

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche

جامعة محمد الصديق بن يحيى جيجل



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département : Microbiologie Appliquée et

Sciences Alimentaire

كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم الميكرو بيولوجيا التطبيقية و

علوم التغذية

Mémoire de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Microbiologie Appliquée

Thème

Caractérisation de bactériocine produite par *Lactobacillus*
plantarum isolée d'El kadid

Membres de Jury

Président : Mr KHENNOUF Tarek

Examineur : Pr SIFOUR Mohamed

Encadreur : M^{me}.BOUCHEFRA Amina

Présenté par

M^{elle} HASSAOUS Chaima

M^{elle} BITAT Roumaissa

M^{elle} BRAHMA Sabrina

Année Universitaire 2018-2019

Numéro d'ordre (bibliographique) :

Remerciement

*Au début et avant tout, le remerciement et louange à **Dieu** le tout puissant, de nous avoir donné le courage, la santé de finaliser ce travail.*

*Tout d'abord, nous remercions notre encadreur **M^{me}.Bouchefra Amina** enseignante à l'université de Jijel, pour ses conseils scientifiques durant la période de la réalisation de ce travail, d'avoir accepté d'encadrer notre travail.*

*Nos remercierons **M^r Khennouf Tarek** enseignant à l'université de Jijel, pour son aide, ses conseils et pour son écoute attentive tout au long de l'élaboration de ce travail et aussi d'avoir accepté de juger notre travail.*

*Nos plus remercions **M^r Sifour Mohamed** professeur à l'université de Jijel pour ses conseils, ses informations qu'il nous a fournies tout au long de notre étude universitaire et aussi d'avoir accepté de juger notre travail.*

*À **M^{me} Ait Medour Amel** et **M^{me} Bousoufe Lilia** enseignantes à Université de Jijel,*

En fin le remerciement aussi pour tous les ingénieurs et techniciens de Laboratoires de Microbiologie de Université de Jijel.

Merci 

Dédicace

Je dédie ce modeste travail À :

*Mes très chers parents Ahmed et Halima pour ses encourager,
ses tendresse, ses effort et ses patience tout au long de ma étude*

*Mes très chers frères et sœurs Mohammed, Hana, Nassira,
Fatíha, Saleh, Leíla, Naíma pour leur soutient, leur
encouragement continu et leur aide, tous le respect pour eux.*

*Ma chère jumelle Sabah, qui m'a encouragé tout au long de mon
chemin merci pour ta patience et ton soutien ,que dieu le garde
pour moi*

*Mes très chères amies, Bítat Roumaíssa et Hassaous Chaíma et
je souhaite une bonne continuation d'amitié et succès.*

Toutes mes amies et Toute ma Famille

Sabrína

Dédicace

Je dédie ce travail

*A ma très chère Mère **Rachída** pour tous ses sacrifices, et son
amour.*

*A mon Père **Rachíd** qui m'a toujours aidé et encouragé.*

*A mon frère et mes sœurs **Haroun, Sara, Malek***

*Mon cher fiancé **Moussa** qui a toujours été à mes coté pour me
soutenir et m'encourager*

*A toute ma famille **Hassous et Chebab**.*

*Mes très chères amies, **Bitat Roumaïssa** et **Brahma Sabrina** et
je souhaite une bonne continuation d'amitié et succès.*

Chaïma

Dédicace

A` l'aide de dieu Allah le tout puissant qui m'a tracé le chemin de ma vie, J'ai pu réaliser ce travail.

Je dédie ce travail à

*Ma famille spécialement aux personnes les plus chères au monde. Mes chers parents **Mohammed** et **Hacina**, qui sont la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie.*

*A mes chères sœurs : **Imane**, **Amira** et **Selssabil***

*a mes frères : **Yasser** et **Saïf Eddine** et le fils de ma sœur **Annes***

A tout ma famille Bitat

A mes amies de l'Association Irshed & Islah Algérienne et Chabeb for Irshed.

*Mes très chères amies , **Hassaous Chaïma** et **Brahma Sabrina** et je souhaite une bonne continuation d'amitié et succès.*

Roumaïssa

Sommaire

Remerciement.....	i
Dédicace.....	ii
Sommaire.....	v
Liste des abréviations.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des Photos.....	xi
Liste des tableaux.....	xiii

<i>Introduction</i>	01
----------------------------------	-----------

I. Synthèse bibliographique

Chapitre I: Généralité sur la viande

I.1. Définition de la viande	03
I.2. Production mondiale et nationale de la viande de caméline	03
I. 2.1. Production mondial.....	03
I.2. 2. Production national.....	04
I.3. Flore microbiologique de la viande	05
I.4. Flore lactique de la viande caméline	04
I.5. Facteurs influencent sur la croissance de lactobacille	05
I.6. Les produits traditionnelle à base de viande caméline " El kadid ".....	05
I.6.1. Guedid / Kadid / AchedlouhetGuedidépilé.....	05

Chapitre II : Lactobacillus plantarum

II. 1.Généralité sur les <i>lactobacilles</i>	07
II.2.Généralité sur <i>Lactobacillus plantarum</i>	07
II.2.1.Définition	07
II.2.2.Classification	08
II.2.3.Habitat et origine	08
II.2.4.Exigence nutritionnelle	08
II.2.4.1. Exigence en acides aminées	08
II.2.4.2.Exigence en sels minéraux	09
II.2.4.3.Exigence en vitamine	09
II.2.4.4.Exigence en glucides	09
II.2.4.5. Exigence en bases azotées	09
II.2.5.Métabolisme de <i>Lactobacillus plantarum</i>	09
II.3.Bioproduction de bactériocine à partir de <i>Lactobacillus plantarum</i>	10
II.3.1.Définition de bactériocine	10
II.3.2.Classification des bactériocines	10
II.3.3.Mode d'action de bactériocine / plantaricine	11
II.3.4.<i>Lactobacillus plantarum</i> producteur de bactériocines	12

II. Partie expérimentale

II. Matériel et Méthodes

II.1. Matériel	14
II.1.1. Matériel biologique	14
II.1.1.1. Lait écrémé	14
II.1.1.2. Souche de <i>Lactobacillus plantarum</i> LB2G	14
II.1.1.3. Les souches indicatrices	14
II.1.1.4. Les protéases	14
II.1.2. Milieux de culture	14
II.1.3. Produits chimiques et réactifs	14
II.1.4. Tampons	15
II.1.5. Appareillage et autres	15
II.2. Méthodes	15
II.2.1. Revivification de <i>Lactobacillus plantarum</i> LB2G	15
II.2.2.Purification	16
II.2.2.1.Examen macroscopique	16

II.2.2.2.Examen microscopique.....	16
II.2.2.3.Recherche de la catalase.....	16
II.2.3.Conservation de la souche lactique	16
II .2.3.1.Courte durée.....	16
II.2.3.2.Longue durée.....	16
II.2.4. Production de substances antimicrobienne.....	16
II.2.4.1.Préparation de culture des souches indicatrices	17
II.2.4.2.Préparation de culture jeune de <i>L. plantarum</i> LB2G.....	17
II.2.4.3.Préparation du surnagent de <i>L. plantarum</i> LB2G.....	17
II.2.5. Mise en évidence de la nature de l'agent inhibiteur	17
II.2.5.1.Inhibition due à la production d'acides organiques.....	17
II.2.5.2.Recherche de substances inhibitrices de nature protéique.....	17
II.2.6. Caractérisation de la bactériocine produite par <i>L.plantarum</i> LB2G.....	18
II.2.6.1. Effet du pH sur l'activité de la bactériocine	18
II.2.6.2. Effet de la température sur l'activité de la bactériocine	18
III Résultat et Discussion	
III.1. Revivification de <i>Lactobacillus plantarum</i>LB2G	19
III.2. Purification	19
III.2.1. Aspect macroscopique	19
III.2.2. Aspect microscopique	20
III.2.3.Recherche de la catalase	21
III.3.Production de substances antimicrobienne.....	21
III.4.Mise en évidence de la nature de l'agent inhibiteur.....	23
III.4.1.Inhibition due à la production d'acides organiques	23
III.5.Recherche de substances inhibitrices de nature protéique.....	25
III.6.Caractérisation de la bactériocine produite par <i>L.plantarum</i> LB2G.....	26
III.6.1. Effet du pH sur la stabilité de la bactériocine	26
III.6.2. Effet de la température sur la stabilité de la bactériocine	28
Conclusion.....	29

Références.....30

Annexes

Annexe I composition des milieux de cultureI

Annexe II Coloration de GramIII

Annexe III Coloration au bleu de méthylèneIII

Résumé

Liste des abréviations

ATCC: American Type Culture Collection.

a_w : l'activité de l'eau.

DO: Densité Optique.

EMP: Embden-Meyerhoff-Parnas.

FAO: Food and Agriculture Organization.

HACCP: les principes de bonnes pratiques d'hygiène.

KDa: kilo Dalton.

LAB: Lactic Acid Bacteria.

LDH: lactate déshydrogénase.

MH: Muller-Hinton.

MRS: Man-Rogosa and Sharp.

pH: Potentiel d'hydrogène.

rH: Potentiel d'oxydoréduction.

rpm: tours par minute.

GRAS: Generally Recognized As Safe.

Liste des figures

<i>Numéro</i>	<i>Titre</i>	<i>Page</i>
<i>Figure 01</i>	<i>Production mondiale de la viande caméline</i>	<i>03</i>
<i>Figure 02</i>	<i>Production nationale de la viande caméline</i>	<i>04</i>
<i>Figure 03</i>	<i>Effet du pH sur la stabilité de la bactériocine</i>	<i>27</i>
<i>Figure 04</i>	<i>Effet de la température sur la stabilité de la bactériocine</i>	<i>28</i>

Liste des Photos

<i>Numéro</i>	<i>Titre</i>	Page
Photo 01	<i>Série de tube de revivification.</i>	15
Photo 02	<i>L. plantarum LB2G sur bouillon MRS.</i>	19
Photo 03	<i>Aspect macroscopique de L. plantarum LB2G sur gélose MRS.</i>	19
Photo 04	<i>Observations microscopiques de L. plantarum LB2G après une coloration au Bleu de méthylène.</i>	20
Photo 05	<i>Observations microscopiques de L. plantarum LB2G après une coloration de Gram.</i>	20
Photo 06	<i>Test de la catalase.</i>	21
Photo 07	<i>Activité inhibitrice de L. plantarum LB2G contre S. aureus ATCC 25923.</i>	22
Photo 08	<i>Activité inhibitrice de L. plantarum LB2G contre P. aeruginosa ATCC 27853.</i>	22
Photo 09	<i>Activité inhibitrice de L. plantarum LB2G contre E. coli ATCC 25922.</i>	22
Photo 10	<i>Activité inhibitrice de surnageant natif et neutralisé contre S. aureus ATCC 25923.</i>	24
Photo 11	<i>Activité inhibitrice de surnageant natif et neutralisé contre P. aeruginosa ATCC 27853.</i>	24
Photo 12	<i>Activité inhibitrice de surnageant natif et neutralisé contre E. coli ATCC 25922.</i>	24
Photo 13	<i>Activité inhibitrice de surnageant natif et de surnageant avec la Trypsine contre S. aureus ATCC 25923.</i>	25
Photo 14	<i>Activité inhibitrice de surnageant natif et de surnageant avec la Trypsine contre E. coli ATCC 25922.</i>	25
Photo 15	<i>Activité inhibitrice de surnageant natif et de surnageant avec la</i>	26

	<i>Trypsine contre P. aeruginosa ATCC 27853.</i>	
--	--------------------------------------------------	--

Liste des Tableaux

<i>Numéro</i>	<i>Titre</i>	<i>Page</i>
Tableau 01	<i>Exemple de L. plantarum producteur de bactériocines.</i>	12
Tableau 02	<i>Activité inhibitrice de L. plantarum LB2G.</i>	21
Tableau 03	<i>Activité inhibitrice des surnageants natifs et neutralisés de L. plantarum LB2G.</i>	23

La viande est très nutritive et très importante dans la nutrition humaine, et elle est largement discutée dans la littérature scientifique. D'un certain point de vue être une source précieuse de macro et micro-nutriments en particulier de fer et zinc biodisponibles, vitamines B1, B12, niacine, protéines et vitamines A et D, elle a une très grande valeur nutritionnelle (**Laskowski et al., 2018**). Mais à l'état frais elle est périssable et peut être un agent de la transmission d'une gamme d'infections et d'intoxications. Plusieurs méthodes de conservation de viande existent par la réduction de l'activité de l'eau (a_w) (**Sánchez-Ortega et al., 2014**).

