries cibles sous la limite de détectabilité suivie d'une reprise de croissance au cours du stockage, un phénomène appelé « rebond » (**Dortu, 2008**).

**Etude  
expérimentale**



# **Matériel et méthodes**

## I. Matériel et méthodes

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de microbiologie de la faculté des Sciences de l'Université de Jijel durant une période qui s'étend du mois de février au mois de juin.

### I.1. Matériel

#### I.1.1. Matériel biologiques

##### I.1.1.1. Les selles d'enfants

La niche écologique utilisée pour l'isolement des bactéries lactiques est les selles d'enfants, âgés de 5 mois à 5 ans. Les échantillons ont été collectés dans quatre régions différentes de la wilaya de Jijel : El Ouana, El Chekfa, Ben Yajis et Texana. Ainsi l'étude a été conduite sur une totalité de huit échantillons, à raison de deux échantillons par région pour l'obtention d'une collection de *Lactobacillus* humain.

##### I.1.1.2. Les souches bactériennes indicatrices

Lors de ce travail, les germes utilisés comme souches indicatrices (souches sur lesquelles est testée l'action antibactérienne) (Izquierdo, 2009), sont référencées dans le **tableau (5)** ci-dessous :

**Tableau (5) :** Souches bactériennes indicatrices utilisées au cours de ce travail.

| Souches  | Source ou référence  |
|--|--|
| <b>Gram négatifs</b>   |  |
| <i>Escherichia coli</i><br><i>E. coli</i> pathogène<br><i>Pseudomonas aeruginosa</i><br><i>Klebsiella</i>  | ATTC 29522<br>Souche clinique<br>ATTC 27853<br>ATTC 111 Kb   |
| <b>Gram positifs</b>   |  |
| <i>Staphylococcus aureus</i><br><i>Bacillus subtilis</i><br><i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthiciline<br><i>Listeria monocytogenes</i><br><i>L. gasseri</i> , <i>L. delbruekii</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. acidophilus</i> | ATTC 29523<br>Non référencié<br>Souche clinique<br>Souche de référence Institut Pasteur<br>Dr. Idoui |

### I.1.2. Milieux de cultures

Les principaux milieux de croissance utilisés au cours de cette étude sont :

- Milieu MRS (Man, Rogosa et Sharpe) : Milieu sélectif pour la culture des *Lactobacillus* additionné de 1 % de cystéine (préparer au laboratoire).
- Milieu Gibson & Abd El Malek : pour la recherche du type fermentaire (préparé au laboratoire).
- Milieu MEVAG sans sucre (milieu d'étude de la voie d'attaque des glucides) : pour la réalisation des profils de fermentation des sucres (Institut Pasteur d'Alger).
- Le milieu Moëller à l'arginine (Institut Pasteur d'Alger).
- Gélose nutritive : pour la réalisation du test de l'activité antibactérienne (Institut Pasteur d'Alger).
- Milieu Muller-Hinton : pour les tests de l'activité antimicrobienne (Institut Pasteur d'Alger, Idéal labo).
- Bouillon nutritif : pour la culture des souches tests (Institut Pasteur d'Alger).
- Lait écrémé.

### I.1.3. Réactifs

Au cours de notre travail, nous avons utilisés les réactifs suivants :

- Colorants de Gram : violet de Gentiane, Lugol, alcool, Fushine.
- L'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).
- L'eau distillée stérile.
- L'eau physiologique.
- HCl (1N), la soude NaOH (5N), acide acétique.
- L'huile à immersion.
- Les sucres à 20%: glucose, lactose, galactose, saccharose, xylose, mannose, ribose, salicine, sorbitol, arabinose, tréhalose, cellobiose. à 20% (Institut Pasteur d'Alger).
- Les enzymes : Catalase (Sigma), Trypsine (Fluka), Lipase (Sigma),  $\alpha$ -amylase (Fluka),  $\alpha$ -chymotrypsine (Merck), Pronase (Merck).
- Cystéine.

### I.1.4. Matériel et appareillages

- pH mètre (Hanna Instruments).
- Bain Marie (Gerhardt, Memmert).
- Etuve de 15, 20, 37 et 46°C (Memmert).
- Microscope optique (Olympus).
- Four Pasteur (Controls).
- Spectrophotomètre (UV Shimadzu).
- Centrifugeuse (Hettich).
- Agitateur magnétique chauffant (Bunsen).
- Vortex (Minishaker IKA).
- Réfrigérateur (Condor).
- Balance (Denver).

- Autoclave (Slli).
- Les seringues de 5 ml.
- Filtre millipore (0.22µm).
- Papier Watman.

## **I.2.Méthodes**

Pour la facilité du travail et en fonction de la disponibilité des produits, un premier lot de souches de bactéries isolées a été retenu pour la suite de l'étude.

Le but était de faire un screening de souches bactériocinogènes parmi ce lot, si résultats négatifs, faire un autre screening parmi un deuxième lot des souches restantes. Le choix des souches retenues a été réalisé de manière à représenter tous les échantillons.

### **I.2.1.Analyse des échantillons et technique des dilutions**

#### **I.2.1.1.Analyse des échantillons**

Les échantillons des selles d'enfants ont été collectés dans des pots stériles et transportés directement. Une fois au laboratoire, le pH des échantillons a été déterminé par le pH mètre. La moyenne  $\pm$  SD des valeurs des pH mesurés a été calculée pour ajuster le pH du milieu MRS.

#### **I.2.1.2.Techniques des dilutions**

La solution mère a été préparée en prélevant 1 g de chaque échantillon (1,2,...,8) et ajouté à 9 ml d'eau distillé stérile. À partir de cette solution mère, des dilutions sériées allant de  $10^{-1}$  à  $10^{-7}$  ont été réalisées (Cuq, 2007).

### **I.2.2. Isolement et purification**

La phase préliminaire obligatoire à toute identification est un isolement suivi d'une purification (Guiraud, 1998).

#### **I.2.2.1.Enrichissement**

1ml de chaque dilution estensemencé dans 5ml de bouillons MRS enrichi à la cystéine ensuite homogénéisé au moyen d'un vortex et incubé à 37°C.

Il convient de préciser que les lactobacilles ont une relation de sensibilité à l'oxygène, les cultures sont donc incubées dans des conditions particulières, visant à diminuer la tension d'oxygène et créer l'anaérobiose, il est donc souhaitable de fermer les boîtes de Pétri et les tubes à essai hermétiquement en utilisant du ruban adhésif (Leveau *et al.*, 1991).

#### **I.2.2.2 Isolement**

L'isolement est réalisé sur milieu MRS solide, milieu adapté à la recherche spécifique des Lactobacilles. Les cultures sont incubés 24 à 48 heures à 37°C dans des boîtes de Pétri à l'obscurité et en anaérobiose (Labioui *et al.*, 2005).

### **I.2.2.3.Purification**

La purification est effectuée par quatre repiquages successifs sur milieu MRS solide jusqu'à l'obtention de colonies de même taille, même forme, ce qui renseigne sur la pureté de la souche. (Labioui *et al.*, 2005).

De ce fait, le prélèvement et la remise en suspension se portera uniquement sur des colonies bien distinctes, homogènes et bien développées. Pour s'assurer de leur pureté, une coloration différentielle de Gram suivie d'une observation microscopique est réalisée pour chaque souche.

Les souches ainsi purifiées sont alors conservées au réfrigérateur à +4°C jusqu'au moment d'utilisation.

### **I.2.3.Identification des souches de *Lactobacillus***

#### **I.2.3.1.Etude des caractères morphologiques**

L'étude morphologique est portée sur l'observation macroscopique qui consiste à décrire les colonies obtenues sur milieu solide après incubation (taille, pigmentation, contour, aspect,...) et après coloration de Gram détailler ci-dessous, l'examen microscopique permet de déterminer la morphologie des cellules bactériennes (Gram, taille, forme et mode d'association) (Hariri *et al.*, 2010).

##### **a. Grammage**

À partir d'une suspension bactérienne, on réalise une coloration différentielle de Gram. Ce test permet de caractériser la paroi bactérienne selon les étapes de manipulation suivantes :

- 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 Bunsen ;
- 3- Coloration au violet de Gentiane : tout les éléments sont colorés en violet ;
- 4- Lavage ;
- 5- Fixation au Lugol : le Lugol fixe le violet sur les structures membranaires des bactéries Gram +;
- 6- Lavage ;
- 7- Décoloration à l'alcool : les bactéries Gram positives sont colorées en violet foncé, les autres éléments sont incolores ;
- 8- Lavage ;
- 9- Recoloration du fond à la Fushine : les éléments tissulaires et les bactéries Gram positives sont toujours colorées en violet.

#### **I.2.3.2.Tests biochimiques**

##### **a. Recherche de la catalase**

L'activité catalytique permet la dégradation de l'eau oxygénée en oxygène et en eau. Elle est mise en évidence en émulsionnant la culture bactérienne à tester dans une solution fraîche d'eau oxygénée. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse, traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de l'enzyme à tester (Bekhouche, 2006).



### b. Recherche du type fermentaire

Ce test permet d'apprécier le type de métabolisme par lequel le substrat carboné est catabolisé.

C'est ainsi que le caractère homofermentaire ou hétérofermentaire est mis en évidence par la méthode classique de Gibson & Abd El Malek. Le milieu Gibson & Abd El Malek une fois sérialisé à 120°C durant 20 min est réparti dans des tubes à essai. Après inoculation par piqure central, 4 ml de gélose blanche sont ajoutées dans chaque tube.

Après 7 jours d'incubation à 37°C, les homofermentaires se développent dans le milieu en utilisant le sucre mais ne produisent pas de gaz. Au contraire, les hétérofermentaires produisent du CO<sub>2</sub> qui se manifeste par un décollement du bouchon de la gélose (Bekhouche, 2006).

### c. Profil de fermentation des sucres

Ce test permet d'apprécier la capacité des souches purifiées à fermenter quelques sucres (Guiraud, 1998).

L'étude est réalisée sur milieu MEVAG (Milieu d'Etude de la Voie d'Attaque des Glucides). Une fois régénéré au bain Marie bouillon, le milieu est réparti aseptiquement au niveau de tubes d'Eppendorfs stériles dont chacun sera additionné d'un des différents sucres suivants : glucose, saccharose, mannose, xylose, ribose, lactose, galactose, tréhalose, sorbitol, salicine, cellobiose.

Ces tubes une fois ensemencés par piqure central sont soumis à une culture de 24 heures à 37°C. La croissance des souches et le virage de l'indicateur coloré traduisent la fermentation du sucre.

### d. Recherche de l'activité arginine dihydrolase ADH

Pour la détermination de ce caractère, la souche à tester est ensemencée dans un tube d'Eppendorfs contenant le milieu Moëller à l'arginine. Le tube est par la suite incubé à 37°C pendant 24 heures.

La culture dans le milieu se manifeste par un virage au jaune du milieu dû au métabolisme de glucose, si la souche dégrade l'arginine elle produit alors une amine qui va augmenter le pH du milieu et on observe un virage de la couleur au violet (Hariri *et al.*, 2010).

## I.2.3.3. Test physiologique

### a. Température de croissance

Ce test est effectué comme suite : 5 ml de bouillon MRS est inoculés en doubles avec les souches étudiées dans des tubes à essai. En suite une série sera incubée à 46°C et une autre à 15°C pendant 24h.

Ce test est important car il permet de différencier les thermophiles, qui peuvent se développer à 46°C, des mésophiles qui poussent à 15°C (**Grattepanche, 2005**).

#### **I.2.4. Pouvoir antagoniste des souches**

La méthode de confrontation directe de Tadesse *et al.* (2004) (méthode de disque ou porte germe) a été utilisée pour la détermination du spectre d'activité des souches de *Lactobacillus* isolées et purifiées envers des espèces indicatrices appartenant aux bactéries à Gram négatives (*Escherichia coli* ATTC 29522, *E. coli* pathogène, *Klebsiella* ATTC 111Kb, *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 27583), et aux bactéries à Gram positives non sporulées (*Lactobacillus*, *Staphylococcus aureus* ATTC 29523, SARM).

Cette méthode consiste selon Tadesse *et al.* (2004) à :

- Inonder en surface les boîtes de Pétri contenant le milieu GN par quelques millilitres des cultures de souches indicatrices,
- Les boîtes sont incubées pendant 3 heures à 37°C, après incubation, déposer à la surface de la gélose des disques en papier Watman stérile préalablement imprégnés par la culture des *Lactobacillus* testées,
- Mettre les boîtes à 4°C pendant 4h pour assurer la diffusion des substances responsables de l'interaction, enfin incuber les boîtes à 37°C pendant 24h.