Traditionnellement, les bactéries lactiques (LAB) sont utilisées comme culture de départ et microbiote compétitif dans la production et la fermentation des produits alimentaires depuis des siècles. En fonction de leurs propriétés métaboliques elles sont utilisées en raison de leur contribution essentielle à la saveur, la texture, la valeur nutritive des produits alimentaires et de leurs propriétés antimicrobiennes naturelles qui prolongent la durée de vie de produits (**Favaro et al., 2015**). Beaucoup de produits alimentaires étaient conservés sous l'action des bactéries lactiques qui sont des constituants naturels des aliments fermentés (**O'Connor et al., 2015**). L'activité conservatrice de ces bactéries dans les aliments est principalement attribuée à la production des métabolites antimicrobiens tels que les acides organiques et les bactériocines ce qui leur permet de croître et de contrôler la croissance des microorganismes et d'agents pathogènes (**Swetwathana et Visessanguan, 2015**).

L'utilisation des produits chimiques pour la conservation des produits alimentaires peut entraîner une modification de la composition nutritionnelle et des propriétés organoleptiques des produits alimentaires et peut également conduire à une toxicité pour l'homme. L'utilisation des composés produits naturellement tels que les bactériocines dans l'industrie alimentaire diminue le risque d'intoxication alimentaire (**Todorov et al., 2011**).

Parmi les bactériocines utilisées, les bactériocines des bactéries lactiques comme *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* et *Lactobacillus plantarum* qui est une des principales bactéries lactiques utilisées pour la production de viande fermentée, d'herbe et de légumes (**Bali et al., 2016**). Un certain nombre de bactériocines ont été décrites pour *Lactobacillus plantarum* isolée de produits carnés fermentés, fromages, concombre fermenté, olives, bière de sorgho, mélasse et kéfir (**Todorov et al., 2011**).

Dans ce contexte notre objectif est de caractériser la bactériocine produite par *Lactobacillus plantarum* LB2G isolée d'*El-kadid*.

Notre travail s'articule autour de deux parties : la première parties est une synthèse bibliographique correspondant à deux chapitres dans laquelle nous évoquant des généralités sur la viande cameline notamment *El-kadid* ainsi que sur la souche d'étude (*Lactobacillus plantarum*). La deuxième c'est une partie expérimentale où nous avons suivi les étapes suivantes :

- Une revivification puis une purification de la bactérie *Lactobacillus plantarum* LB2G ;
- Production de substances antimicrobienne ;
- Mise en évidence de la nature de l'agent inhibiteur ;
- Caractérisation de la bactériocine produite par *L. plantarum* LB2G.

I.1. Définition de la viande

➤ **Selon la structure** : la viande est le résultat de l'évolution post mortem du tissu musculaire squelettique (ou strié) et du tissu adipeux. La connaissance de la structure de ces tissus est donc préliminaire et indispensable à la compréhension des mécanismes responsables pour déterminer la qualité de la viande (**El Rammouz, 2005**).

➤ **Selon la qualité nutritive** : la viande est l'une des meilleures sources de protéines, elle apporte la totalité des acides aminés indispensables en quantité nécessaire pour notre corps. Contient aussi des vitamines (B, A...etc.), des minéraux et oligo-éléments comme le fer et le zinc essentiels à notre équilibre, des graisses et autres nutriments. Elle favorise ainsi un rythme alimentaire plus équilibré (**Zhang et al., 2010**).

I.2. Production mondiale et nationale de la viande caméline

I.2.1. Production mondiale

La viande caméline est une bonne source de nutriments pour les populations vivant notamment dans les zones arides et urbaines (**Faye, 2016**). Elle est produite dans de nombreux pays d'Afrique et d'Asie en particulier dans les zones où le climat nuit à l'efficacité de la production d'autres animaux (**Abrhaley et Leta, 2018**). Comme elle est produite dans d'autres pays dans le monde grâce à sa qualité nutritionnelle et médicinale, la production de la viande caméline augmente selon la demande (**Bosire et al., 2016**). La figure 01 représente la production de la viande caméline dans le monde à partir de 2010 jusqu'à 2017 (**FAO, 2017**).

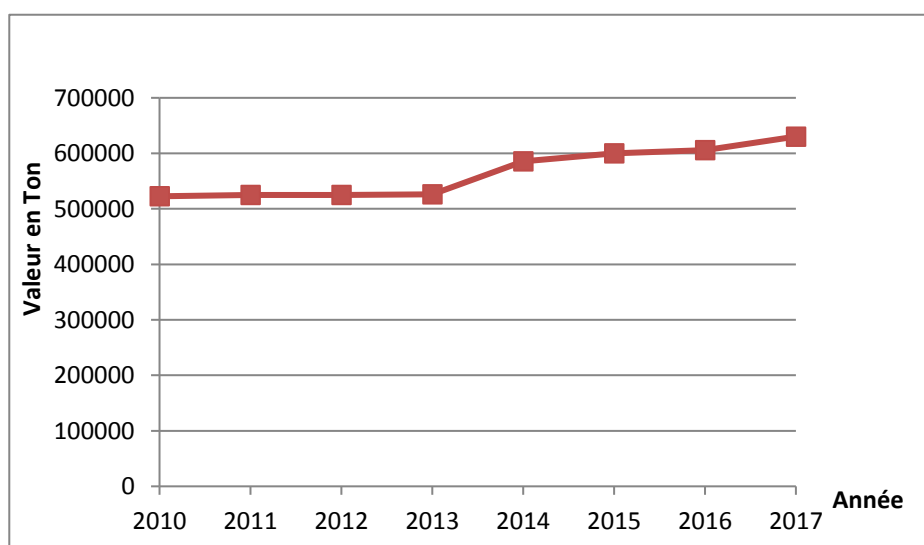


Figure 01 : Production mondiale de la viande caméline (**FAO, 2017**).

I.2.2. Production nationale

En Algérie surtout au nord, la viande ovine et bovine sont les plus consommées alors que la viande caméline est consommée à grande échelle dans le Sahara grâce à son grand rendement de carcasse (Ould El Hadj et al., 2002). Selon la FAO stat 2017 la production nationale de la viande caméline atteint 6000 tons.

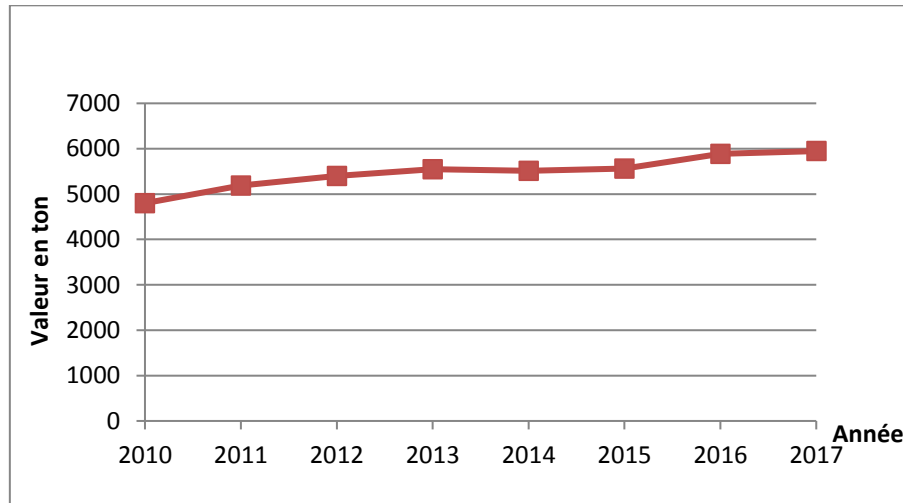


Figure 2 : Production nationale de la viande caméline (FAO, 2017).

I.3. Flore microbiologique de la viande

La microflore de surface de la viande caméline retrouvée immédiatement après abattage sur les carcasses est principalement constituée de : *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Brochothrix thermosphacta*, *Lactobacillus*, *Flavobacterium*, *Kurthia*, les *Enterobacteriaceae* et les *Coryneformes*. On retrouve aussi une diversité de levures (genre *Candida*) et de moisissures (genres *Penicillium*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Rhizopus*). Cette microflore peut être réduite si les principes de bonnes pratiques d'hygiène (HACCP) sont strictement respectés au cours de la production (Salifou et al., 2013).

Différents microorganismes peuvent causer la détérioration de la viande et des produits carnés. Les bactéries (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Brochothrix thermosphacta*, *Moraxella*, *Enterobacter*, *Lactobacillus* sp., *Leuconostoc* sp., *Brochothrix* sp.), les moisissures et les levures, sont principalement à blâmer pour la détérioration de la viande et de produits carnés (Aminzare et al., 2016).

I.4. Flore lactique de la viande caméline

Les bactéries lactiques constituaient la principale microflore de la viande cameline, elles jouent un rôle important dans la fermentation de la viande (Malti et Amarouch, 2008). Elles améliorent la sécurité et la stabilité du produit à base de viande grâce à leurs propriétés technologiques importantes et la capacité de produire des bactériocines qui ont une activité antimicrobienne contre les bactéries pathogènes comme par exemple : *Citrobacter* sp., *Shigella* sp., *Salmonella* sp., *E. coli*...etc (Wambui et al., 2017). Parmi les lactobacilles isolés de la microflore indigène des produits traditionnels on trouve *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sakei* et *Lactobacillus plantarum* (Malti et Amarouch, 2008).

I.5. Facteurs influençant la croissance des lactobacilles

Le développement de la microflore initiale essentiellement les bactéries lactiques est influencé par de nombreux facteurs parmi elles : l'Activité de l'eau ; plus elle est élevée c'est-à-dire proche de 1 plus le développement de la microflore initiale est intense. L' a_w des produits à base de viande peut être réduite par le séchage, l'adjonction de sucre ou de sel, l'ajout de matières grasses ou par congélation. Pour la température ; plus elle est grande plus le taux de croissance des bactéries lactiques est élevé. D'autre facteur que les premiers c'est le potentiel d'oxydoréduction (rH) où après la mort, le muscle ayant des réserves en oxygène, présente un rH élevé et positif (+250 mv) ce qui est favorable à la multiplication des germes aérobies. Mais avec le temps les réserves en oxygène n'étant plus renouvelées par le sang donc le rH diminue très rapidement et devient négatif en 8 à 10 h et atteint la valeur de -150mv. Dans le cas de viande «normales», le pH de muscle est de 5 jusqu'à 7 selon le type de la viande, il est favorable pour le développement des bactéries lactiques (Salifouet al., 2013).

I.6. Produits traditionnelle à base de la viande caméline " El kadid "

Les produits traditionnels à base de viande ont toujours accompagnés les habitants de différentes régions du monde. Ils constituent un héritage transmis de génération en génération à travers les siècles, ces produits typiques font partie intégrante de la culture gastronomique, de la tradition et de l'économie locale des pays (Clinquart, 2006).

I.6.1. Guedid / Kadid / Achedlouh et Guedid épicé

Guedid est un produit carné traditionnel salé et séché au soleil, très connu dans les pays du Maghreb (Maroc, Algérie et Tunisie) préparé le plus souvent après « Aïd Al Adha » Il peut être préparé à

partir de tous types de viande y compris la viande de dromadaire. La préparation du Guedid diffère d'une région à l'autre et dépend principalement des ingrédients utilisés, des techniques de salage et de séchage ainsi que les utilisations finales du produit. Pour sa consommation, il est rajouté dans la préparation des plats traditionnels tels que le couscous, le ragoût de légumineuses, Aiche, et « Couscous Avissar » ; un plat à base de semoule de blé préparé dans la région de Kabylie (Algérie) (Boudechicha et *al.*, 2017).

II.1. Généralité sur les lactobacilles

Les lactobacilles sont des bactéries à Gram positif de groupe hétérogène, microaérophiles que l'on trouve couramment dans divers environnements. Elles appartiennent au phylum *Firmicutes* à la classe *Bacilli*, à l'ordre *Lactobacillales* et le genre *Lactobacillus* qui comprend plus d'une centaine d'espèces différentes parmi lesquelles de nombreuses espèces bien caractérisées et pertinentes du point de vue biologique, technologique et commercial, tel que *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, et *L. salivarius*. Ce genre de *Lactobacillus* occupe de nombreuses niches écologiques différentes dans la nature. Elle fait partie du microbiote naturel des animaux hôtes et occupent diverses niches au sein de l'hôte telles que le tractus gastro-intestinal, le tractus urogénital, la cavité buccale et la peau. Les lactobacilles sont présents dans les produits laitiers et sont particulièrement abondantes dans les produits laitiers fermentés et sont naturellement présentes dans les plantes et le sol. Par exemple, *L. plantarum* est naturellement présente dans les légumes tels que le chou et la laitue, de plus *L. paracasei subsp. paracasei*, et *L. brevis* ont été isolées des échantillons de sol (Barrangou et al., 2012).

Au sein de ce groupe, *Lactobacillus plantarum* est l'une des espèces les plus polyvalentes y compris des souches aux compétences technologiques précieuses et aux caractéristiques probiotiques reconnues (Nes et al., 2011).

II.2. Généralité sur *Lactobacillus plantarum*

II.2.1. Définition de *Lactobacillus plantarum*

L. plantarum est l'une des espèces les plus répandues du genre *Lactobacillus* et est largement utilisée dans les technologies liées à l'alimentation (Nes et al., 2011). Ce microorganisme définie comme un facultatif hétérofermentaire (groupe II), qui fermente les glucides généralement par voie de la phosphoketolase (PKP) (Tamang, 2010). Il est tolérant à l'acide et considéré comme un micro-organisme sûr (GRAS) (Sabo et al., 2014).

L. plantarum fait partie des microorganismes présents dans les féculents, les céréales, la viande, les produits laitiers, les légumes, les fruits, les boissons, etc (Nes et al., 2011), en tant que starter et comme microorganisme probiotique (Arena et al., 2016). C'est-à-dire comme un supplément alimentaire microbien vivant qui affecte avantageusement l'hôte en améliorant son équilibre microbien intestinal (Lim et Im, 2009). Les souches probiotiques doivent inclure des caractéristiques de non toxicité, de non pathogénicité, de capacité à moduler les réponses immunitaires et la production de substances antimicrobiennes (Salminen et Von Wright, 2011).

II.2.2. Classification (Behera et al., 2018)

Domaine: *Bactéria*

Phylum: *Firmicutes*

Classe: *Bacilli*

Ordre : *Lactobacillales*

Famille: *Lactobacillaceae*

Genre: *Lactobacillus*

Espèce: *Lactobacillus plantarum*

II.2.3. Habitat et origine

L. plantarum est un microorganisme ubiquitaire capable de coloniser plusieurs niches écologiques, notamment les légumes, la viande, les substrats laitiers (Siezen et al., 2010) et le tractus gastro-intestinal (Marco et al., 2009). La capacité à habiter différentes niches est associée avec sa capacité à fermenter une variété de sucres (Martino et al., 2016).

II .2.4. Exigence nutritionnelle

La croissance bactérienne dépend de la biosynthèse et / ou de l'absorption des composants du milieu nécessaires à la formation de la biomasse comme les acides aminées et les glucides...etc. L'identification des exigences nutritionnelles est importante pour connaître la croissance de *L. plantarum* et contribue à la compréhension des propriétés physiologiques et des voies métaboliques de la bactérie (Ma et al., 2016).

II.2.4.1. Exigence en acides aminées

L. plantarum est incapable de synthétiser de nombreux acides aminés et nucléobases (auxotrophe) qui est nécessaires à la synthèse des protéines et des acides nucléiques (Bringel et Hubert, 2003).

Par exemple : la biosynthèse complète des voies de l'arginine, du glutamate et du tryptophane semblaient être présentes chez *L. plantarum* WCFS1, mais la souche n'a pas bien poussé dans un milieu chimiquement défini (MDP) sans ces acides aminés. En plus il y a six acides aminées clés (Ile, Leu, Val, Tyr, Met et Phe) qui sont des besoins nutritifs essentiels pour *L. Plantarum* (Ma et al., 2016).

La présence de cystéine ou de pyridoxamine a augmenté la résistance aux conditions aérobies. La cystéine est cruciale pour la biosynthèse du glutathion et de protéines telles que la thiorédoxine. Le

glutathion et / ou la thiorédoxine jouent un rôle dans la réponse au stress oxydatif (**Wegkamp et al., 2010**).

II.2.4.2. Exigence en sels minéraux

Les minéraux Mg^{2+} et Mn^{2+} sont essentiels à la croissance de *L. plantarum*, le Mn^{2+} est essentiel à la formation de la biomasse chez *L. plantarum*. Une concentration élevée en Mn^{2+} aide la cellule à traiter les espèces réactives de l'oxygène et constitue une alternative de l'absence d'un gène codant pour un superoxyde dismutase (oxydoréductase catalyse la dismutation des anions superoxyde (O_2^-) en oxygène et H_2O_2). Le Mg^{2+} est essentiel pour un grand nombre de réactions enzymatiques et favorise la division des bactéries à Gram positif (**Wegkamp et al., 2010**).

II.2.4.3. Exigence en vitamine

Les vitamines sont des micronutriments importants qui sont souvent des cofacteurs des enzymes, dont toutes les cellules vivantes ont besoin pour effectuer des réactions biochimiques (**Ma et al., 2016**). Le folate (vitamine B9), la biotine (une vitamine hydrosoluble de groupe B) et la pyridoxamine (une forme de vitamine B6) sont essentiels à la croissance. L'élimination de ces vitamines n'abolissait pas la croissance du *L. plantarum*. La biotine est essentielle à la synthèse des acides gras. Le folate est utilisée dans la voie de la biosynthèse des purines et dans l'initiation de la synthèse des protéines (**Wegkamp et al., 2010**).

II .2.4.4. Exigence en glucides

Les glucides sont utilisés par la bactérie *L. plantarum* comme source de carbone, et ils sont essentiels pour la croissance de cette bactérie, et leur dégradation fournis l'énergie pour les réactions biochimiques. Le glucose est la source la plus préférable car il est facile à dégrader (**Lv et al., 2017**).

II.2.4.5. Exigence en bases azotées

Les bases de purines et de pyrimidines [Uracile (U), guanine (G), thymine (T), cytosine (C) et adénine (A)] sont nécessaires pour la croissance de la bactérie (**Lv et al., 2017**).

II.2.5. Métabolisme de *Lactobacillus plantarum*

L. plantarum fermente généralement les hexoses par la voie métabolique EMP (Embden-Meyerhoff-Parnas), ce qui entraîne la formation d'acides D et L-lactiques. De plus, les pentoses sont fermentés pour former de l'acide lactique et de l'acide acétique en présence de phosphocétolase inductible. Comme elle possède des acides déshydrogénases spécifiques de l'acide lactique (LDH) qui forment le lactate L (+) et le lactate D (-), une glycolyse anaérobie normale donnerait de l'acide

lactique L (+) alors que l'acide lactique D (-) pourrait être synthétisé à partir du système de glyoxalase (Melgar-Lalanne et al., 2012).

L. plantarum fermente les glucides sous forme d'amygdaline, de cellobiose, d'esculine, de gluconate, de mannitol, de mélézitose, de mélibiose, de raffinose, de ribose, de sorbitol, et de saccharose dans une proportion supérieure à 90%, ainsi que d'arabinose et de xylose entre 11 et 89%. La fermentation du sucre était principalement homo-lactique avec une certaine activité hétéro-lactique (production d'acétate). Les acides organiques tels que le malique, l'acétique et l'éthanol peuvent être partiellement métabolisés, ce qui entraîne la production de dioxyde de carbone, d'acide lactique et d'acide acétique (Melgar-Lalanne et al., 2012).

Cette bactérie a montré diverses réactions contre certains facteurs de stress tels que : le choc thermique (55 °C, 10 min), la bile (0,5% oxgall®), le stress oxydatif (0,1% H₂O₂), pH bas (2,5), l'éthanol (10%), les sels (7,5% de NaCl) et les détergents (dodécylsulfate de sodium à 0,05%) (Melgar-Lalanne et al., 2012).

II .3. Bioproduction de bactériocine par *Lactobacillus plantarum*

II.3.1. Définition de bactériocine

Les bactériocines sont des peptides synthétisés par le ribosome qui présentent une activité antibactérienne contre des bactéries étroitement liée à la bactérie productrice. Les bactériocines des LAB sont généralement des peptides de petites tailles, thermostables, hydrophobes et cationiques (Song et al., 2014).

Selon Klaenhammer ; les bactériocines sont des protéines ou complexes de protéines avec une activité bactéricide contre des espèces proches de la souche productrice (Dortu et Thonart, 2009).

II .3.2. Classification des bactériocines

La famille des bactériocines comprend une grande variété de peptides et de protéines en termes de taille, de cibles microbiennes et de mécanismes d'action et d'immunité. Plusieurs travaux ont été réalisés pour classer les bactériocines des LAB. Basé sur la structure, les propriétés physicochimiques et moléculaires, les bactériocines des bactéries lactiques peuvent être subdivisées en quatre grandes classes (Beshkova et Frengova, 2012) :

- **La classe I** : contient des bactériocines appelées lantibiotiques (un antibiotique contenant de la lanthionine). Ils sont de petits peptides (<5 kDa) contenant les acides aminés inhabituels que sont la lanthionine (Lan), l' α méthyllanthionine(MeLan), la déshydroalanine et la déshydrobutyrine (Hoover et Chen, 2005; Beshkova et Frengova, 2012).