L'inhibition de la souche indicatrice se traduit par la formation de zones claires autour des disques dont le diamètre est mesuré à partir du centre du disque en mm (**Metlef et Dilmibouras, 2009**). La lecture se fait par la mesure du diamètre en mm des zones d'inhibition formées autour des disques (Zi). Une inhibition est considérée positive si le diamètre est supérieur à 2 mm. La mesure du diamètre d'inhibition Zi est effectuée selon la formule suivante :

Zi en (mm) = diamètre de la zone d'inhibition obtenue (mm) - diamètre de disque (6mm) (**Doumandji *et al.*, 2010**).

#### **I.2.5. Étude de l'activité bactériocinogène**

Les nombreuses méthodes décrites pour la détection de souches lactiques productrices de bactériocines sont basées sur le principe que ces substances protéiques peuvent diffuser dans un milieu de culture solide ou semi solide qu'on inocule préalablement avec une souche cible. La production de bactériocine est détectée par le pouvoir inhibiteur du filtrat du micro-organisme testé sur la croissance du germe cible (**Labioui *et al.*, 2005**).

##### **I.2.5.1. Préparation du surnageant**

Comme les inhibitions peuvent être causées par plusieurs agents tels que l'acide lactique, le peroxyde d'hydrogène, les phages et les bactériocines, la recherche de la nature de l'agent inhibiteur est devenue indispensable (**Mami *et al.*, 2010**).

Une culture des souches de *Lactobacillus* supposées bactériocinogènes est réalisée sur bouillon MRS à 1% de glucose pendant 24 heures à 37°C, 20 ml pour chaque souche. Cette étape une fois effectuée, la culture est soumise à une centrifugation à 6000 rpm durant 40 min à 4°C (au lieu de 10000 rpm pendant 10 minutes comme décrit par Diop *et al.* (2007), faute d'une centrifugeuse de cette capacité au niveau de notre laboratoire) et le surnageant obtenu est filtré sur filtre millipores 0.22 µm.

L'exclusion de toute inhibition de l'organisme indicateur qui pourrait être due à l'effet conjugué des acides organiques (notamment l'acide lactique et l'acide acétique) et du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) a été réalisée par un ajustement du pH à 6.5 à 5N et l'addition de quelques gouttes de la catalase au surnageant des souches sélectionnées (**Ogunbanwo et al., 2003; Achemchem et al., 2004; Labioui et al., 2005; Diop et al., 2007**).

Les filtrats peuvent être conservés à +4°C à l'obscurité.

#### **I.2.5.2. Détermination de l'activité bactériocinogène du surnageant**

Selon la technique de diffusion en puits de Barefoot *et al.* (1983) in **Diop et al. (2007)**, 10 µl d'une culture d'une nuit des germes indicateurs sont ensemencés dans 20 ml de gélose Mueller-Hinton fondu. Une fois coulée et solidifiée, des puits de 6 mm de diamètres sont creusés stérilement sur cette surface, ensuite le fond des puits est soudé par la gélose du même milieu, et les puits seront remplis avec 60 µl du surnageant.

Les boîtes de Pétri sont mise à une température de 4°C durant 2 à 4 heures pour permettre la bonne diffusion de la substance antibactérienne. Les cultures seront par la suite mises dans leur condition optimum de croissance. La lecture se fait par la mesure du diamètre en mm des zones d'inhibitions formées au tour des puits (**Doumandji et al., 2010**).

#### **I.2.6. Caractérisation des extraits bactériocinogènes**

Les études portées sur l'effet des enzymes, du pH et de la chaleur sur l'activité inhibitrice des extraits bactériocinogènes ont toutes étaient réalisées selon la technique des spots. Cette méthode est effectuée comme telle :

20 ml de gélose Mueller-Hinton sont liquéfiés à 100°C, puis laisser refroidir à environ 40°C avant d'être inoculés avec 110 µl d'une culture d'une nuit de la souche indicatrice et déposés sur une boîte Pétri. Après solidification de la gélose déposée, des gouttes de 10 µl du surnageant à tester sont déposés à la surface de la gélose. Les boîtes de Pétri sont mises à une température de 4°C durant 2 à 4 heures pour permettre la bonne diffusion des substances antibactériennes. Les cultures seront par la suite mises dans leur condition optimum de croissance. L'effet antagoniste résiduel est responsable d'une zone d'inhibition de croissance de la souche cible, dont le rayon est proportionnel à la concentration de bactériocine. Les rayons des halos d'inhibition sont mesurés manuellement (**Morisset, 2003**).

##### **I.2.6.1. Détermination du pH optimum d'action des surnageants neutralisés et traités par catalase (SNTC)**

Le pH optimum d'action des surnageants neutralisés et traités par catalase est mis en évidence par la variation du pH, l'extrait bactériocinogène est ajusté à des valeurs de pH de 2, 4, 6, 8, 10 et 12 avec du HCl ou du NaOH (**Allouche et al., 2010**). Après une incubation de 4 heures à température ambiante, le pH du surnageant est neutralisé à pH 6,5 afin d'exclure toute inhibition des souches indicatrices pouvant être due à l'acidité du surnageant (**Ogunbanwo et al., 2003**).

L'activité bactériocinogène est ensuite testée vis-à-vis des souches indicatrices par la méthode des spots, il s'agit du : *Bacillus subtilis*, et SARM.



### I.2.6.2. Thermorésistance des SNTC

Pour la détermination de la thermorésistance du SNTC, différentes fractions de ce dernier sont soumises à un traitement thermique de 40 °C, 60 °C, 80°C et 100 °C. Une aliquote est prélevée des différentes fractions à 0, 30, 60, 90 min et est testée par la méthode des spots en utilisant *Bacillus subtilise* et le SARM comme germes indicateurs (Ogunbanwo *et al.*, 2003).

La présence de la zone d'inhibition après traitement indique la stabilité de la substance inhibitrice (Mami *et al.*, 2010).

### I.2.6.3. Effet des enzymes protéolytiques sur le SNTC

L'effet des enzymes protéolytiques suivantes: lipase,  $\alpha$ -amylase, catalase,  $\alpha$ -chymotrypsine, pronase et trypsine a été étudié afin de mettre en évidence la nature protéique des substances antimicrobiennes présentes au niveau du SNTC.

Le surnageant, doté d'une activité inhibitrice est additionné aux enzymes à une concentration finale de 1mg/ml. Après incubation du mélange à 37 °C pendant 1 heure et chauffé dans l'eau bouillante pendant 5 min afin d'inactiver les enzymes. l'activité bactériocinogène (inhibitrice) résiduelle est évaluée par la technique des spots en utilisant le SARM comme germe cible (Achemchem *et al.*, 2004; Bromberg *et al.*, 2004; Allouche *et al.*, 2010).

### I.2.6.4. Sensibilité au stockage du SNTC

Afin d'examiner la stabilité thermique du SNTC au cours du stockage, différentes fractions d'extraits bactériocinogène sont conservées à pH 6.5 à des températures différentes de 37°C, 20°C et 4 °C pendant 7 jours. L'activité de la bactériocine est testée vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline par la technique des spots (Allouche *et al.*, 2010).

L'activité résiduelle des tests de la caractérisation des extraits bactériocinogènes est calculée selon la formule suivante :

$$\text{L'activité résiduelle} = \frac{\text{Zone d'inhibition de SNTC témoin} * 100.}{\text{Zone d'inhibition de SNTC testé}}$$

# Résultats et discussion

## I. Résultats et discussion

### I.1. Mesure du pH

La mesure du pH des différents échantillons de selles est présentée dans le **tableau (5)**.

**Tableau (5):** Les valeurs du pH des différents échantillons.

| N° des échantillons | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    |
|---------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| valeurs du pH       | 6,44 | 6,16 | 6,49 | 5,37 | 6,21 | 6,31 | 6,40 | 5,49 |

La moyenne du pH =  $6.10 \pm 0.43$  a été utilisée pour l'ajustement du pH du milieu MRS.

### I.2. Isolement des souches de *Lactobacillus*

120 souches de bactéries lactiques ont été isolées et purifiées, sur milieu MRS, à partir des différents échantillons de selles d'enfants.

### I.3. Identification

L'appartenance ou non, des 120 souches isolées, au genre *Lactobacillus* a été déterminée par des tests morphologiques, biochimiques et physiologiques.

#### I.3.1. Etude des caractères morphologiques

##### I.3.1.1 Examen macroscopique

L'observation macroscopique des colonies, obtenues sur gélose MRS, montre des petites colonies d'environ 1 mm de diamètre, de forme lenticulaire de couleur blanchâtre ou laiteuse, avec une surface lisse et un pourtour circulaire régulier. Ceci correspond à la description des colonies des *Lactobacillus* décrites par **Mami et al. (2010)**.

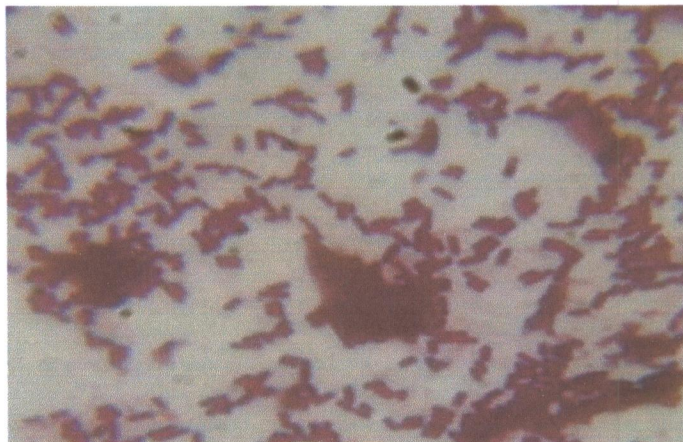


**Figure (5) :** Aspect macroscopique des colonies d'une souche de *Lactobacillus* (B13) isolée et purifiée.

### I.3.1.2.Examen microscopique

L'observation microscopique après coloration de Gram a révélée que sur les 120 souches de bactéries lactiques isolées et purifiées, seules 70 présentaient les caractéristiques des *Lactobacillus*. Elles étaient Gram positif, sous forme de bacilles fins ou coccobacilles, isolées ou en chaînettes plus ou moins longues.

Nos résultats concordent avec la littérature en ce qui concerne le Gram, la couleur, la forme et la disposition des cellules (**Hariri et al., 2009; Mami et al., 2010**).



**Figure (6) :** Aspect microscopique d'une souche (B13) de *Lactobacillus* isolée et purifié (Coloration de Gram, grossissement 100).

### I.3.2. Tests biochimiques

#### I.3.2.1.Recherche de la catalase

Le test de la catalase a révélé que 10 souches étaient catalase positive (dégagement de bulles d'air lors du test), en revanche, les 60 souches restantes étaient catalase négative (pas d'apparition de bulles d'air).

En se référant aux données bibliographiques les *Lactobacillus* sont catalase négative (**Dacosta, 2000; Karam et Karam, 2006; Hariri et al., 2009; Mami et al., 2010**).

#### I.3.2.2.Recherche du type fermentaire

Les résultats de la recherche du type fermentaire des 21 souches retenues (sur les 60) montrent que :

- Sur milieu Gibson & Abd El Malek :

Pour 11 souches sur les 21 : aucun déplacement du bouchon de la gélose blanche n'est observé ce qui indique que ce sont des homofermentaires.

Pour les 10 souches restantes, le déplacement du bouchon de la gélose blanche est observé, ce qui indique que ce sont des hétérofermentaires.

- Sur le lait écrémé : les résultats confirment ceux obtenus avec le test de Gibson & Abd El Malek avec une coagulation en masse (séparation du caillé et du lactosérum) pour les 11 souches homofermentaires et coagulation avec production de gaz pour les 10 souches hétérofermentaires.

Les résultats de l'étude du type fermentaire sont résumés dans le **tableau (6)**.

D'après **Givry (2006)** les *Lactobacillus* se divisent en 03 groupes :

- Groupe I : ces bactéries ont un métabolisme strictement homofermentaires, leur seul produit final étant l'acide lactique .Ils ne métabolisent pas les pentoses et ne dégagent pas de CO<sub>2</sub> lors de la fermentation du glucose ou du gluconate.
- Groupe II : les *Lactobacillus* hétérofermentaires facultatifs peuvent changer de voie en fonction du substrat. Ils métabolisent le glucose en acide lactique grâce à la voie homofermentaire et dégradent les pentoses par la 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.
- Groupe III : ces bactéries ont un métabolisme strictement hétérofermentaire, elles fermentent le gluconate et les pentoses. elles produisent de l'acide lactique, de l'acide acétique, du CO<sub>2</sub> et de l'éthanol.

### **I.3.2.3.Profil fermentaire des sucres**

Les résultats de l'attaque des sucres par les souches de *Lactobacillus* étudiées sont résumés dans le **tableau (6)**.

Le profil fermentaire des sucres, constitue un critère important pour l'identification des souches des lactobacilles, il est utilisé avec d'autres tests dans la galerie API 50 CH pour la mise en évidence des bactéries lactiques.

Une souche apte à fermenter un ou plusieurs sucres mis en test, conduit à une acidification du milieu qui se traduit par un virage de l'indicateur de pH (test positif), dans le cas contraire, il n'y a aucun changement du milieu (test négatif).