- **Classe II:** peptide non modifiée, thermostable, petite, cationique, hydrophobe (<10 kDa); Ils peuvent être divisés en trois sous-classes : la sous-classe II a (Bactériocines analogues à la pédiocine - peptides actifs contre *Listeria*) , la sous-classe II b contient des bactériocines nécessitant deux différents peptides pour l'activité comme par exemple la lactococcines G et M , la plantaricines A, S, EF et JK et la lactacine F , la sous-classe II c (bactériocines dépendantes de la seconde) la sous-classe II d (autres bactériocines - bactériocines sans leader; antimicrobien peptides dérivés de protéines plus grosses) (Hoover et Chen, 2005; Beshkova et Frengova, 2012).
- **Classe III:** protéines de grande taille, hydrophiles et thermolabiles (> 30 kDa); moins caractérisées (par exemple, la helveticins J et V-1829) (Hoover et Chen, 2005).
- **Classe IV:** Macromolécules cycliques, cationiques, hydrophobes, comprenant des bactériocines complexes nécessitant une activité glucidique ou lipidique (Hoover et Chen, 2005).

II.3. 3. Mode d'action de bactériocine / plantaricine

Les bactériocines ont une action bactéricide / bactériostatique, c'est-à-dire que certaines bactériocines peuvent être bactériostatiques contre une souche pathogène et bactéricide contre l'autre (Nes *et al.*, 2011).

Les bactériocines de classe I (lantibiotiques), se lie aux molécules cibles et insérés dans la membrane cellulaire et conduisent à la formation de pores suivie de la mort cellulaire. Les bactériocines de classe II agissent sur la membrane en deux étapes, la première étape implique l'interaction du peptide avec un récepteur dans la membrane et la seconde étape est la formation des pores ou des canaux. La formation des pores entraîne l'efflux de petites molécules, en particulier des ions tels que les ions K^+ , qui dissipent le potentiel de la membrane et privent la cellule de son énergie entraînant la mort cellulaire. Les bactériocines de classe III, comprend les bactériocines lytiques (bactériolysine) et non ioniques. Les bactériocines lytiques agissent de manière enzymatique. Les bactériocines non ioniques, dissipe également le potentiel membranaire, ce qui entraîne la perte des ions K^+ . Pour maintenir le potentiel de membrane, la cellule utilise sa réserve d'ATP, qui épuise la cellule de son énergie, entraînant la mort cellulaire. Les bactériocines circulaires de classe IV, peptide a un groupe d'acides aminés basiques à la surface de la molécule qui donne une charge positive. Cette charge positive aide à attirer le peptide vers la membrane chargée négativement. Lors de l'interaction avec la membrane, le peptide forme des pores entraînant la fuite d'ions de faible poids moléculaire (tels que le potassium) et d'acides aminés. Cela perturbe le potentiel membranaire provoquant la mort cellulaire (Bali *et al.*, 2016)

II.3.5. *Lactobacillus plantarum* producteur de bactériocines

les bactériocines sont actuellement explorées pour leur utilité potentielle chez les humains et les animaux (Sifour *et al.*, 2012) .

Tableau 01 : Exemple de *L. plantarum* producteur de bactériocines (Beshkova et Frengova, 2012).

Souches productrices de bactériocines	Type de bactériocine	Sensibilité aux enzymes	Spectre d'inhibition	pH et thermostabilité
<i>Lactobacillus plantarum</i> WHE 92	Pédiocine PA-1	Sensible à toutes les enzymes protéolytiques, mais non affecté par le traitement avec la catalase, la phospholipase C, lysozime, Dnase, Rnase, lipase	Activité antimicrobienne à large spectre contre les bactéries à Gram (+), mais n'est pas active contre les Lactocoques; nombreux bactéries à Gram (-) sensible aux bactériocines	Stable entre un pH (4,0 à 6,0) et un chauffage à 80 °C pendant 60 min et à 100 °C pendant 10 min
<i>Lactobacillus plantarum</i> isolé du yaourt fait maison	Plantaricin AA135	stable à la catalase; complètement détruit par la pepsine, la trypsine et la papaïne	Forte inhibition contre les bactéries Gram(+), et légèrement active contre les bactéries Gram (-) , alors que une faible inhibition contre <i>L. monocytogenes</i> et <i>B. subtilis</i> .	Stable à la chaleur après 30 min à 121 °C
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Plantaricin TF711	Inactivation complète par tous	Large spectre d'inhibition contre	Stable à un pH compris entre

TF711, isolé du fromage de chèvre cru		les enzymes protéolytiques	les bactéries Gram (+), mais n'a pas d'inhibition contre les souches d' <i>Enterococcus</i> ou de <i>Listeria</i>	1,0 et 9,0; thermostable et stable pendant le stockage à -20 °C et 4 °C (activité résiduelle 70% à 100 °C pendant 30 min)
<i>Lactobacillus plantarum</i> (B14, C1 C4, C7, G7, G8) isolées du lait de vache, de chèvre et de buffle	Bacteriocines	Non étudié par les auteurs	Large spectre inhibiteur contre les agents pathogènes	Une stabilité entre 60 °C à 90 °C pendant 10 min; stable dans une plage de pH acide à neutre, inactive dans la plage alcaline à pH 9,0

L'intégralité de ce travail a été réalisée au niveau du laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Jijel, durant la période Avril – juin 2019.

Les objectifs de cette étude s'articulent autour des points suivants :

- Recherche de substances antimicrobiennes de *L. plantarum* LB2G isolée d'*El Kadid* ;
- Mise en évidence de la nature de l'agent inhibiteur de *L. plantarum* LB2G ;
- Caractérisation de la bactériocine produite par *L. plantarum* LB2G.

II.1. Matériel

Pour la réalisation des différentes parties expérimentales, on s'est servi du matériel suivant:

II.1.1. Matériel biologique

II.1.1.1. Lait écrémé : C'est le lait écrémé CANDIA®.

II.1.1.2. Souche de *Lactobacillus plantarum* LB2G :

Cette souche a été identifiée génétiquement, parmi une collection de bactéries lactiques qui a été isolées à partir de la viande séchée salée cameline (*El kadid*) par M^{me} Bouchefra Amina.

II.1.1.3. Les souches indicatrices : Il s'agit de trois souches indicatrices représentées par les espèces suivantes :

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ;
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ;
- *Escherichia coli* ATCC 25922.

Ces souches nous ont été fournies par le laboratoire de recherche de Biotechnologie Environnement et Santé de l'Université de Jijel et le laboratoire de recherche de Béjaia.

II.1.1.4. Les protéases : La protéase utilisée dans cette étude est la trypsine.

II.1.2. Milieux de culture : Plusieurs milieux de culture ont été utilisés au cours de cette étude expérimentale, il s'agit des milieux suivants :

- **Les géloses:** MRS, Muller Hinton;
- **Les bouillons :** bouillons nutritif, MRS ;

II.1.3. Produits chimiques et réactifs : Les produits chimiques et réactifs utilisés au cours de cette étude sont les suivants :

- **Les colorants :** Bleu de Méthylène, Violet de Gentiane, Fuschine ;
- **Les acides et bases :** NaOH (5 mol / l), HCl (5 mol / l) ;
- **Les réactifs :** H₂O₂ ;

- **Alcool et autres** : éthanol, lugol, l'huile à émulsion, glycérol à 30%, eau physiologique;

II.1.4. Tampons : tampon phosphate (K_2HPO_4 0.1M);

II.1.5. Appareillage et autres : Notre étude a nécessité l'utilisation des appareils, de la verrerie et d'autres matériels cités au-dessous :

- millipore de 0,22 μm ;
- Autoclave (Shiavax Electronic) ;
- Bain marie (Mettler) ;
- Bec bensen ;
- Centrifugeuse (Hettich) ;
- Etuve (Mettler) ; 37°C°, 40°C°, 60°C°, 80°C°, 100°C° ;
- Four pasteur (Controls) ;
- Micropipettes de 10 μl à 100 μl et 100 μl 1000 μl (Microlit);
- Microscope optique (Motic) ;
- pH-mètre (Hanna) ;
- Spectrophotomètre UV (analytik jena SPECORD 50 plus) ;
- Balance analytique de précision (Kerns 220.4N) ;
- Réfrigérateur (ENIEM).

II.2. Méthodes

II.2.1. Revivification de *Lactobacillus plantarum* LB2G

A partir de la souche conservée sur bouillon MRS, une culture a été prélevée et déposée dans le bouillon MRS pour redémarrer sa croissance et sa capacité métabolique. Les tubes ont été par la suite incubés à 37°C / 24-48 h.



Photo 01 : Série de tube de revivification.

II.2.2. Purification

La souche a subis des séries de purification (isolement et repiquage sur milieu MRS), et à chaque fois nous avons observés l'aspect macroscopique, la coloration de Gram (Annexe II), bleu de méthylène (Annexe III) et la présence de la catalase.

II.2.2.1. Examen macroscopique

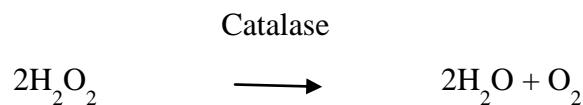
Cette étude est basée sur l'observation visuelle de la culture lactique sur milieu MRS solide et liquide ; pour caractériser la taille, la forme et la couleur des colonies.

II.2.2.2. Examen microscopique

Après l'examen macroscopique des colonies sur gélose MRS, *Lactobacillus plantarum* LB2G a été subit à la coloration de Gram (Annexe II), et à la coloration par le bleu de méthylène (Annexe III).

II.2.2.3. Recherche de la catalase

La catalase a été mise en évidence en émulsionnant la culture bactérienne dans une solution fraîche d'eau oxygénée à 10 volumes. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de l'enzyme à tester.



II.2.3. Conservation de la souche lactique

La conservation était réalisée par deux méthodes, une conservation à courte durée et une autre à longue durée :

II .2.3.1. Courte durée

La souche estensemencée sur gélose MRS incliné en tube. Après incubation à 30 °C pendant 18 heures, les tubes sont conservés à + 4°C (Badis et al., 2005).

II.2.3.2. Longue durée

A partir des cultures jeunes (18 h) sur milieu liquide, les cellules sont récupérées par centrifugation à 4000 tr / min pendant 10 min. Une fois le surnageant éliminé, nous avons ajouté le milieu de culture de conservation (70% lait écrémé et 30% de glycérol) sur le culot. Les cultures sont conservées en micro tubes « eppendorfs » à -20 °C (Badis et al., 2005).

II.2.4. Production des substances antimicrobiennes

Ce test consiste à étudier l'activité inhibitrice de *L. plantarum* LB2G vis-à-vis des souches indicatrices *S. aureus* ATCC 25923 ; *P. aeruginosa* ATCC 27853 et *E. coli* ATCC 25922.

II.2.4.1. Préparation de culture jeune des souches indicatrices : Les souches indicatrices ont été cultivées dans 10 ml de bouillon nutritif et incubées à 37°C pendant 18h.

II.2.4.2. Préparation de culture jeune de *L. plantarum* LB2G : Des colonies pures de la souche lactique ont étéensemencées dans des tubes à essai contenant du bouillon MRS et incubées à 37°C pendant 18h.

II.2.4.3. Préparation du surnageant de *L. plantarum* LB2G : après l'incubation de *L. plantarum* LB2G à 37 °C pendant 18h, la culture a été centrifugée et le surnageant a été filtré sur un filtre de 0,22 µm.

La méthode des puits décrite par (Belgacem et al., 2010) a été appliquée : elle consistait à inonder en surface du milieu Mueller-Hinton (MH) par la souche indicatrice (DO varie entre 0,08 et 0,1 à la longueur d'onde 600nm). Après incubation pendant 30 min à 37° C, des puits de 5 mm de diamètre ont été creusés à l'aide d'un emporte -pièce sur la surface de la gélose juste après sa solidification. Chaque puits a reçu 50 µl du surnageant.

Une fois les boîtes sont séchées à température ambiante, elles sont incubées à 4°C, par la suite à 37° C pendant 24h. L'inhibition se traduit par la formation des zones claires autour des puits.

II.2.5. Mise en évidence de la nature de l'agent inhibiteur

Les inhibitions de la croissance par la souche lactique peuvent être dues aux acides organiques, à la production de peroxyde d'hydrogène, à la présence de phages ou à la synthèse de bactériocines.

La méthode décrite par (Bareffouts et Klaenhammer, 1983; Dortu et Thonart, 2009) consiste à utiliser une culture bactérienne jeune de 18h suivie d'une centrifugation de 3000 rpm pendant 15min, ensuite le surnageant a été filtré sur un filtre millipore de 0,22 µm et conservé à 4°C.

II.2.5.1. Inhibition due à la production d'acides organiques

L'activité antimicrobienne par les acides organiques produits par la souche lactique a été supprimée par l'ajustement du pH du surnageant natif à pH égale à 7,0 avec le NaOH (5 mol / l) pour obtenir un surnageant neutre. Après incubation la lecture des résultats été faite par comparaison au surnageant natif. Après incubation pendant 24h à 37°C, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés.

II.2.5.2. Recherche de substances inhibitrices de nature protéique

La recherche éventuelle de production de substances inhibitrices par *L. plantarum* LB2G a été réalisée en milieu solide. Pour s'assurer de la nature protéique des substances inhibitrices, nous avons utilisé l'enzyme protéolytique : la trypsine. L'enzyme est dissoute dans du tampon phosphate de potassium (0.1M; pH 7). Le but de ce test est de prouver la nature de la substance

antimicrobienne élaborée par *L. plantarum* LB2G. A partir d'une culture jeune, un volume de 2 ml a été prélevé et centrifugé à 3000 rpm pendant 15min, le surnageant a été filtré sur un filtre de 0,22 µm. Au préalable, des boîtes de Pétri contenant 10 ml de milieu MH solide ont étéensemencées par 500 µl de la souche indicatrice. Avec l'emporte-pièce des puits sont fait dans le milieu solide juste après sa solidification. Un volume de 500 µl de surnageant neutralisé est ajouté à 250 µl de l'enzyme trypsine (2 mg d'enzyme + 1 ml de tampon phosphate stérile). Le tout est incubé à 37°C pendant 1h. Dans les puits 50 µl ont été déposés :

- Surnageant natif dans le premier puits ;
- Surnageant neutralisé + trypsine dans le deuxième puits.

II.2.6. Caractérisation de la bactériocine produite par *L. plantarum* LB2G

II.2.6.1. Effet du pH sur la stabilité de la bactériocine après incubation à 2h

L'effet du pH sur l'activité de la bactériocine a été étudié en ajustant le pH du surnageant aux valeurs de 2,0, 4,0, 6,0, 8,0, 10,0 et 12,0 avec le HCl 5 mol / l ou le NaOH 5 mol / l. Les surnageants ont été incubés à la température ambiante pendant 2 h. Des boîtes de Pétri contenant 10 ml de milieu MH solide ont étéensemencées par 500 µl de la souche indicatrice. Avec l'emporte-pièce, des puits ont été confectionnés dans le milieu solide. Un volume de 50 µl de chaque surnageant a été déposé dans les puits. Ensuite, les boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 24h (**Dortu et Thonart, 2009**).

II.2.6.2. Effet de la température sur la stabilité de la bactériocine

Le surnageant filtré et neutralisé a été chauffé à 40, 60, 80 et 100 °C pendant 10, 20, 30, 60 minutes. Le surnageant traité thermiquement a ensuite été analysé pour déterminer l'activité de la bactériocine (**Dortu et Thonart, 2009**).

III.1. Revivification de *L. plantarum* LB2G

Après l'incubation à 37°C / 24h, l'observation du développement de la souche lactique *L. plantarum* LB2G dans le milieu MRS liquide est apparu sous forme de trouble (**Photo 02**).



Photo 02: *L. plantarum* LB2G sur bouillon MRS.

III.2. Purification

III.2.1. Aspect macroscopique

L'observation macroscopique sur le milieu MRS solide (**Photo 03**), a révélé des colonies sous forme circulaires, de petites tailles, blanchâtres, avec un pourtour régulier et lisse (**Labioui et al., 2005**).



Photo 03: Aspect macroscopique de *L. plantarum* LB2G sur gélose MRS.

D'autres études menées par **Anas et al., (2010)** ont montrées que les *Lactobacillus* isolées du lait cru de chèvre d'Algérie produisent sur milieu solide de petites colonies d'environ 1mm de diamètre,

de forme lenticulaire de couleur blanchâtre ou laiteuse, avec une surface lisse et un pourtour circulaire régulier.

III.2.2.Aspect microscopique

L'observation microscopique après la coloration par le bleu de méthylène et la coloration de Gram a montré que la bactérie est un bacille (**Photo 04**) à Gram positif (+) et de couleur violette (**Photo 05**).



Photo 04 : Observations microscopiques de *L. plantarum* LB2G après une coloration au Bleu de méthylène avec un grossissement (G x 100).

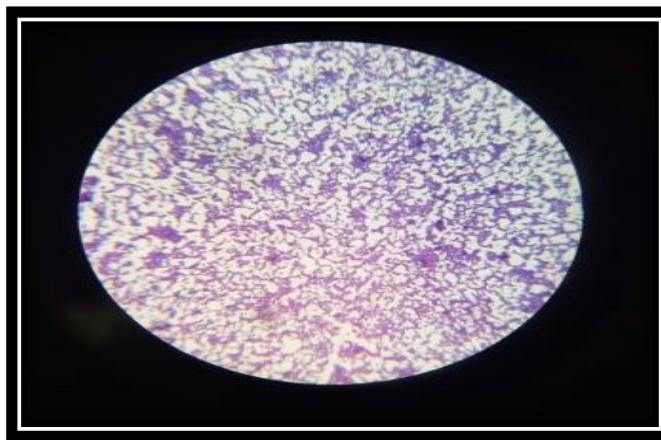


Photo 05 : Observations microscopiques de *L. plantarum* LB2G après une coloration de Gram avec un grossissement (G x100).

Anas et al., (2010), ont rapportés que l'examen microscopique révèle que les souches de *L. plantarum* testées dans leur étude étaient Gram positif, de forme bâtonnets isolées, en paires ou en chaînes.

III.2.3. Recherche de la catalase

Les bactéries lactiques ne possèdent pas l'activité catalasique (absence de dégagement gazeux (O_2)) elles sont dites catalase négatives. La souche *L. plantarum* LB2G ne possède pas une activité catalasique (catalase négatif), donc ne possède pas l'enzyme catalase pour dégrader le H_2O_2 .



Photo 06 : Test de la catalase.

III.3. Production des substances antimicrobiennes

L'apparition des zones d'inhibitions claires autours des puits, prouve que la souche *L. plantarum* LB2G possède une activité antimicrobienne contre les souches indicatrices (*S. aureus* ATCC 25923 (Photo 07), *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Photo 08) et *E. coli* ATCC 25922 (Photo 09)), mais avec des diamètres différents, où nous avons enregistré une forte activité contre la bactérie *S. aureus* ATCC 25923 avec un diamètre de 25 mm, suivi par *E. coli* ATCC 25922 avec un diamètre de 21mm, alors que l'activité antimicrobienne est plus faible vis à vis de *P. aeruginosa* ATCC 27853 avec un diamètre de 19 mm.

Tableau 02 : Activité inhibitrice de *L. plantarum* LB2G.

Les souches	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
Zone d'inhibition	+	+	+
Diamètre d'inhibition (mm)	25 ±0,7	21±1,4	19±0,14

Donc, cette souche lactique est capable de produire de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, et les bactériocines (Dortu et Thonart, 2009).

De même, **Zineddine et al., (2011)** ont indiqués que la souche *L. plantarum* LbG22 isolée à partir du lait cru de chèvre et de chameau collecté en Algérie ont la plus grande activité inhibitrice contre la souche de *S. aureus*.

Selon **Gong et al., (2010)**, les bactériocines des bactéries lactiques sont inefficaces pour inhiber les bactéries Gram-négatif comme *P. aeruginosa* et *E. coli* parce que la membrane externe entrave l'axé au site de fixation pour l'action des bactériocines.

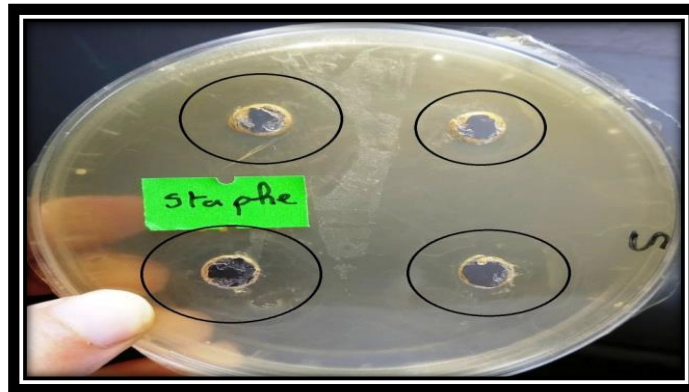


Photo 07 : Activité inhibitrice de *L. plantarum* LB2G contre *S. aureus* ATCC 25923.

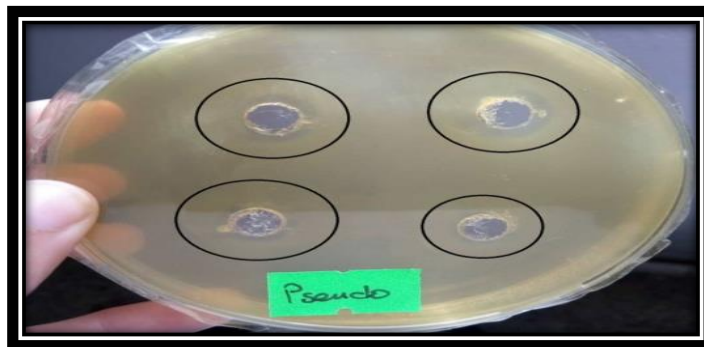


Photo 08 : Activité inhibitrice de *L. plantarum* LB2G contre *P. aeruginosa* ATCC 27853.