Les souches ayant un métabolisme lent vis-à-vis des sucres donnent un changement partiel du milieu de culture (résultat variable).

### **I.3.2.4.Recherche de l'activité de l'arginine dihydrolase (ADH)**

D'après nos résultats, 12 souches sur les 21 étudiées était ADH négative, ce qui explique leur capacité à décomposer l'arginine et libérer l'ammoniac par le système de l'arginine dihydrolase. Les résultats du test sont mentionnés dans le **tableau (6)**.

D'après **Larpent et Larpent (1997)** :

- Les homofermentaires obligatoires sont à ADH négative en majorité, c'est l'exemple de : *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbruekii* subsp *bulgaricus*.

- Les hétérofermentaires facultatifs sont à ADH négative en majorité, c'est le cas de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus curvatus* et *Lactobacillus plantarum*.
- Les hétérofermentaires obligatoires sont à ADH positive en majorité, c'est le cas de *Lactobacillus fermentum*.

### I.3.3. Test physiologique

#### I.3.3.1. Croissance à différentes températures

Nos résultats montrent que parmi les 21 souches sélectionnées, il y'a seulement 11 souches qui ont la capacité de pousser à 46°C, ce sont des thermophiles, alors que les 10 souches restantes se développent à 15°C, ce sont des mésophiles (**tableau 6**).

D'après **Badis et al. (2005)** les *Lactobacillus* sont répartis en 3 groupes :

- Le groupe des lactobacilles thermophiles et homofermentaires strictes.
- Le groupe des lactobacilles majoritairement mésophiles et homofermentaires facultatifs.
- Le groupe de lactobacilles mésophiles ou thermophiles et hétérofermentaires stricts.

Le test de croissance à différentes températures est important pour l'identification des espèces de *Lactobacillus*.

Tableau (6) : Les principaux caractères des souches sélectionnées.

| Souche | Saccharose | Glucose | Mannose | Xylose | Ribose | Lactose | Galactose | Tréhalose | Sorbitol | Arabinose | Salicine | Cellobiose | ADH | T° | G <sub>1</sub> |
|--------|------------|---------|---------|--------|--------|---------|-----------|-----------|----------|-----------|----------|------------|-----|----|----------------|
| A21    | -          | +       | +       | +      | -      | +       | +         | +         | +        | +         | +        | -          | -   | 15 | Hét            |
| D6     | ±          | +       | +       | +      | -      | -       | +         | +         | -        | -         | +        | -          | -   | 15 | Hét            |
| B5     | +          | +       | ±       | ±      | ±      | +       | -         | -         | -        | ±         | ±        | +          | -   | 46 | Ho             |
| F4     | -          | +       | -       | -      | -      | +       | ±         | -         | -        | -         | -        | -          | -   | 46 | Ho             |
| B13    | +          | +       | +       | +      | +      | +       | +         | +         | +        | +         | ±        | +          | -   | 15 | Hét            |
| A3     | ±          | +       | +       | +      | +      | +       | +         | -         | -        | -         | +        | +          | -   | 15 | Hét            |
| B16    | -          | +       | -       | -      | -      | -       | +         | -         | -        | ±         | -        | ±          | +   | 46 | Ho             |
| B11    | +          | +       | +       | ±      | -      | -       | +         | +         | -        | +         | ±        | +          | +   | 46 | Ho             |
| A1     | +          | +       | -       | ±      | -      | -       | ±         | -         | -        | -         | -        | -          | -   | 46 | Ho             |
| A20    | -          | +       | +       | -      | -      | -       | -         | -         | -        | +         | -        | -          | -   | 46 | Ho             |
| I2     | -          | +       | +       | +      | +      | +       | +         | +         | -        | +         | -        | -          | +   | 15 | Hét            |
| A12    | +          | +       | +       | -      | +      | +       | ±         | +         | +        | ±         | +        | +          | -   | 15 | Hét            |
| A9     | +          | +       | +       | +      | +      | +       | +         | +         | +        | +         | +        | +          | +   | 15 | Hét            |
| A23    | +          | +       | +       | +      | -      | ±       | ±         | +         | +        | +         | +        | ±          | -   | 46 | Ho             |
| F12    | +          | +       | +       | ±      | +      | +       | +         | -         | -        | +         | -        | -          | -   | 46 | Ho             |
| G4     | +          | +       | -       | -      | -      | +       | -         | +         | +        | +         | -        | +          | -   | 46 | Ho             |
| G6     | -          | +       | +       | ±      | ±      | -       | +         | ±         | +        | +         | +        | +          | ±   | 15 | Hét            |
| H7     | -          | +       | +       | +      | +      | +       | +         | -         | +        | -         | -        | -          | -   | 15 | Hét            |
| F1     | -          | +       | -       | ±      | -      | +       | ±         | -         | +        | +         | -        | -          | -   | 46 | Ho             |
| H8     | +          | +       | +       | +      | +      | ±       | +         | ±         | ±        | +         | -        | ±          | -   | 15 | Hét            |
| H5     | -          | +       | +       | -      | +      | -       | +         | ±         | -        | +         | -        | -          | +   | 46 | Ho             |

+: Résultat positif; -: Résultat négatif; ± : Résultat variable

### I.3.4. Identification des espèces

Les tests biochimiques et physiologiques appliqués sur les souches de *Lactobacillus*, en comparaison avec la bibliographie, ont permis d'établir une banque de 21 souches appartenant à 6 espèces (Dacosta, 2000).

Les espèces du genre *Lactobacillus* identifiés sont illustrées dans le **tableau (7)**.

**Tableau (7) :** Le nom scientifique des espèces identifiées.

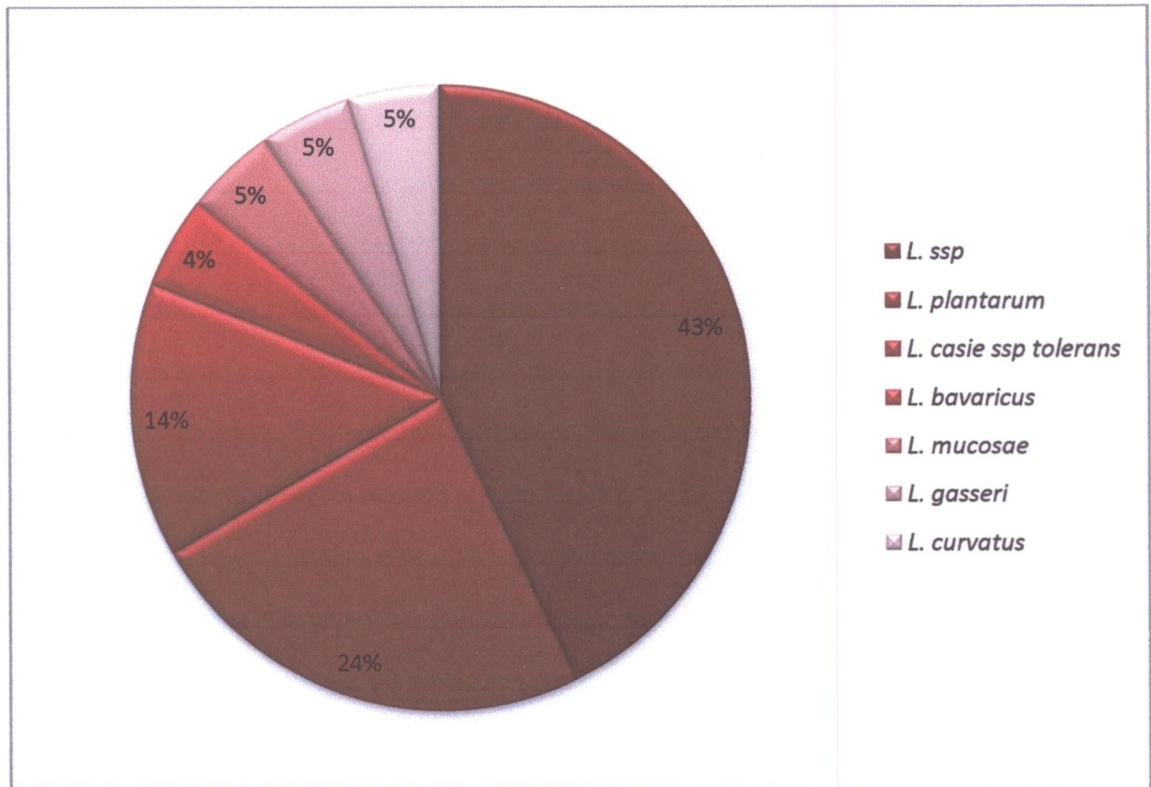
| Code | Le nom scientifique de souche         | Le groupe               |
|------|---------------------------------------|-------------------------|
| A21  | <i>L. plantarum</i>                   | <i>Streptobacterium</i> |
| D6   | <i>Lactobacillus</i> ssp              | -                       |
| B5   | <i>Lactobacillus</i> ssp              | -                       |
| F4   | <i>L. casei</i> subsp <i>tolerans</i> | <i>Streptobacterium</i> |
| B13  | <i>L. plantarum</i>                   | <i>Streptobacterium</i> |
| A3   | <i>L. bavaricus</i>                   | <i>Streptobacterium</i> |
| B16  | <i>L. casei</i> subsp <i>tolerans</i> | <i>Streptobacterium</i> |
| B11  | <i>Lactobacillus</i> ssp              | -                       |
| A1   | <i>L. gasseri</i>                     | <i>Thermobacterium</i>  |
| A20  | <i>Lactobacillus</i> ssp              | -                       |
| I2   | <i>L. mucosae</i>                     | <i>Betabacterium</i>    |
| A12  | <i>L. plantarum</i>                   | <i>Streptobacterium</i> |
| A9   | <i>L. plantarum</i>                   | <i>Streptobacterium</i> |
| A23  | <i>Lactobacillus</i> ssp              | -                       |
| F12  | <i>L. plantarum</i>                   | <i>Streptobacterium</i> |
| G4   | <i>L. casei</i> subsp <i>tolerans</i> | <i>Streptobacterium</i> |
| G6   | <i>Lactobacillus curvatus</i>         | <i>Streptobacterium</i> |
| H7   | <i>Lactobacillus</i> ssp              | -                       |
| F1   | <i>Lactobacillus</i> ssp              | -                       |
| H8   | <i>Lactobacillus</i> ssp              | -                       |
| H5   | <i>Lactobacillus</i> ssp              | -                       |

Selon les résultats montrés dans le **tableau (7)** les espèces de *Lactobacillus* identifiées appartiennent majoritairement soit au groupe I: *Thermobacterium*, soit au groupe II: *Streptobacterium*.



Les 09 souches restantes ont été identifiées comme *Lactobacillus spp* en raison de la différence d'un ou deux caractères par rapport aux souches types répertoriés et de la difficulté connue à classer les espèces de ce genre et par conséquent recourir aux techniques de la biologie moléculaire par PCR et identification du gène codant pour l'ARNr 16S.

En s'appuyant sur les travaux de **Prioult (2003)** et **Kimura *et al.* (2010)**, les espèces retrouvées dans notre étude sont d'origine humaine.



**Figure (7) :** La répartition en pourcentage des espèces de *Lactobacillus* identifiées.

**I.4. Activité antibactérienne**

Les résultats obtenus au cours de ce test, visant à mettre en évidence une éventuelle production de substance inhibitrices par notre collection de *Lactobacillus* humain envers les différentes souches indicatrices, sont résumés dans le **tableau (8)**.

**Tableau (8)** : les résultats de l'antagonisme microbien *Lactobacillus* contre *Lactobacillus*.

| ST \ SI            | (1)                       | (2) | (3)              | (4)                  |
|--------------------|---------------------------|-----|------------------|----------------------|
| <b>F12</b>         | +                         | +   | +                | +                    |
| <b>G6</b>          | +                         | +   | -                | +                    |
| <b>A20</b>         | +                         | +   | +                | +                    |
| <b>B13</b>         | +                         | +   | +                | +                    |
| <b>A21</b>         | +                         | +   | +                | +                    |
| <b>A12</b>         | +                         | +   | +                | +                    |
| <b>G4</b>          | +                         | +   | +                | +                    |
| <b>A23</b>         | +                         | +   | +                | +                    |
| <b>B5</b>          | +                         | +   | +                | +                    |
| <b>A9</b>          | +                         | +   | +                | +                    |
| ST : Souches tests | SI : Souches Indicatrices | +   | Résultat positif | - : Résultat négatif |

Les souches indicatrices portant le code (1), (2), (3), (4) correspondent aux souches : *L. gasseri*, *L. delbruekii*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* respectivement (souches isolées et identifiées au laboratoire de microbiologie de notre faculté par le Docteur Idoui).

la présence d'une zone d'inhibition claire indique l'absence de croissance de la souche indicatrice.

Selon **Mami et al. (2010)** la confrontation entre les mêmes espèces lactiques permet de détecter la présence d'une interaction antagoniste par la présence d'une zone d'inhibition autour des colonies productrices, ce qui nous oriente vers la présence d'une substance proche des bactériocines.

**Tableau (9)** : les résultats de l'antagonisme bactérien entre les souches de *Lactobacillus* isolées et les germes indicateurs.

| ST \ SI | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>E. coli</i> | <i>Pseudomonas. aeruginosa</i> | SARM | <i>Klebsiella</i> | <i>E. coli</i> pathogène |
|---------|------------------------------|----------------|--------------------------------|------|-------------------|--------------------------|
| F1      | +                            | -              | -                              | -    | +                 | -                        |
| H7      | +                            | -              | -                              | +    | +                 | -                        |
| H8      | -                            | -              | +                              | +    | +                 | -                        |
| H5      | -                            | -              | +                              | +    | +                 | -                        |
| B13     | +                            | +              | +                              | +    | +                 | +                        |
| F12     | -                            | +              | -                              | +    | +                 | -                        |
| G4      | -                            | +              | +                              | +    | +                 | -                        |
| G6      | -                            | +              | +                              | +    | +                 | -                        |
| A3      | +                            | +              | -                              | +    | +                 | -                        |
| A9      | +                            | +              | +                              | +    | +                 | -                        |
| A23     | +                            | -              | -                              | -    | +                 | -                        |
| A12     | +                            | -              | -                              | +    | +                 | -                        |
| B5      | -                            | -              | -                              | +    | -                 | -                        |
| A21     | -                            | -              | -                              | +    | -                 | -                        |
| A20     | -                            | -              | -                              | +    | -                 | -                        |
| I2      | -                            | -              | -                              | -    | -                 | -                        |
| A1      | -                            | -              | -                              | -    | -                 | -                        |
| D6      | -                            | -              | -                              | -    | -                 | -                        |
| B11     | -                            | -              | -                              | -    | -                 | -                        |
| F4      | -                            | -              | -                              | -    | -                 | -                        |
| B16     | -                            | -              | -                              | -    | -                 | -                        |
| 1       | -                            | -              | -                              | -    | +                 | -                        |
| 2       | +                            | -              | +                              | -    | +                 | -                        |
| 3       | -                            | -              | +                              | -    | +                 | -                        |
| 4       | +                            | -              | +                              | -    | +                 | -                        |



**Figure (8) :** Résultat de l'activité antagonistique des souches de *Lactobacillus* vis-à-vis *Bacillus subtilis*.

Des 25 souches sélectionnées et soumises au test de l'activité antimicrobiennes (**tableau 9**), seules 19 d'entre elles ont manifestées un antagonisme plus ou moins prononcé vis-à-vis des germes tests. Il s'agit des souches portant le code : A20, A21, A12, B13, A9, A3, H5, G4, G6, F12, B5, A23, F1, H7, H8, 1, 2, 3,4.

Selon **Dacosta (2000)**, le pouvoir inhibiteur des bactéries lactiques dont les *Lactobacillus* provient de différentes causes :

- Production d'acides organiques, essentiellement de l'acide lactique, dont le pouvoir antimicrobien repose sur l'abaissement du pH (qui ne nuit nullement aux bactéries lactiques) ;
- Production de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ;
- production de bactériocines.

A ce stade de notre travail, nous ne pouvons pas déterminer quelle est la cause de l'antagonisme des souches de *Lactobacillus* isolées vis-à-vis des germes indicateurs.

Les souches présentant les meilleurs profils d'inhibition lors de ce test sont codées F12, G4, G6, A23, B5, B13, A20 A9, A21, A12. Elles ont été retenues pour l'essai de l'activité bactériocinogène.

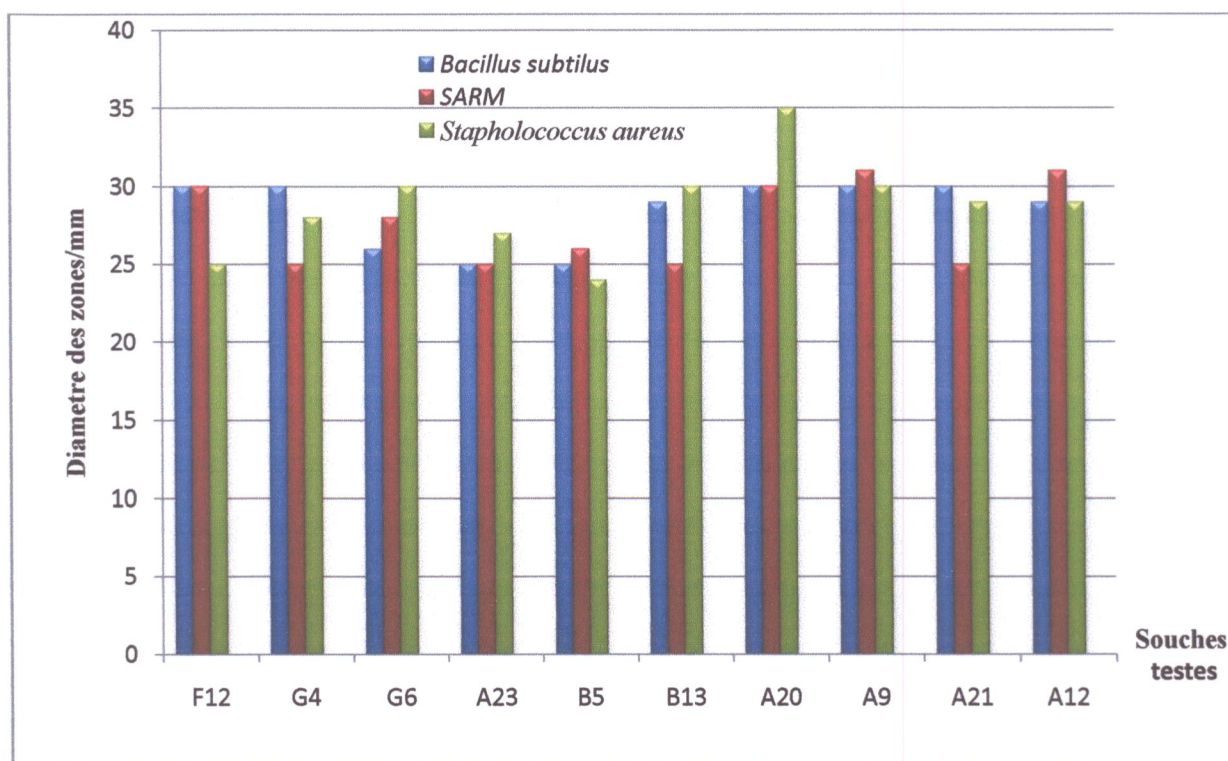
### **I.5.Détermination de l'activité bactériocinogène**

Les résultats de l'activité antimicrobienne des surnageants neutralisés et traités par catalase vis à vis de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline sont résumés dans le **tableau (10)**.

**Tableau (10) :** Activité antimicrobienne des surnageants neutralisés et traités par catalase vis à vis de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline.

| SI \ ST                      | A20 | A9 | A12 | A21 | B13 | G6 | G4 | B5 | F12 | A23 |
|------------------------------|-----|----|-----|-----|-----|----|----|----|-----|-----|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 35  | 30 | 29  | 29  | 30  | 30 | 28 | 24 | 25  | 27  |
| SARM                         | 30  | 31 | 31  | 27  | 25  | 28 | 25 | 26 | 30  | 25  |
| <i>Bacillus subtilis</i>     | 30  | 30 | 25  | 30  | 29  | 26 | 30 | 25 | 30  | 25  |

Les zones d'inhibition sont mesurées en mm



**Figure (9) :** Activité inhibitrice des surnageants neutralisés et traités par catalase vis-à-vis des souches indicatrices (*S. aureus*, *B. subtilis*, SARM).

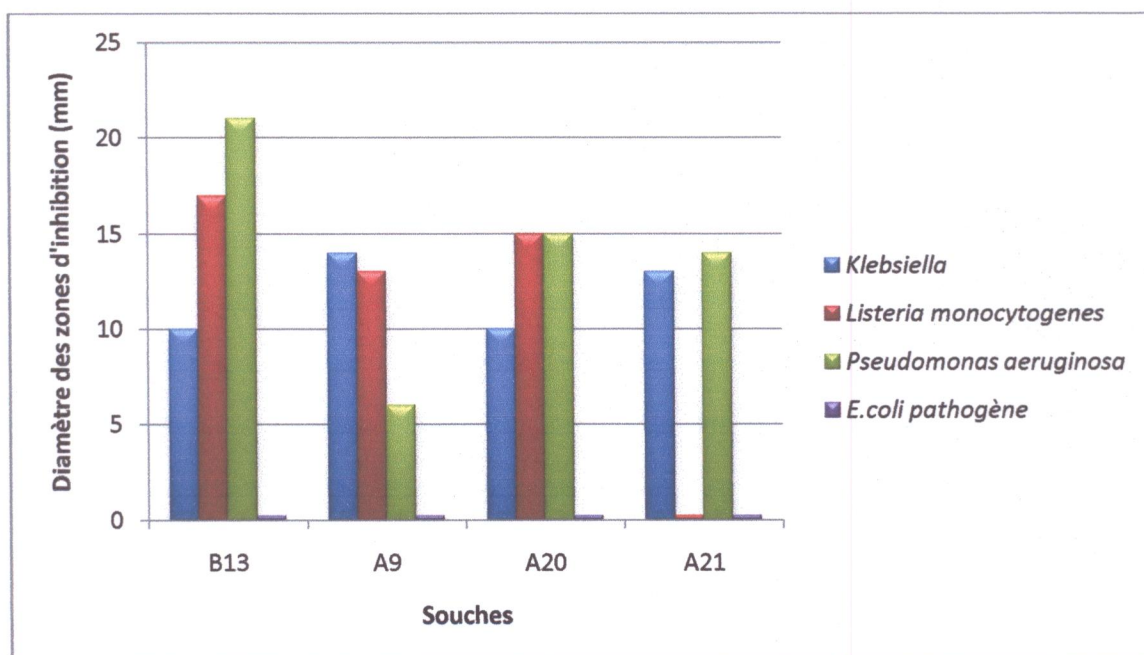
D'après le **tableau (10)** et le **figure (6)**, on remarque que toutes nos souches présentent de bons profils d'inhibition vis-à-vis des germes indicateurs Gram positifs *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline.

Plusieurs auteurs ont rapportés que l'effet des bactériocines est dirigé généralement vers les bactéries Gram positive à cause de la constitution de leurs parois. Par ailleurs, des études récentes ont montrées que certaines bactériocines ont un spectre d'activité assez large et ils agissent aussi bien sur les Gram positifs que sur les Gram négatifs (Lachance, 2000; Naghmouchi, 2007; Dortu et Thonart, 2009)

Les souches B13, A20, A21 et A9 ont été retenues pour le test de l'essai bactériocinogène vis-à-vis des germes Gram négatifs à savoir *Klebsiella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* pathogène et l'espèce pathogène Gram positif *Listeria monocytogenes* redoutable contaminant des produits alimentaires. Les résultats sont indiqués dans le **tableau (11)**.

**Tableau (11) :** Activité bactériocinogène des surnageants neutralisés et traités par catalase vis-à-vis des germes Gram négatif *Klebsiella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* pathogène et *Listeria monocytogenes*.

| SI \ ST                       | B13   | A9    | A20   | A21   |
|-------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| <i>Klebsiella</i>             | 10 mm | 14 mm | 10 mm | 13 mm |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 21 mm | 6 mm  | 15 mm | 14 mm |
| <i>E.coli</i> pathogène       | (-)   | (-)   | (-)   | (-)   |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 17 mm | 13 mm | 15mm  | /     |



**Figure (10) :** Mesure de l'activité inhibitrice des *Lactobacillus* vis-à-vis des souches indicatrices (*Klebsiella*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*).

D'après les résultats montrés dans le tableau et l'histogramme, on remarque que les surnageants neutralisés et traités par catalase des souches B13, A9, A20 et A21 exercent une activité antibactérienne vis-à-vis des germes Gram négatifs à l'exception d'*E.coli*. Des résultats similaires ont été rapportés par certains auteurs (Allouche *et al.*, 2010; Khaoua *et al.*, 1997; Achemchem *et al.*, 2004).

Nos résultats (tableau (10) et tableau (11)) montrent que les surnageants neutralisés et traités par catalase des souches B13, A9, A20, et A21 exercent une activité antibactérienne vis-à-vis des germes indicateurs, aussi bien Gram positif que Gram négatif. Les surnageants ont montrés également une forte inhibition de la croissance de la bactérie pathogène *Listéria monocytogenes* (exception faite du surnageant de la souche A21). Ceci suggère que l'activité des surnageants des souches testées est à large spectre.

L'inhibition par l'acide lactique et l' $H_2O_2$  est exclue par neutralisation du pH du surnageant et l'ajout de la catalase, par conséquent, l'activité antimicrobienne des surnageants des souches de *Lactobacillus* B13, A9, A20, et A21 est probablement due à des substances de nature peptidique tels que les bactériocines (Yang *et al.*, 1992).