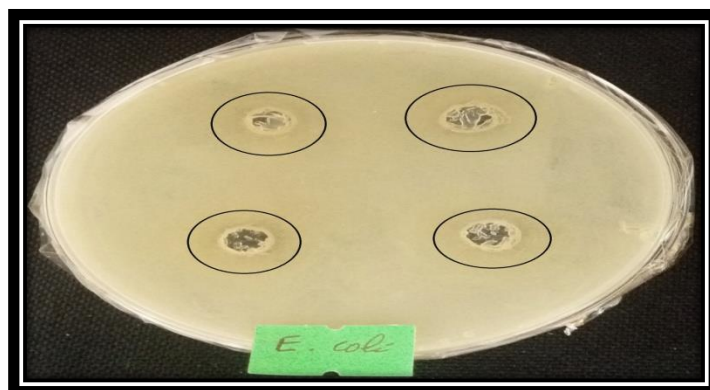


Photo 09 : Activité inhibitrice de *L. plantarum* LB2G contre *E. coli* ATCC 25922.

III.4.Mise en évidence de la nature de l'agent inhibiteur

III.4.1.Inhibition due à la production d'acides organiques

Après incubation pendant à 37° C pendant 24h, *L. plantarum* LB2G présente des zones d'inhibition autour des puits de surnageant natif et neutralisé (**Tableau 03**).

Tableau 03: Activité inhibitrice des surnageant natifs et neutralisés de *L. plantarum* LB2G.

Les souches	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
Zone d'inhibition	+	+	+
Diamètre (mm) de surnageant natif	25±1,13	21± 0,70	20± 1,41
Diamètre (mm) de surnageant Neutralisé	20± 0,14	20± 0,00	19± 1,41

Le tableau 03 montre que la souche *L. plantarum* LB2G possède une activité inhibitrice importante vis-à-vis les trois souches testées et la souche la plus inhibée appartient à *S. aureus* ATCC 25923 comme il apparaît avec le diamètre de surnageant natif. D'autre part, l'apparition des zones d'inhibitions du surnageant neutralisé (élimination de l'effet des acides organiques) a révélé que ces inhibitions ne sont pas dues à des acides organiques et elles peuvent être dues au d'autres substances tel que les bactériocines ou le peroxyde d'hydrogène.

Les résultats des travaux de **Anas et al., (2010)** ont montrés que *L. plantarum* a donné une zone d'inhibition remarquable vis à vis de *S. aureus*, cette inhibition est due à une substance inhibitrice, sachant que le test a été réalisé sur milieu tamponné afin d'écarter l'effet de l'acide lactique.

Selon **Sabo et al., (2014)**, la plantaricine 163 produite par *L. plantarum* 163 isolée à partir de légumes traditionnellement fermentés chinois, a inhibé les bactéries à Gram positif (telle que : *S. aureus*) et les bactéries à Gram négatif (*E. coli* et *P. aeruginosa*). De plus, **Todorov et Dicks, (2005)** ont rapportés que les deux bactériocines, ST28MS et ST26MS, produites par *L. plantarum*, isolées à partir de mélasse, ont inhibé la croissance de *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *E. coli*. **Wen et al., (2016)** a montré que la Plantaricine K25 présente un large spectre d'activité inhibitrice contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. De même, **Zhao et al., (2016)** montre que la bactériocine produite par *L. plantarum* JLA-9, isolée de *Suan-Tsai* (un chou fermenté traditionnel

chinois), possède une activité antibactérienne à large spectre contre les bactéries Gram positif et Gram négatif, en particulier *Bacillus* sp. Et les études de **Rumjuankiat et al., (2015)** ont confirmé que la bactériocine KL-1Y est douée d'une large activité inhibitrice contre les bactéries Gram positif et Gram négatif, notamment le sérovar de *Salmonella enterica Enteritidis* DMST 17368, *P. aeruginosa* ATCC 15442, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *E. coli* O157: H7 et *E. coli* ATCC 8739.

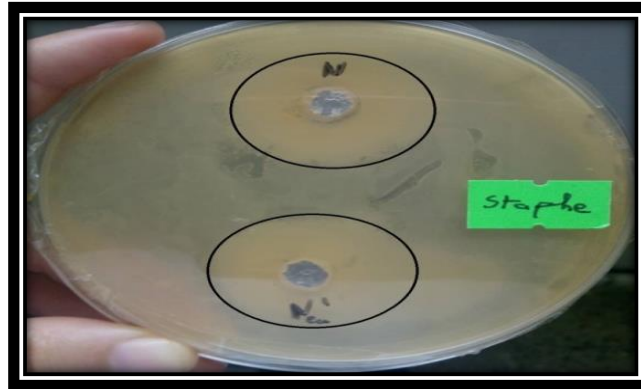


Photo 10 : Activité inhibitrice de surnageant natif et neutralisé contre *S. aureus* ATCC 25923.

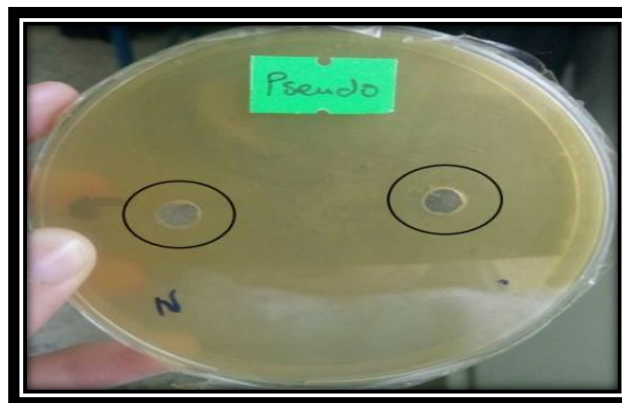


Photo 11 : Activité inhibitrice de surnageant natif et neutralisé contre *P. aeruginosa* ATCC 27853.

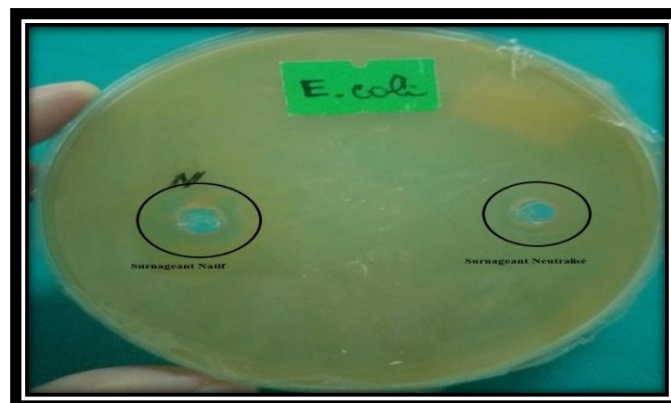


Photo 12 : Activité inhibitrice de surnageant natif et neutralisé contre *E. coli* ATCC 25922.

III.5. Recherche de substances inhibitrices de nature protéique

Les bactériocines sont de nature protéique, et leur inactivation se fait par un traitement avec des protéases (Lim et Im, 2009). Dans notre étude, pour s'assurer que la substance inhibitrice est de nature protéique, on utilise l'enzyme protéolytique; la trypsine.

Après l'incubation du surnageant natif pendant 24h à 37° C, les résultats obtenus présentent une inhibition vis-à-vis des souches indicatrices, par l'apparition des zones d'inhibitions autour des puits de surnageant natif, par contre, pas des zones d'inhibitions autour des puits qui contiennent le surnageant traité avec la trypsine. Donc, comme les bactériocines sont de nature protéique, les résultats obtenus après l'action des enzymes protéolytiques (trypsine) nous permettront d'identifier la nature des substances antibactériennes et confirmer que la nature des substances inhibitrices est protéique, et l'activité inhibitrice est due aux bactériocines.

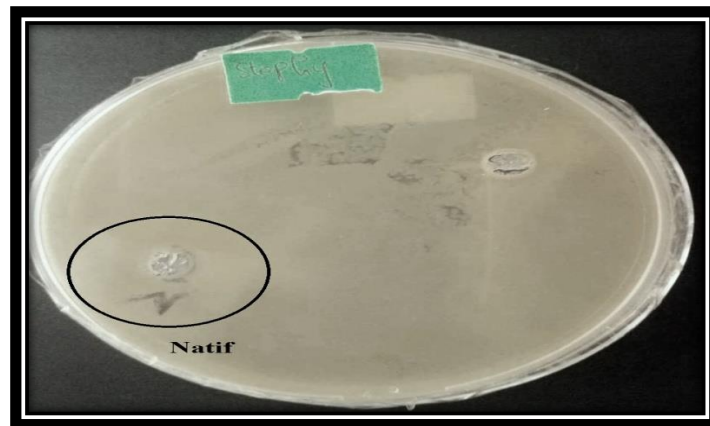


Photo 13: Activité inhibitrice de surnageant natif et de surnageant avec la Trypsine contre *S. aureus* ATCC 25923.

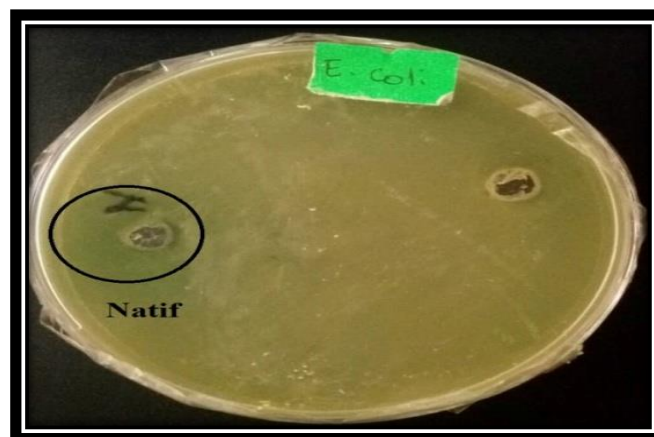


Photo 14 : Activité inhibitrice de surnageant natif et de surnageant avec la Trypsine contre *E. coli* ATCC 25922.

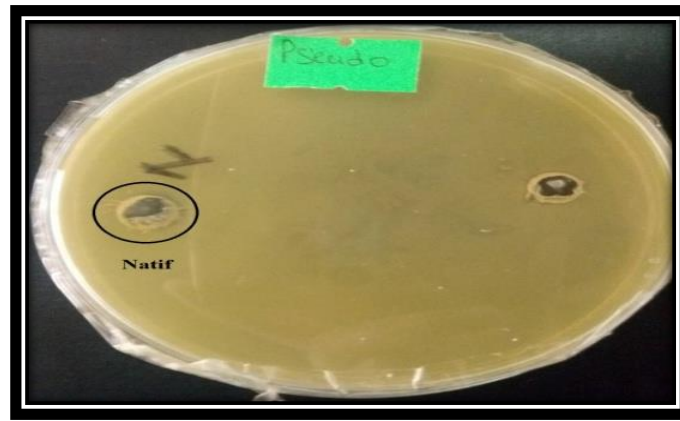


Photo 15 : Activité inhibitrice de surnageant natif et de surnageant avec la Trypsine contre *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Des résultats similaires à notre étude (où les bactéries lactiques telle que *L. plantarum* isolées du lait cru de chèvre d'Algérie) présentés que l'activité antibactérienne a disparue après l'action des enzymes protéolytiques sur la bactérie *S. aureus*. Ce qui permet de suggérer que l'activité antagoniste est due à une substance de nature protéique ou peptidique (Anas et al., 2010). Aussi les travaux de Zineddine et al., (2008) ont suggéré que le surnageant de *L. plantarum* LbG22 traité avec les enzymes protéolytiques, α -chymotrypsine et pepsine, avait une activité inhibitrice contre *S. aureus*. Selon Gong et al., (2010) la plupart des bactériocines produites par *L. plantarum* inhibent les bactéries à Gram positif avec un spectre d'activité plutôt étroite comme la plantaricine C produite par *L. plantarum* LL441 ; la plantaricine D produite par *L. plantarum* BFE905. Cependant, quelques bactériocines produites par *L. plantarum* ont été rapportés être actifs contre les bactéries à Gram négatif. La bactériocines ST26MS et ST28MS produites par *L. plantarum* ST26MS et ST28MS, respectivement, peuvent inhiber *Acinetobacter*, *Escherichia* et *Pseudomonas*.

Selon Labioui et al., (2005), les bactériocines sont surtout actives sur les pathogènes à Gram+ et agissent en formant des pores dans la membrane cytoplasmique ce qui entraîne des perturbations des fonctions cellulaires.

III.6. Caractérisation de la bactériocine produite par *L. plantarum* LB2G

III.6.1. Effet du pH sur la stabilité de la bactériocine après incubation à 2h

Nous avons observé que l'activité antagoniste exercée par *L. plantarum* est stable entre pH 2 à 6, avec un maximum de stabilité à un pH de 2 correspondant à des zones d'inhibitions de l'ordre de 23 mm, 19 mm, 17 mm à pH 2, 4 et 6 respectivement. D'autre part nous avons remarqué l'absence des zones d'inhibitions pour le pH 8, 10 et 12 (Figure 03).

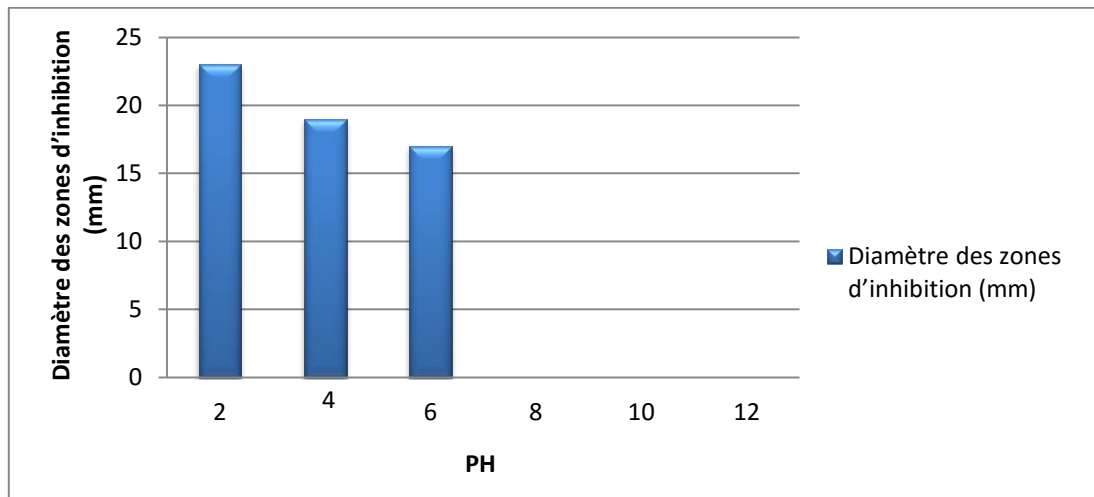


Figure 03 : Effet du pH sur la stabilité des bactériocines.

Labioui et al., (2005) , **Anas et al., (2010)** ont conclu que les espèces de lactobacilles sont connues pour leur grande résistance aux pH acides. En outre, les lactobacilles peuvent sécréter dans le milieu des inhibiteurs spécifiques plus intéressants de point de vue technologique, de nature protéique appelées bactériocines. Ces dernières présentent un spectre d'activité étroit envers des espèces pathogènes et elles ont un optimum de stabilité, de solubilité et d'activité à pH acide.

D'autre étude menée par **Zhao et al., (2016)** indiquées que l'évaluation de la stabilité aux pH a révélé que la plantaricine JLA-9 produite par *L. plantarum* JLA-9 est restée stable après incubation pendant 3 h à des valeurs de pH comprises entre 2,0 à 7,0, mais son activité a diminué considérablement à pH 10,0. De plus ; les travaux de **Gong et al., (2010)** , ont montrés que le plantaricine MG produite par *L. plantarum* KLDS1. 0391 s'est révélé stable après incubation pendant 72 h à des valeurs de pH comprises entre 2,0 et 10,0, c'est-à-dire qu'il est resté stable dans des conditions de pH neutre et alcalin. L'étude de **Song et al., (2014)** sur la plantaricine ZJ5 (une nouvelle bactériocine produite par *L. plantarum* ZJ5 isolée de moutarde fermentée) a enregistré une stabilité dans une large plage de pH de 2,0 à 6,0 et aucune activité n'a été enregistrée à pH neutre et alcalin.

Hoover et Chen, (2005) ont montrés que la plantaricine A produite par *L. plantarum* C-11 est une bactériocine active sur une plage de pH de 4,0 à 6,5. De plus, **Powell et al., (2007)** ont conclu que la bactériocine ST8KF est stable entre pH 2,0 et 10,0, après incubation à 30 ° C, elle est stable à un pH de 3,6. d'autres études montrés que la plantaricine Q7 reste active sur la gamme de pH entre 3,0 à 12,0 pendant 30 min (**Liu et al., 2016**), la Plantaricine K25 est stable à des valeurs de pH comprises entre 2 et 8 (**Wen et al., 2016**), et la bactériocine KL-1X, -1Y et -1Z sont stables à pH 2-12 (**Rumjuankiat et al., 2015**).

III.6.2. Effet de la température sur la stabilité de la bactériocine

D'après les résultats de la (**Figure 04**), nous constatons que le traitement thermique de surnageant bactériocinogène de la souche *L. plantarum* LB2G à des températures de (40, 60, 80, 100 °C) pendant (10, 20, 30, 60 min), reste stable sur une large gamme de la température (40, 60, 80 et 100 °C) et a donné une meilleure stabilité à 60 °C pendant 30 min, mais l'inactivation à 100 °C pendant 30 min.

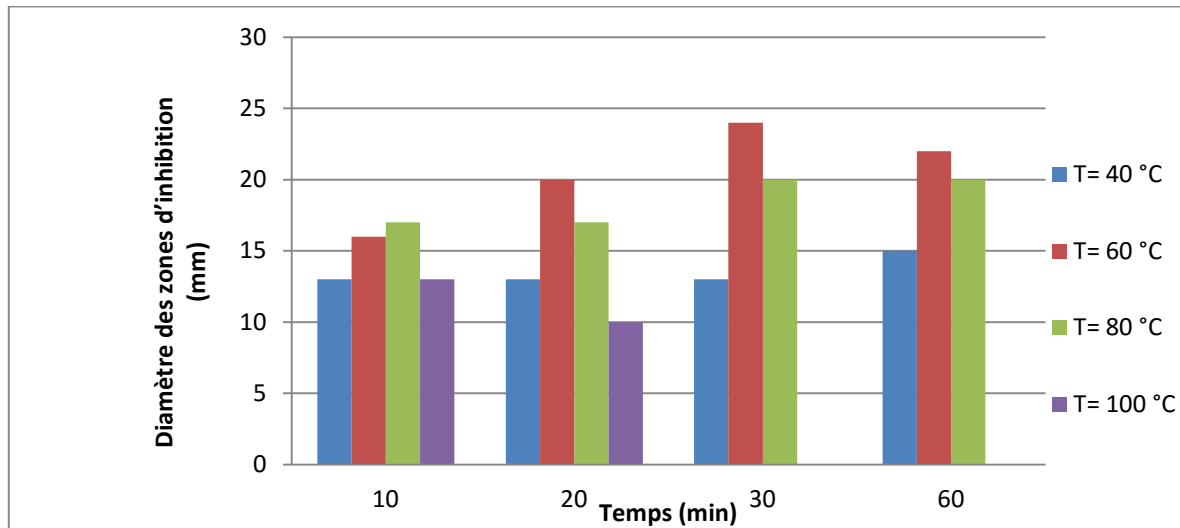


Figure 04 : Effet de la température sur la stabilité de la bactériocine.

Zhao et al., (2016) ont rapportés que la plantaricine JLA-9 est restée relativement stable après traitement à 60, 80 et 100 °C pendant 30 min et la plantaricine UG1 a montré une inactivation thermique après traitement à 100 °C pendant 30 min. D'autre bactériocines produites par différentes souche de *L. plantarum* sont thermostables comme, la bactériocine ST8KF qui reste active après 20 min à 121 °C (**Powell et al., 2007**). De plus, la plantaricine K25 peut conservée sa bioactivité après une exposition à une température élevée (121 °C) (**Wen et al., 2016**).

Barbosa et al., (2016) ont montrés que la bactériocine MBSa4 est thermostable, et son activité n'a pas été affectée par la température de 4 °C et 100 °C; elle reste active même après un traitement à 121 °C pendant 15 minutes. La stabilité de la bactériocine produite par *L. plantarum* MBSa4 à la chaleur et à faible pH confère à cette souche des propriétés technologiques prometteuses, indispensables pour une application dans des produits acidifiés à longue durée de vie.

Les bactéries lactiques sont largement impliquées dans l'alimentation et dans la fermentation spontanée, grâce à leurs propriétés fermentaires ainsi qu'à leurs capacités de survivre et se développer dans diverses conditions environnementales. Elles ont été utilisées pendant des siècles pour la production d'une grande variété d'aliments fermentés tels que les produits laitiers, la viande et les légumes. Ces micro-organismes contribuent, non seulement à l'aromatisation et le développement de la texture mais aussi à l'amélioration de la durée de vie des aliments et la sécurité alimentaire, en produisant plusieurs composés antibactériens comprenant des acides lactiques et organiques, éthanol, peroxyde d'hydrogène, dioxyde de carbone, diacétyle et bactériocines.

Dans notre travail, nous avons identifié que *L.plantarum* LB2G isolées de la viande caméline séchée salée (*El kadid*) est productrice de bactériocines.

Les résultats obtenus lors de notre étude montrent que l'activité antibactérienne de la bactériocine est évidente contre les bactéries à Gram positif et donne une grande activité inhibitrice contre *S. aureus* ATCC 25923, mais aussi contre les bactéries à Gram négatifs *E.coli* ATCC 25922 et *P. aeruginosa* ATCC 27853. En plus cette bactériocine est caractérisée par une grande tolérance aux variations de pH (2 à 6) et aux traitements thermiques, mais l'inactivation est faite à 100C° pendant 30 min.

Comme prescriptive beaucoup des études peuvent être réalisé sur cette bactériocine pour :

- la purification, l'identification et l'optimisation de sa production
- l'activité antimicrobienne de cette bactériocine identifie contre un panel plus large des bactéries cibles ;
- L'application de cette souche productrice de bactériocine *in situ* dans les jus pourra éviter le développement de bactéries pathogènes ou altérantes.