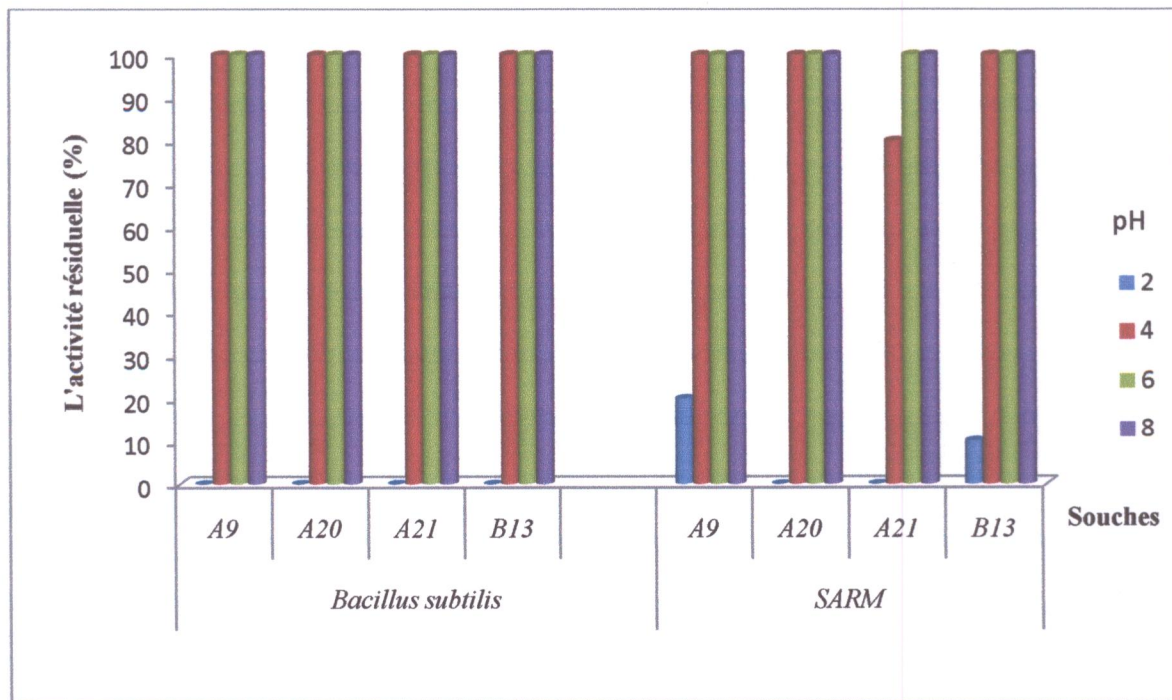
## I.6. Caractérisation de l'extrait bactériocinogène

### I.6.1. Détermination du pH optimum d'action des surnageants neutralisés et traités par catalase (SNTC)

Les résultats de la détermination du pH optimum des surnageants neutralisés et traités par catalase sont mentionnés dans le tableau (12).

**Tableau (12) :** L'effet du pH sur les souches de *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline.

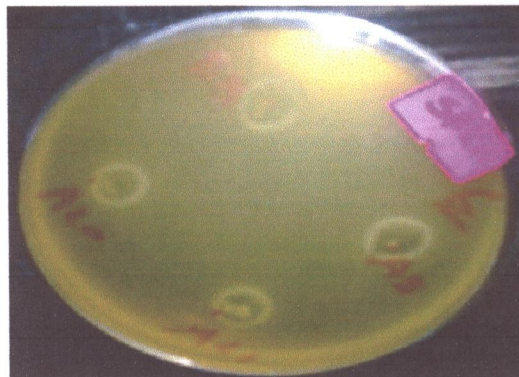
| SI       | <i>Bacillus subtilis</i> |       |       |       | SARM  |       |       |       |
|----------|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| ST<br>pH | A9                       | A20   | A21   | B13   | A9    | A20   | A21   | B13   |
| 2        | 0 mm                     | 0 mm  | 0 mm  | 0 mm  | 2 mm  | 0 mm  | 0 mm  | 10 mm |
| 4        | 28 mm                    | 26 mm | 26 mm | 26 mm | 10 mm | 12 mm | 8 mm  | 10 mm |
| 6        | 28 mm                    | 26 mm | 24 mm | 25 mm | 10 mm | 10 mm | 10 mm | 13 mm |
| 8        | 28 mm                    | 27 mm | 24 mm | 25 mm | 10 mm | 11 mm | 10 mm | 13 mm |



**Figure (11) :** L'activité résiduelle des SNTC soumis à différents pH sur les souches de *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline.

D'après nos résultats, nous remarquons que l'activité des surnageants neutralisés et traités par catalase se manifeste à des pH compris entre 4 et 8, ceci est en accord avec les résultats retrouvés par Metlef et Dilmi-Bouras (2009).

Une récente étude de Sivakumar *et al.* (2010) montra que les bactériocines produites par une souche de *Lactobacillus* sont stables entre des valeurs de pH comprises entre 3 et 9, avec une perte d'activité s'affichant aux pH 9 et 10. Sarika *et al.* (2010), ont rapporté que des bactériocines produites également par des *Lactobacillus* montrèrent une activité maximale à des pH compris entre 5,5 et 7,5.



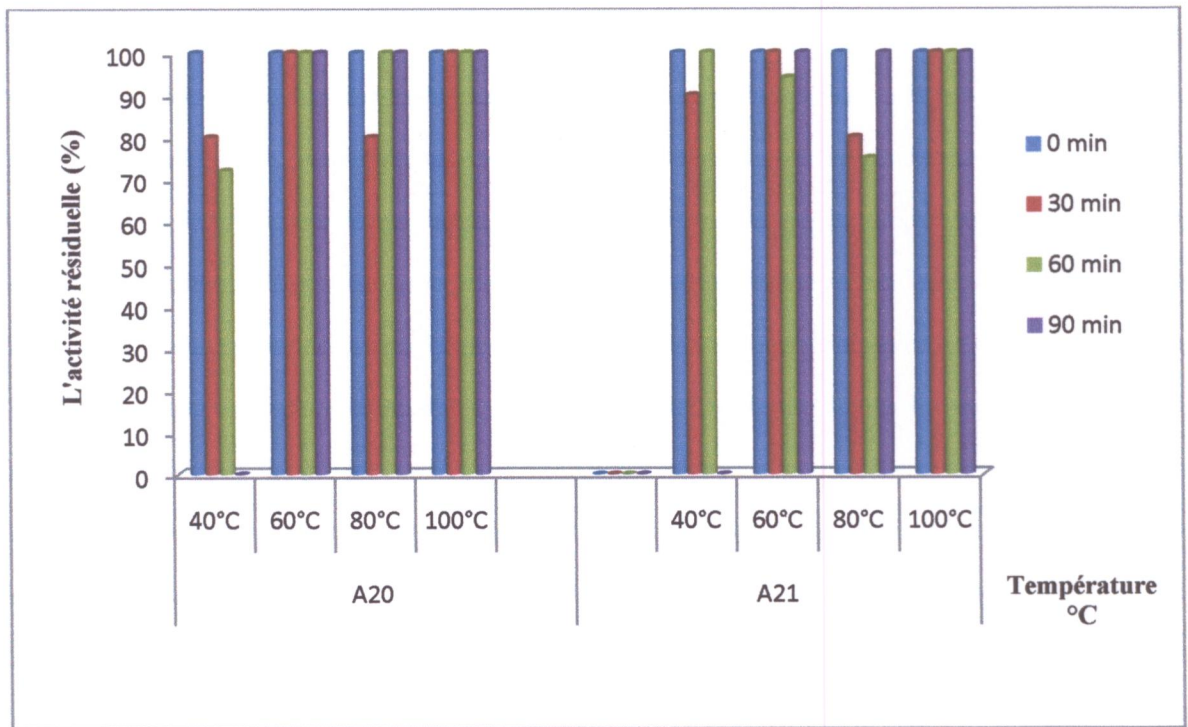
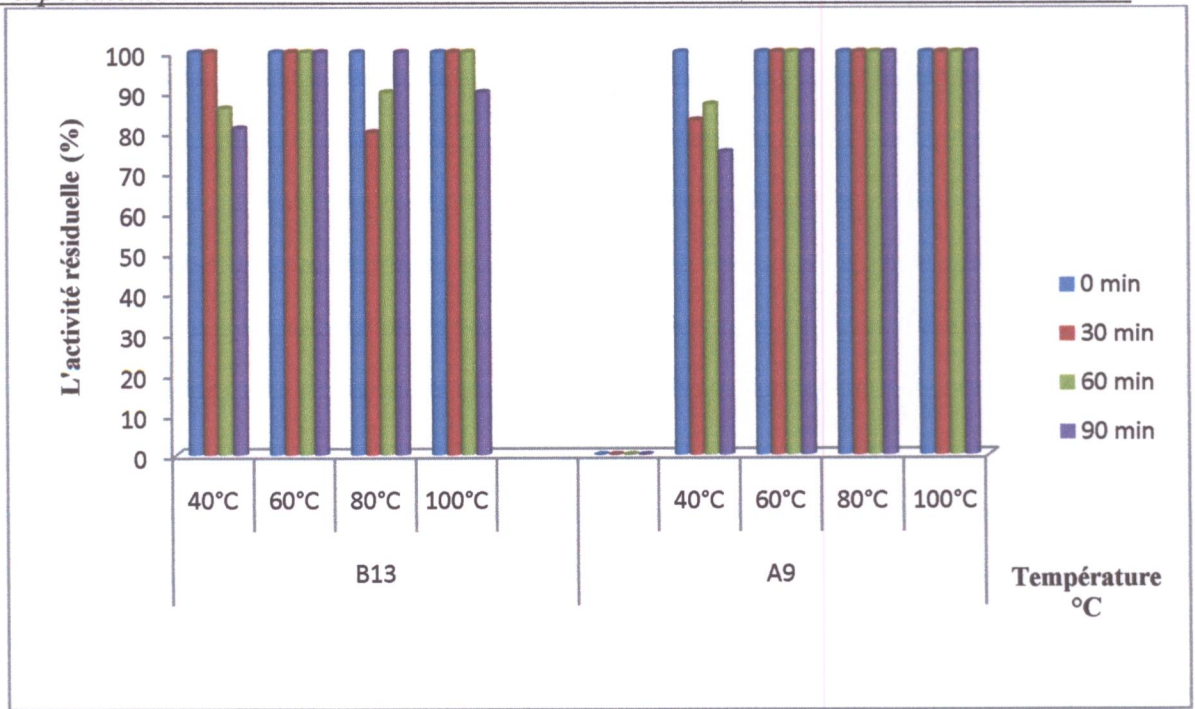
**Figure (12) :** Effet du pH sur l'activité des surnageants neutralisés et traités par catalase sur une souche de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (pH 6).



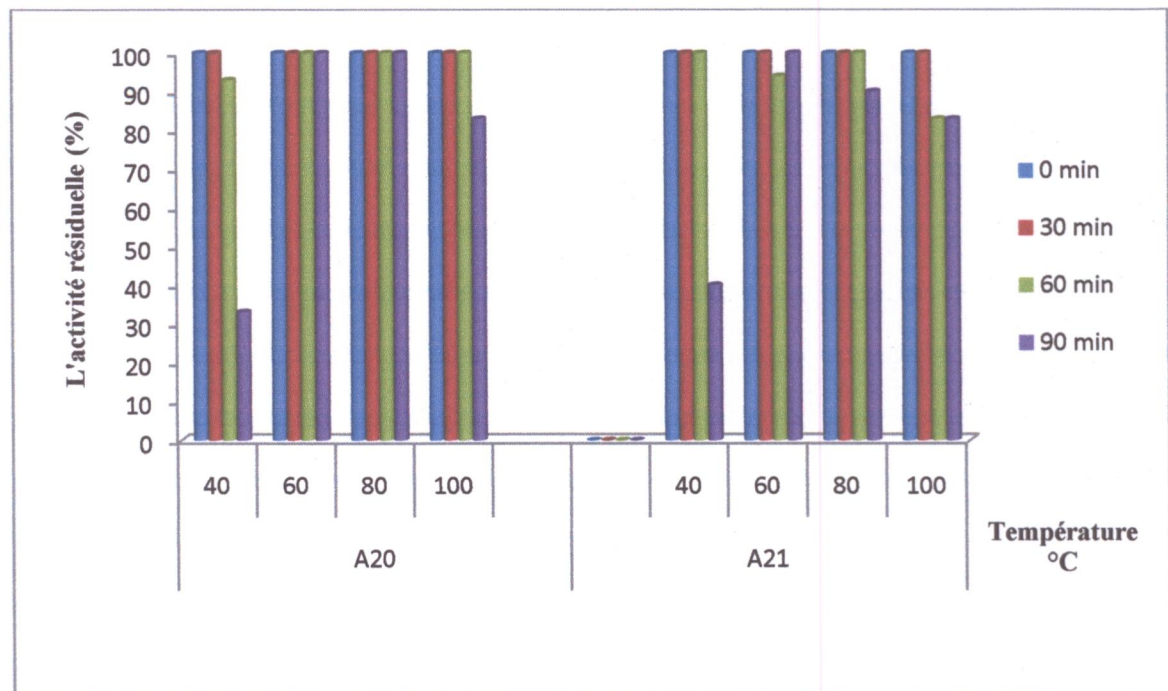
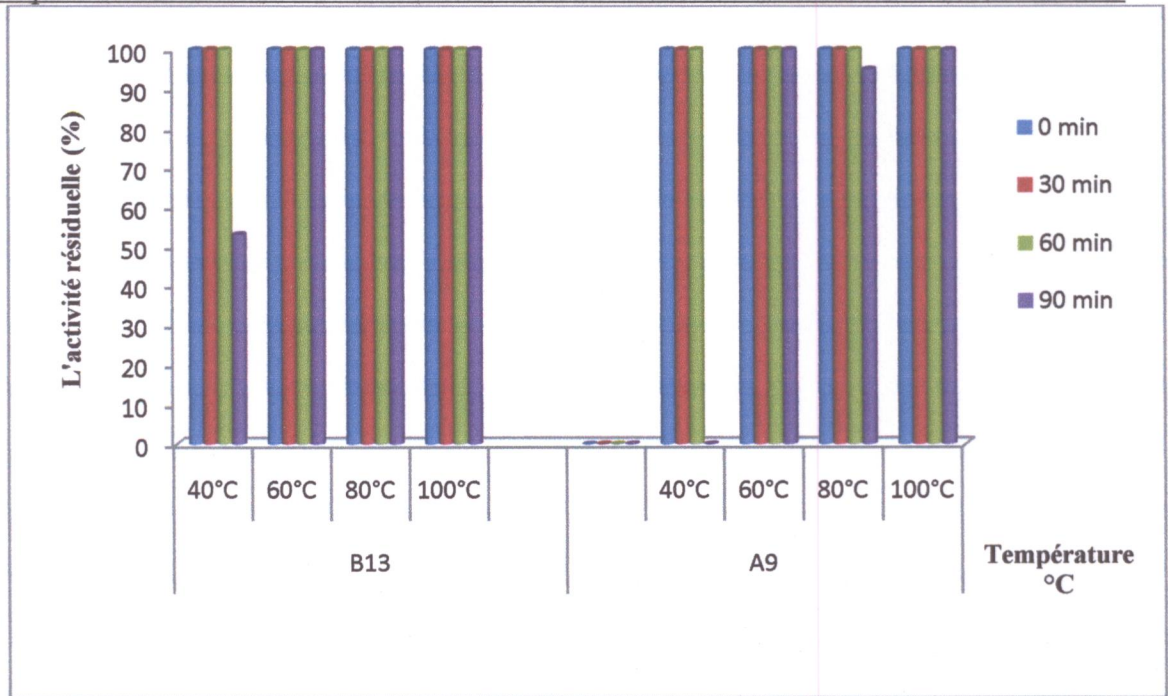
Les résultats obtenus après le traitement thermique des surnageants neutralisés et traités par catalase à différentes températures (40°C, 60°C, 80°C, 100°C) sont résumés dans le **tableau (13)**.

Tableau (13) : Effet de température (en°C) sur le SNTC testés sur le *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (zones d'inhibiti en mm)

| <b>Souche indicatrices : <i>Bacillus subtilis</i></b>                                 |                      |      |      |      |       |      |      |      |       |      |      |      |       |      |      |      |       |
|---|----------------------|------|------|------|-------|------|------|------|-------|------|------|------|-------|------|------|------|-------|
| Souches testés  | B13                  |      |      |      |       | A9   |      |      |       |      | A20  |      |       | A21  |      |      |       |
|   | Température<br>Temps | 40°C | 60°C | 80°C | 100°C | 40°C | 60°C | 80°C | 100°C | 40°C | 60°C | 80°C | 100°C | 40°C | 60°C | 80°C | 100°C |
| 0 min   | 22                   | 15   | 20   | 20   | 20    | 24   | 16   | 20   | 18    | 25   | 15   | 20   | 18    | 20   | 17   | 20   | ]     |
| 30 min  | 30                   | 24   | 16   | 21   | 20    | 20   | 20   | 20   | 18    | 20   | 20   | 16   | 18    | 18   | 20   | 16   | ]     |
| 60 min  | 19                   | 20   | 18   | 20   | 20    | 21   | 22   | 20   | 18    | 18   | 20   | 22   | 20    | 23   | 16   | 15   | ]     |
| 90 min  | 18                   | 22   | 20   | 18   | 18    | 18   | 22   | 20   | 18    | 0    | 18   | 20   | 18    | 0    | 20   | 20   | ]     |
| <b>Souche indicatrices : <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline</b> |                      |      |      |      |       |      |      |      |       |      |      |      |       |      |      |      |       |
| Souches testés  | B13                  |      |      |      |       | A9   |      |      |       |      | A20  |      |       | A21  |      |      |       |
|   | Température<br>Temps | 40°C | 60°C | 80°C | 100°C | 40°C | 60°C | 80°C | 100°C | 40°C | 60°C | 80°C | 100°C | 40°C | 60°C | 80°C | 100°C |
| 0 min   | 15                   | 15   | 16   | 16   | 16    | 16   | 16   | 20   | 16    | 15   | 15   | 18   | 18    | 15   | 17   | 20   | ]     |
| 30 min  | 15                   | 24   | 23   | 19   | 16    | 16   | 20   | 22   | 18    | 15   | 20   | 21   | 18    | 15   | 20   | 22   | ]     |
| 60 min  | 16                   | 20   | 30   | 23   | 16    | 22   | 30   | 18   | 14    | 20   | 30   | 20   | 18    | 16   | 25   | ]    |       |
| 90 min  | 8                    | 22   | 20   | 18   | 0     | 22   | 19   | 20   | 5     | 18   | 19   | 15   | 6     | 20   | 18   | ]    |       |



**Figure (13)** : L'activité résiduelle des SNTC soumis à différentes températures sur *Bacillus subtilis*.



**Figure (14) :** L'activité résiduelle des SNTC, soumis à différentes températures sur SARM.

Les résultats retrouvés dans notre travail montrent que les SNTC sont stables à la chaleur à 100°C jusqu'à 90 minutes. Des résultats similaires ont été rapportés par des travaux récents appartenant à **Ogunbanwo et al. (2003)** ainsi qu'à **Sivakumar et al. (2010)**. Les auteurs ont démontré que des bactériocines de *Lactobacillus* restent stables après traitement à 100°C durant le même temps d'exposition.

Selon Dortu et Thonard (2009), les bactériocines sont classées en 4 groupes. Les bactériocines de la classe III sont thermosensibles, ceci laisse à penser que nos substances peptidiques supposées comme bactériocines, appartiennent à l'une des trois classes restantes.



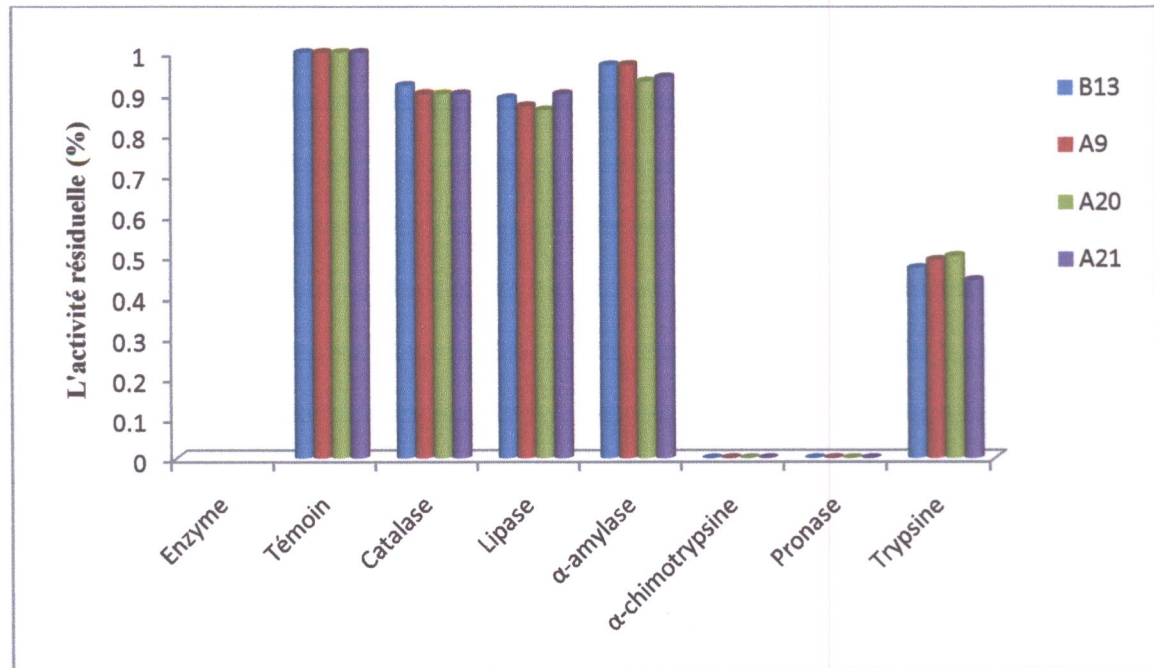
**Figure (15) :** L'activité résiduelle du SNTC sur *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline après traitement par chaleur (80°C pendant 60 min)

### I.6.3. Effet des enzymes sur l'activité antimicrobienne des surnageants

Les résultats concernant l'effet des enzymes sur les SNTC de nos souches testées sur le SARM sont représentés dans le **tableau (14)**.

**Tableau (14):** Effet des enzymes sur les SNCT de nos souches testés sur *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline.

| Souches / Enzymes   | B13              | A9               | A20              | A21              |
|---|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Témoin  | 34 mm<br>(100 %) | 29 mm<br>(100 %) | 28 mm<br>(100 %) | 30 mm<br>(100 %) |
| Catalase  | 31 mm<br>(92 %)  | 26 mm<br>(90 %)  | 25 mm<br>(90 %)  | 27 mm<br>(90 %)  |
| Lipase  | 30 mm<br>(89 %)  | 25 mm<br>(87 %)  | 24 mm<br>(86 %)  | 27 mm<br>(90 %)  |
| $\alpha$ -amylase   | 33 mm<br>(97 %)  | 28 mm<br>(97 %)  | 26 mm<br>(93 %)  | 28 mm<br>(94 %)  |
| $\alpha$ -chymotrypsine   | 0 mm<br>(0 %)    | 0 mm<br>(0 %)    | 0 mm<br>(0 %)    | 0 mm<br>(0 %)    |
| Pronase   | 0 mm<br>(0 %)    | 0 mm<br>(0 %)    | 0 mm<br>(0 %)    | 0 mm<br>(0 %)    |
| Trypsine  | 16 mm<br>(47 %)  | 14 mm<br>(49 %)  | 14 mm<br>(50 %)  | 13 mm<br>(44 %)  |
| Les chiffres entre parenthèse représentent l'activité résiduelle des surnageant neutralisée traités par les enzymes |                  |                  |                  |                  |



**Figure (16) :** L'activité résiduelle des surnageants neutralisés et traités par les enzymes.

D'après nos résultats et les graphes, on remarque qu'après traitement des surnageants neutralisés par la catalase, ces derniers, conservent leur totale activité. Ceci explique que l'inhibition des SARM n'est pas due au peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ .

On remarque également, que l'activité antimicrobienne contre SARM des surnageants traités par les lipases et les amylases est conservée, ceci laisse à penser que les substances présumés comme bactériocines ne contiennent pas de fractions lipidiques ni glucidiques et par conséquent n'appartiennent pas à la classe III, ce qui concorde avec nos résultats de la thermorésistance.

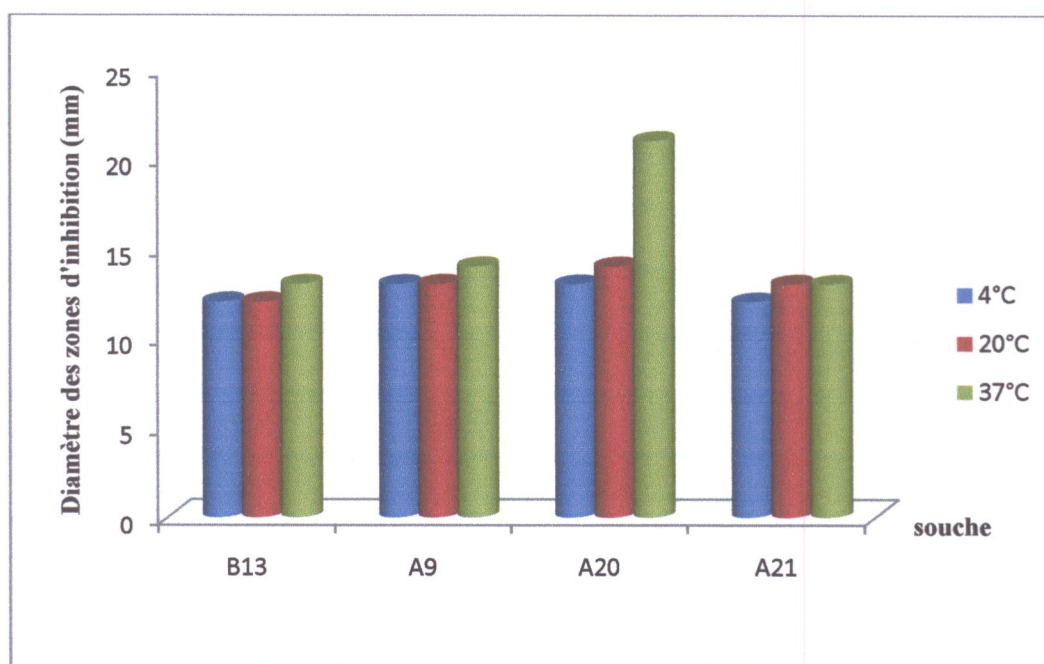
Par ailleurs, on constate qu'avec la pronase et l' $\alpha$ -chymotrypsine, il y'a une perte totale de l'activité antimicrobienne des surnageants testés. Par contre, avec la trypsine, il y'a une perte partielle de l'activité (perte de 56% de l'activité). Plusieurs auteurs ont rapportés des résultats similaires de la perte partielle ou totale de l'activité des bactériocines ou des substances considérés comme telles, après traitement par des enzymes protéolytiques. (Ogunbanwo *et al.*, 2003; Diop *et al.*, 2007; Achemchem *et al.*, 2004; Metlef et Dilmi-Bouras, 2009; Allouche *et al.*, 2010). Ceci suggère que les substances antimicrobiennes de nos surnageants testés sont probablement des bactériocines.

#### I.6.4. Effet du stockage sur l'activité bactériocinogène des surnageants

Les résultats obtenus après stockage de 7 jours à différentes températures sont résumés dans le **tableau (15)**

**Tableau (15):** Effet du stockage à différentes températures sur l'activité antimicrobienne des SNTC testés sur SARM.

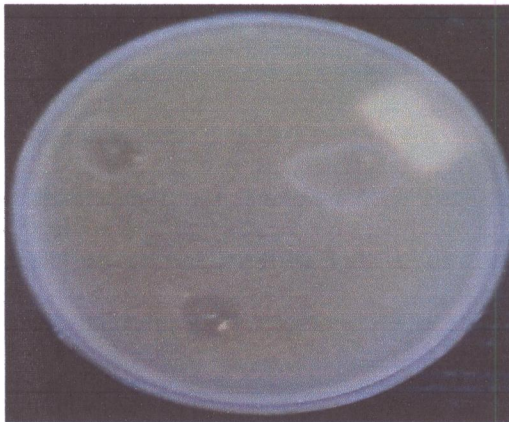
| Souches \ T° | B13   | A9    | A20   | A21   |
|--------------|-------|-------|-------|-------|
| 4°C          | 12 mm | 13 mm | 13 mm | 12 mm |
| 20°C         | 12 mm | 13 mm | 14 mm | 13 mm |
| 37°C         | 13 mm | 14 mm | 21 mm | 13 mm |



**Figure (17) :** Effet du stockage à différentes températures sur l'activité antimicrobienne des SNTC testés sur SARM.

Après 7 jours de stockage à 4°C, 20°C et 37°C, les surnageants testés contre SARM ont conservés, majoritairement, leurs activités, exception faite pour le surnageant de la souche A20 qui perd 34% et 43% de son activité à 20°C et 4°C respectivement.

Selon Galvez *et al.* (2007), la température de stockage peut réduire ou non l'activité des bactériocines (Dortu et Thonard, 2009).



**Figure (18):** Effet du stockage à différentes températures sur l'activité antimicrobienne des SNTC testés de la souche A20 sur SARM.



# Conclusion générale

L'objectif de cette étude était d'isoler des souches de *Lactobacillus* à pouvoir bactériocinogène à partir de selles d'enfants collectés dans différentes régions de la wilaya de Jijel.

Dans un premier temps nous avons isolées 120 souches de bactéries lactiques dont 21 ont été identifiées comme *Lactobacillus*. Par ailleurs, l'identification des espèces, selon le profil morphologique, biochimique et physiologique a conduit à la répartition suivante : 05 souches de *Lactobacillus plantarum*, 03 souches de *Lactobacillus casei* subsp *tolerans*, une souche de *Lactobacillus bavaricus*, une souche de *Lactobacillus mucosae*, une souche de *Lactobacillus curvatus*, une souche *Lactobacillus gasseri* et 09 souches *Lactobacillus* spp. présumées d'origine humaine.

Les tests visant à révéler le potentiel antagoniste des souches identifiées et de leur surnageant respectif, suivi d'une caractérisation de l'agent inhibiteur supposé bactériocinogène, nous ont amenés à :

- 19 souches ayant montrées une activité antagonistique entre eux et vis -à-vis des souches pathogènes.
- Les résultats obtenus avec les surnageants neutralisés et traités par catalase excluent l'inhibition des souches indicatrices par l'acide lactique et le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et converge vers la présence de substances antimicrobiennes présumées comme bactériocines.
- Les surnageants des souches A9, A20, A21, B13 ont montrés les meilleurs profils inhibiteurs.
- Les spectres d'activités des surnageants de ces souches sont assez larges, ils agissent aussi bien sur les Gram positifs (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline) que sur les Gram négatifs (*Klebsiella*, *Pseudomonas aeruginosa*)

La caractérisation des substances présumées comme bactériocines a montrée que :

- l'activité des surnageants, neutralisés et traités par catalase, se manifeste à des valeurs de pH compris entre 4 et 8.
- Les surnageants, neutralisés et traités par catalase sont stables à la chaleur à 100°C jusqu'à 90 minutes.
- Les substances antimicrobiennes de nos surnageants neutralisés sont de nature protéique, probablement des bactériocines.
- L'activité des surnageants neutralisés et traités par catalase est conservée après stockage.

Les caractéristiques intéressantes qu'offrent les surnageants des 04 souches de *Lactobacillus* retenues, entre autres, leur pouvoir bactériocinogène assez large, la stabilité à la chaleur et au stockage et la nature protéique, justifient leur conservation pour des études plus approfondies et complémentaires afin de confirmer nos résultats et d'identifier ces substances antimicrobiennes.

**Références**

**bibliographiques**

## Références bibliographiques

**Achemchem F., Abrini J., Martinez-Bueno M., Valdivia E et Maqueda, M.** (2004). Purification et caractérisation d'une bactériocine anti *Listeria* produite par *Enterococcus faecium* F-420 isolé à partir de lait cru de chèvre. Congrès international de biochimie. Merrakech, Maroc, 3-6 Mai 2004. pp 384-388.

**Allouche F. N., Hellal A et Laraba A.** (2010). Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. *Nature & Technologie*. n°3. : pp 13-20.

**Annuk H.** (2002). Selection of medical plants and intestinal lactobacilli as antimicrobial components for functional foods. Université Tartu. Estonia.

**Badis A., Sellami L., Guetarmi D., Kihal M et Ouzrout R.** (2005). Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales « Arabia et Kabyle ». *Sciences & Technologie C-n°23* : pp 30-37.

**Bekhouche F.** (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. Université de Mentouri, Constantine.

**Bromberg R; Moreno I; Zaganini C L; Delboni R and De Oliveira J.** (2004). Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from meat and Meat products and its spectrum of inhibitory activity. *Brazilian Journal of Microbiology*. 35:137-144.

**Cenatiempo Y., Berjeaud J.M., Biet F., Fermaux C., Hechard Y et Robichon D.** (1996). Bactériocines de bactéries lactiques : Données récentes sur leur structure, leur mode d'action et leurs déterminants génétiques. *Lait*. 76 : 169-177. Elsevier, INRA.

**Cuq J.L.** (2007). Contrôle microbiologique des aliments in : « Microbiologie alimentaire ». 1<sup>ière</sup> édition française. Paris, pp 18.

**Dacosta Y.** (2000). La bio-protection des aliments. Edition. Yves Dacosta. Paris. pp 14-23.

**Denis R., Amiot J., Boutin Y.** (2006). Qualité et efficacité des probiotiques. AISA.

**Diop M.B.** (2008). Sélection et caractérisation de souches bactériennes aptes à améliorer la technique de conservation du poisson par salaison au Sénégal. Thèse de Doctorat. Université de Gembloux. Belgique.

**Diop M.B., Dubois-Dauphin R., Tine E., Ngom A., koDestain J., Thonart P.** (2007). Bacteriocin producers from traditional food products. *Biotechnol. Agron. Soc. Environn.* 11 (4) : pp 275-281.

**Dortu C et Thonart P.** (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : Caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environn.* 13(1) : pp143-154.

**Dortu C.** (2008). Isolement d'une bactérie lactique produisant de la sakacin G et utilisation sur des matrices alimentaires. Thèse Doctorat. Université de Gembloux. Belgique.

**Doumandji A., Hellal A et Saidi N.** (2010). Purification de la bactériocine à partir de *Lactobacillus acidophilus* 11. Rev. Microbiol. Ind. San et Environn. 4(2) : pp 25-47.

**Garry P., Christieans S et Cartier P.** (2008). Procèdes de bio-préservation. 12<sup>ième</sup> Journées des « Sciences du Muscle et technologie des viandes ». Clermont-Ferrand. France. pp203-207.

**Givry S.** (2006). Optimisation de procédés de fermentation lactique sur sirop de son de blé et Purification et caractérisation d'une arabinose isomérase de *Lactobacillus bifementans*. Thèse de Doctorat. Université de Reims Champagne-Ardenne. France.

**Guiraud J.P.** (1998). Microorganismes intervenant dans l'industrie alimentaire in " microbiologie alimentaire". édition Duondo. Paris. pp 90-91.

**Grattepanche F.** (2005). Étude d'un système de préfermentation en continu du lait par une culture mixte immobilisée fonctionnelle. Thèse Doctorat. Université Laval. Québec.

**Hariri A., Ouis N., Sahnouni F et Djilali B.** (2009). Mise en œuvre de la fermentation de certains ferments lactiques dans des milieux à base des extraits de caroube. Microbiol. Ind. San et Environn. pp 37-55.

**Izquierdo E.** (2009). Les protéines bactériennes en tant que biomarqueurs de l'activité probiotique. Thèse de Doctorat. Université de Strasbourg. Strasbourg.

**Jasniewski J.** (2008). Etude des mécanismes d'action de bactériocines de la sous classe IIa. Thèse de Doctorat. Nancy-Université. France.

**Karam H. Z et Karam N. E.** (2006). Bactéries lactiques du lait de chamelle d'Algérie: mise en évidence de souches de *Lactococcus* résistantes au sel. Tropicultura. 24(3) : 153-156.

**Karam N.E., Karam H., Lazreg L et Dalache F.** (2008). Bactériocins of lactic acid bacteria: characterization of a bactériocin from Enterococcus BO2. Renc. Rech. Ruminants: 15.

**Khaoua S., Elhaloui N.E et Lefebvre G.** (1996). Caratérisation et détermination de la structure partielle d'une bactériocine de la souche *Lactococcus lactis* C16. Actes Inst.Agron. Vet. 17(1):15-25.

**Kimura K., NishioT., Mizoguchii C and Koizumi A.** (2010). Analysis of the Composition .of Lactobacilli in Humans. Bioscience Microflora Vol, 29 (1), pp. 47–50.

**Klein G., Pack A., Bonaparte CetReuter G.** (1998): Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. Int. J. Food Microbiol. 41: 103-125.

**Labioui H., El moualdi L., El ychioui M et Ouhssine M.** (2005). Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. Bull. Soc. Pharm. 144:237-250.

**Lachance M.** (2000). Purification et caractérisation d'une bactériocine produite par *Lactococcus lactis* ssp. Lactis MJC15. Mémoire de maître ès sciences. Université Laval. Québec.

**Larpent J.P et Larpent-Gourgaud M.** (1997). Memento technique microbiologie. 3ème Edition. Toc et Doc, Lavoisier, Paris. pp 549-550.

- Leroi F.** (2009). Bactéries lactiques et applications alimentaires Partie 2 : les produits de la mer in « Physiologie, métabolisme, génomique et applications industrielles des bactéries lactiques ». Drider D et Prévost H. Économica. France. pp 459-474.
- Leveau J.Y et Bouix M.** (1993). Les microorganismes d'intérêt industriel in « Microbiologie industrielle ». édition TEC et DOC. Lavoisiers, Paris. pp : 170.
- Leveau J.Y., Bouix M et De Roissart H.** (1991). La fore lactique in "techniques d'analyse et de controle dans les I.A.A". 2 edition. TEC&DOC. Lavoisier Apria. Paris. Vol 3: pp 2-4.
- Mami A., Hamedi A.R., Henni J. E., Kerfouf A and Kihal M.** (2010). Activité antibactérienne de *Lactobacillus plantarum* isolée du lait cru de chèvre d'Algérie vis à vis de *Staphylococcus aureus*. Les technologies de laboratoire. vol (5) : 26-33.
- Metlef S et Dilmi-Bouras A.** (2009). Effet antagoniste de *Lactococcus lactis*, souches extrêmophiles locales, sur des espèces de la flore intestinale résidente. Nature et Technologie. n°1 :33-44.
- Morisset D.** (2003). Etude des relations structure/ fonction d'une bactériocine anti- *Listeria*, la mésentéricine Y105. Thèse de Doctorat. Université de Poitiers. France.
- Naghmouchi K.** (2007). Divergicine M35, une nouvelle bactériocine produite par *Carnobacterium divergens* M35 : Caractérisation moléculaire du mécanisme d'action antimicrobien et du phénomène de résistance. Thèse de Doctorat. Université Laval. Québec.
- Ogunbanwo S.T., Sanni A.I and Onilude A.A.** (2003). Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. Afr J Biotechnol. 2(8):219-227.
- Ouadghiri M.** (2009). Biodiversité des bactéries lactiques dans le lait cru et ses dérivés « Lben » et « Jben » d'origine marocaine. Thèse de Doctorat. Université Mohammed V- AGDAL. Maroc.
- Pilet M.F., Magras C et Federighi M.** Bactéries lactiques in : « Manuel de bactériologie alimentaire ». (Sutra L., Frederichi M et Jouve J.L). (1998). Edition, Polytechnica. Paris. pp 240.
- Pot B.** The taxonomy of lactic acid bacteria in bactéries lactiques De la génétique aux ferments (Corrieu G ; Luquet F.M). (2008). TEC&DOC. Lavoisier. Paris. pp 4.
- Prescott L.M ., Harley J.P et Klein D.A.** (2003). Les bactéries: les Gram positif pauvre en GC in : « Microbiologie ». 2ème édition Française .Paris, pp. 529.
- Prioult G.** (2003). Effet des probiotiques sur l'induction et le maintien de la tolérance orale à la B lactoglobuline chez la souris et étude de leurs mécanisme d'action. Thèse de Doctorat. Université Laval, Canada.
- Rapport OMS.** (2001). Consultation mixte d'experts FAO/OMS sur l'évaluation des propriétés sanitaires et nutritionnelles des probiotiques dans les aliments, y compris le lait en poudre contenant des bactéries lactiques vivantes. Cordoba. Argentine.

**Rigaux P.** (2008). Evaluation des propriétés immunomodulatrices de la bactérie lactique *Lactobacillus plantarum* NCIMB8826 dans le cadre de l'allergie aux acariens. Thèse de Doctorat. Université libre de Bruxelles. Belgique.

**Saad N.** (2010). Caractérisation d'entités moléculaires de surface impliquées dans la relation de la bactérie probiotique *Lactobacillus plantarum* 299v avec l'hôte : approche in vitro. Thèse de Doctorat. Université de Limoge. France.

**Sarika A.R., Lipton A.P and Aishwarya M.S.** (2010). Bacteriocin production by a new isolate of *Lactobacillus rhamnosus* GP1 under different culture conditions. *Advance. J. Food sci. Technol.* 2(5): pp 291-297.

**Sivakumar N., Rajaman and Saif A.B.** (2010). Partial Characterization of Bacteriocins produced by *Lactobacillus acidophilus* and *Pediococcus acidilactici*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 53(5): pp1177-1184.

**Tagg J.R., Da jani A.S et Wannamaker L.W.** (1976). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* 40:pp722-756.

**Tailliez P.** (2004). Les lactobacilles : propriétés, habitats, rôle physiologique et intérêt en santé humaine. *Antibiotiques*, 2004. Masson, Paris. 6 : pp 35-41.

**Tankovic J.** (2007). Bacilles à Gram positif (à l'exception des anaérobies) in : « Bactériologie médical : Techniques usuelles ». **Denis F., Ploy M.C., Martin C., Bingen E et Quentin R.** Masson. France. pp 417-441.

**Yang R., Monty C. J and Ray B.** (1992). Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and environmental microbiology.* 58 (10): pp3355-3359.

# Annexe I

## Milieux d'identification :

### -MRS (Man, Rogosa et Sharpe) (bouillon et gélose)

|                                     |         |
|-------------------------------------|---------|
| • Peptone.....                      | 10 g    |
| • Extrait de viande.....            | 8 g     |
| • Extrait de levure.....            | 4 g     |
| • Acétate de sodium.....            | 5 g     |
| • Phosphate dipotassique.....       | 2 g     |
| • Citrate d'ammonium.....           | 2 g     |
| • Sulfate de magnésium.....         | 2 g     |
| • Sulfate de manganèse.....         | 0,05 g  |
| • Glucose.....                      | 20 g    |
| • Tween 80.....                     | 1 ml    |
| • Agar (dans le cas de gélose)..... | 15 g    |
| • Cystéine.....                     | 1 g     |
| • Eau distillée qsp.....            | 1000 ml |

pH = 6,2

### -M.E.V.A.G sans sucre

|                              |       |
|------------------------------|-------|
| • Extrait de viande.....     | 3 g   |
| • Chlorure de potassium..... | 5 g   |
| • Rouge de phénol.....       | 20 mg |
| • Agar.....                  | 15 g  |

### -Milieu Gibson & Abd El Malek

|                                   |        |
|-----------------------------------|--------|
| • Extrait de levure.....          | 2,5 g  |
| • Glucose.....                    | 50 g   |
| • Jus de tomate.....              | 100 g  |
| • Lait .....                      | 50 ml  |
| • Gélose nutritive ordinaire..... | 200 ml |

pH = 5,6



### - Milieu Moëller à l'arginine

Le milieu de base est le suivant :

- Peptone.....5 g
- Extrait de viande.....5 g
- Pérydoxal.....0,005 g
- Solution aqueuse de pourpre de promocréol à 2%.....5 m
- Glucose.....0,5 g
- Eau distillée qsp.....1000 ml

pH = 6,4

### -Gélose Mueller Hinton

- Infusion de viande de bœuf.....300 ml
- Peptone de caséine.....17,5 g
- Amidon de maïs.....1,5 g
- Agar.....17 g

pH = 7,4

### -Gélose nutritive

- Peptone.....10 g
- Extrait de viande.....5 g
- Chlorure de sodium .....5 g
- Agar .....15g

pH=7.5

### -Lait écrémé stérile à 10%

- Lait écrémé stérile en poudre.....10 g
- Eau distillée.....100 ml

### -Bouillon nutritif

- Peptone.....10 g
- Extrait de viande.....5 g
- Chlorure de sodium (facultatif selon la formule).....5 g

pH = 7,2

## Annexe II

### Réactifs

#### -Violet de gentiane

- violet de gentiane.....1 g
- Ethanol à 90%.....10 ml
- Phénol .....2 g
- Eau distillée.....100 ml

#### -Fuchine de Ziehel

- Fushine basique .....1 g
- Alcool éthylique à 90%.....10 ml
- Phénol ..... 5 g
- Eau distillée.....100 ml

#### -Lugol

- Iode.....1 g
- Iodure de potassium.....2 g
- Eau distillée..... 300 ml

#### -Soude Dornic : soude N/9

- Soude pure.....4,4 g
- Eau distillée.....100 ml

|   |  |
|---|--|
| <b>Membres du Jury :</b><br><b>Président : Dr. Laggoune. S</b><br><b>Encadreur : Mme Bousdira. F</b><br><b>Examinatrice : Mme Azzouz. W</b>   | <b>Date de la soutenance : 04/06/2011</b><br><b>Réalisé par :</b><br><b>Benhadji Ilhem</b><br><b>Charef Meryem</b> |
| <b>Thème</b><br><b>Screening de souches bactériocinogènes de <i>Lactobacillus</i> isolées à partir de selles d'enfants</b>  |  |
| <b>Résumé</b><br><p>L'objectif de cette étude était d'isoler des souches de <i>Lactobacillus</i> à pouvoir bactériocinogène à partir de selles d'enfants collectées dans différentes régions de la wilaya de Jijel. 120 souches ont été collectées dont 21 appartenaient au genre <i>Lactobacillus</i>. L'identification des espèces, selon le profil morphologique, biochimique et physiologique a conduit à la répartition suivante : 05 souches de <i>Lactobacillus plantarum</i>, 03 souches de <i>Lactobacillus casei ssp tolerans</i>, une souche de <i>Lactobacillus bavaricus</i>, une souche de <i>Lactobacillus mucosae</i>, une souche de <i>L. curvatus</i>, une souche de <i>L. gasseri</i> et 09 souches <i>Lactobacillus</i> spp. L'essai de l'activité bactériocinogène des surnageants neutralisés et traités par catalase à montrer que : l'inhibition vis-à-vis des germes indicateurs converge vers des substances présumées bactériocines avec des meilleurs profils inhibiteurs pour les souches A9, A20, A21 et B13. La caractérisation des substances présumées comme bactériocines a montré qu'elles sont de nature protéique, thermostables à 100 pendant 90 minutes, possèdent un spectre d'activité assez large et inhibe <i>Listeria monocytogenes</i>. Cette activité se manifeste entre pH compris entre 4-8 et est conservée après stockage de 7 jours à 4°C, 20°C et 37°C.</p> <p><b>Mots clés :</b> <i>Lactobacillus</i>, bactériocines. Antagonisme.</p> |  |
| <b>Abstract</b><br><p>The aim of this study was to isolate strains of <i>Lactobacillus</i> with ability to produce bacteriocines from feces of children collected in different regions of the wilaya of Jijle. 120 strains were collected of which 21 belonged to the genus <i>Lactobacillus</i>. Species identification, according to morphological, biochemical and physiological profiles led to: 05 strains of <i>Lactobacillus plantarum</i>, 03 strains of <i>L. casei ssp tolerans</i>, strain of <i>L. curvatus</i>, strain of <i>L. gasseri</i>, strain of <i>L. bavaricus</i>, strain of <i>Lactobacillus mucosae</i> and 09 strains of <i>Lactobacillus</i> spp.</p> <p>The test of the activity of supernatants neutralized and treated with catalase has shown that: inhibition against indicator organisms leads to substances suspected bacteriocins with the best profiles inhibition for strains A9, A20, A21 and B13. The characterization of substances suspected as bacteriocins showed that they are protein in nature, heat stable at 100 for 90 minutes, has a broad spectrum of activity and inhibits <i>Listeria monocytogenes</i>. This activity occurs between pH 4 to 8 and is retained after 7 days storage at 4°C, 20°C and 37°C.</p> <p><b>Key words:</b> <i>Lactobacillus</i>, bacteriocins, Antagonism.</p>  |  |
| <p style="text-align: right;"><b>ملخص</b></p> <p>كان الهدف من هذه الدراسة القيام بعزل سلالات من <i>Lactobacillus</i> ذات قدرة بيكتريوسينية من براز الأطفال تم جمعها من مناطق مختلفة من ولاية جيجل. تم جمع 120 سلالة منها 21 سلالة تنتمي إلى سلالة <i>Lactobacillus</i> و بعد تحديد أنواعها وفقا للمعايير المورفولوجية، البيوكيميائية و الفيزيولوجية وجدنا ان توزيع السلالات كان كالآتي :</p> <p>5 سلالات تنتمي إلى <i>Lactobacillus plantarum</i>, 3 سلالات تنتمي إلى <i>Lactobacillus casei ssp tolerans</i> ، سلالة واحدة تنتمي إلى <i>Lactobacillus bavaricus</i> ، واحدة إلى <i>L. curvatus</i> ، واحدة إلى <i>Lactobacillus mucosae</i> ، وواحدة أخرى إلى <i>L. gasseri</i> بينما تنتمي 9 إلى <i>Lactobacillus</i> spp .</p> <p>اختبار النشاط الطيفي اظهر أن تثبيط البكتيريا يدل على وجود مواد يفترض أنها بيكتريوسينية وقد كانت أفضل السلالات المثبطة A9, A20, A21, B13 .</p> <p>كما اظهر هذا الاختبار أن المواد المثبطة ذات طبيعة بروتينية تبقى مستقرة عند درجة حرارة 100 درجة مئوية لمدة 90 دقيقة ومثبطة للبكتيريا <i>Listeria monocytogenes</i> تنشط هذه القدرة عند pH بين 4 و 8 وتحتفظ بنشاطها بعد تخزينها لمدة 7 أيام في درجات الحرارة 4، 20 و 37° م.</p> <p style="text-align: right;"><b>كلمات مفتاحية:</b> <i>Lactobacillus</i>، بيكتريوسين، تضاد .</p>  |  |