A

- **Abrehaley, A., & Leta, S.** (2018). Medicinal value of camel milk and meat. *Journal of Applied Animal Research*, 46(1), 552-558.
- **Aminzare, M., Hashemi, M., Hassanzad Azar, H., & Hejazi, J.** (2016). The use of herbal extracts and essential oils as a potential antimicrobial in meat and meat products; A review. *Journal of Human, Environment and Health Promotion*, 1(2), 63-74.
- **Amrita, R. M., & Kadirvelu, J.** (2019). Inhibiting bacterial colonization on catheters: Antibacterial and Antibiofilm activities of bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* SJ33. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*.
- **Anas, M. A. M. I., AMINE, R. H., HENNI, J. E., KERFOUF, A., & KIHAL, M.** (2010). Activité Anti-Bactérienne de *Lactobacillus plantarum* isolée du lait cru de chèvre d'Algérie vis à vis de *Staphylococcus aureus*. *Les Technologies de Laboratoire*, 5(21).
- **Arena, M. P., Silvain, A., Normanno, G., Grieco, F., Drider, D., Spano, G., & Fiocco, D.** (2016). Use of *Lactobacillus plantarum* strains as a bio-control strategy against food-borne pathogenic microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, 7, 464.

B

- **Badis, A., Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M., & Ouzrout, R.** (2005). Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux population caprines locales " ARABIA ET KABYLE". *Sciences & Technologie. C, Biotechnologies*, (23), 30-37.
- **Bali, V., Panesar, P. S., Bera, M. B., & Kennedy, J. F.** (2016). Bacteriocins: recent trends and potential applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(5), 817-834.
- **Belgacem, Z. B., Abriouel, H., Omar, N. B., Lucas, R., Martínez-Canamero, M., Gálvez, A., & Manai, M.** (2010). Antimicrobial activity, safety aspects, and some technological properties of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* from artisanal Tunisian fermented meat. *Food Control*, 21(4), 462-470.
- **Bali, V., Panesar, P. S., Bera, M. B., & Kennedy, J. F.** (2016). Bacteriocins: recent trends and potential applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(5), 817-834.
- **Barbosa, M. S., Todorov, S. D., Ivanova, I. V., Belguesmia, Y., Choiset, Y., Rabesona, H., ... & Franco, B. D. G. M.** (2016). Characterization of a two-peptide plantaricin produced by *Lactobacillus plantarum* MBSa4 isolated from Brazilian salami. *Food Control*, 100(60), 103-112.

- **Barefoot, S. F., & Klaenhammer, T. R.** (1983). Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45(6), 1808-1815.
- **Barrangou, R., Lahtinen, S. J., Ibrahim, F., & Ouwehand, A. C.** (2012). Genus *lactobacillus*. Lactic acid bacteria. *Microbiological and Functional Aspects*, 13(4), 798.
- **Behera, S. S., Ray, R. C., & Zdolec, N.** (2018). *Lactobacillus plantarum* with functional properties: an approach to increase safety and shelf-life of fermented foods. *BioMed Research International*, 2018, 18.
- **Beshkova, D., & Frengova, G.** (2012). Bacteriocins from lactic acid bacteria: microorganisms of potential biotechnological importance for the dairy industry. *Engineering in Life Sciences*, 12(4), 419-432.
- **Boudechicha, H. R., Sellama, M., Lamri, M., Boudjellal, A., & Gagaoua, M.** (2017). Produits carnés traditionnels des pays d’Afrique du Nord. *Viandes et Produits Carnés*, 34(3-8), 1-19.
- **Bosire, C. K., Krol, M. S., Mekonnen, M. M., Ogutu, J. O., de Leeuw, J., Lannerstad, M., & Hoekstra, A. Y.** (2016). Meat and milk production scenarios and the associated land footprint in Kenya. *Agricultural Systems*, 145, 64-75.
- **Bringel, F., & Hubert, J. C.** (2003). Extent of genetic lesions of the arginine and pyrimidine biosynthetic pathways in *Lactobacillus plantarum*, *L. paraplantarum*, *L. pentosus*, and *L. casei*: prevalence of CO₂-dependent auxotrophs and characterization of deficient arg genes in *L. plantarum*. *Appl Environ Microbiol*, 69(5), 2674-2683.

C

- **Clinquart, A.** (2006). La recherche et le développement en Europe dans le domaine de la qualité et de la technologie de la viande et des produits carnés. *Viandes et Produits Carnés-Hors-série" 11èmes Journées des Sciences du Muscle et Technologies des Viandes"*, 13-20.

D

- **Dortu, C., & Thonart, P.** (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques: caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 13(1), 143-154.

E

- **El Rammouz, R.** (2005). *Etude des changements biochimiques post mortem dans le muscle des volailles. Contribution au déterminisme de l'amplitude de la diminution du pH* (Doctoral dissertation, Institut National Polytechnique de Toulouse).

F

- **FAO. 2017:** <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL>
- **Favaro, L., Penna, A. L. B., & Todorov, S. D.** (2015). Bacteriocinogenic LAB from cheeses—application in biopreservation?. *Trends in Food Science & Technology*, 41(1), 37-48.
- **Faye, B.** (2016). The camel, new challenges for a sustainable development. *Tropical Animal Health and Production*, 48(4), 689–692.

G

- **Gong, H. S., Meng, X. C., & Wang, H.** (2010). Plantaricin MG active against Gram-negative bacteria produced by *Lactobacillus plantarum* KLDS1. 0391 isolated from “Jiaoke”, a traditional fermented cream from China. *Food Control*, 21(1), 89-96.

H

- **Hoover, D. G., & Chen, H.** (2005). 13 Bacteriocins with Potential for Use in Foods. *Antimicrobials in Food*, 389.

L

- **Labioui, H., Elmoualdi, L., El Yachioui, M., & Ouhssine, M.** (2005). Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bulletin-Société de Pharmacie de Bordeaux*, 144(3/4), 237.
- **Laskowski, W., Górska-Warsewicz, H., & Kulykovets, O.** (2018). Meat, Meat Products and Seafood as Sources of Energy and Nutrients in the Average Polish Diet. *Nutrients*, 10(10), 1412.
- **Lim, S. M., & Im, D. S.** (2009). Screening and characterization of probiotic lactic acid bacteria isolated from Korean fermented foods. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 19(2), 178-186.

- **Liu, H., Zhang, L., Yi, H., Han, X., & Chi, C.** (2016). Identification and characterization of plantaricin Q7, a novel plantaricin produced by *Lactobacillus plantarum* Q7. *LWT-Food Science and Technology*, 71, 386-390.
- **Lv, X., Liu, G., Sun, X., Chen, H., Sun, J., & Feng, Z.** (2017). Nutrient consumption patterns of *Lactobacillus acidophilus* KLDS 1.0738 in controlled pH batch fermentations. *Journal of Dairy Science*, 100(7), 5188-5194.

M

- **Ma, C., Cheng, G., Liu, Z., Gong, G., & Chen, Z.** (2016). Determination of the essential nutrients required for milk fermentation by *Lactobacillus plantarum*. *LWT-Food Science and Technology*, 65, 884-889.
- **Malti, J. E., & Amarouch, H.** (2008). Microbiological and physicochemical characterization of natural fermented camel meat sausage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 32(2), 159-177.
- **Martino, M. E., Bayjanov, J. R., Caffrey, B. E., Wels, M., Joncour, P., Hughes, S., ... & Leulier, F.** (2016). Nomadic lifestyle of *Lactobacillus plantarum* revealed by comparative genomics of 54 strains isolated from different habitats. *Environmental Microbiology*, 18(12), 4974-4989.
- **Marco, M. L., Peters, T. H., Bongers, R. S., Molenaar, D., Van Hemert, S., Sonnenburg, J. L., ... & Kleerebezem, M.** (2009). Lifestyle of *Lactobacillus plantarum* in the mouse caecum. *Environmental Microbiology*, 11(10), 2747-2757.
- **Melgar-Lalanne, G., Rivera-Espinoza, Y., & Hernández-Sánchez, H.** (2012). *Lactobacillus plantarum*: An overview with emphasis in biochemical and healthy properties. *Lactobacillus: Classification, Uses and Health Implications*. Pérez Campos A., Mena AL (eds). Nova Publishing, New York, USA, 1-31.

N

- **Nes, I. F., Kjos, M., & Diep, D. B.** (2011). Antimicrobial components of lactic acid bacteria. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. 4th ed. CRC Press, Boca Raton, FL, 66(1), 285-329.

O

- **O'Connor, P. M., Ross, R. P., Hill, C., & Cotter, P. D.** (2015). Antimicrobial antagonists against food pathogens: a bacteriocin perspective. *Current Opinion in Food Science*, 2, 51-57.

- **OULD, E. H. M., Bouzgag, B., Bouras, A., & Moussaoui, S.** (2002). Etude comparative de quelques caractéristiques chimiques et physico-chimiques de la viande du dromadaire chez des individus du type " sahraoui" différents ges, 10, 95-102.

P

- **Powell, J. E., Witthuhn, R. C., Todorov, S. D., & Dicks, L. M. T.** (2007). Characterization of bacteriocin ST8KF produced by a kefir isolate *Lactobacillus plantarum* ST8KF. *International Dairy Journal*, 17(3), 190-198.

R

- **Rumjuankiat, K., Perez, R. H., Pilasombut, K., Keawsompong, S., Zendo, T., Sonomoto, K., & Nitisinprasert, S.** (2015). Purification and characterization of a novel plantaricin, KL-1Y, from *Lactobacillus plantarum* KL-1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(6), 983-994.
- **Salminen, S., & von Wright, A.** (2011). Probiotics: safety and efficacy. In *Lactic Acid Bacteria* (pp. 686-700). CRC Press.

S

- **Sabo, S., Vitolo, M., González, J. M. D., & de Souza Oliveira, R. P.** (2014). Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Research International*, 100(64), 527-536.
- **Salifou, C. F. A., Boko, K. C., Ahounou, G. S., Tougan, P. U., Kassa, S. K., Houaga, I., ... & Youssao, A. K. I.** (2013). Diversité de la microflore initiale de la viande et sécurité sanitaire des consommateurs. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 7(3), 1351-1369.
- **Sánchez-Ortega, I., García-Almendárez, B. E., Santos-López, E. M., Amaro-Reyes, A., Barboza-Corona, J. E., & Regalado, C.** (2014). Antimicrobial edible films and coatings for meat and meat products preservation. *The Scientific World Journal*, 14, 18.
- **Siezen, R. J., Tzeneva, V. A., Castioni, A., Wels, M., Phan, H. T., Rademaker, J. L., & van HylckamaVlieg, J. E.** (2010). Phenotypic and genomic diversity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from various environmental niches. *Environmental Microbiology*, 12(3), 758-773.
- **Sifour, M., Tayeb, I., Haddar, H. O., Namous, H., & Aissaoui, S.** (2012). Production and Characterization of Bacteriocin of *Lactobacillus plantarum* F12 with Inhibitory Activity against *Listeria monocytogenes*. *TOJSAT*, 2(1), 55-61.

- **Song, D. F., Zhu, M. Y., & Gu, Q.** (2014). Purification and characterization of plantaricin ZJ5, a new bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ZJ5. *PLoS One*, 9(8), 105549.
- **Swetwivathana, A., & Visessanguan, W.** (2015). Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for safety improvements of traditional Thai fermented meat and human health. *Meat Science*, 109, 101-105.

T

- **Tamang, J. P.** (2010). Diversity of fermented foods. *Fermented Foods and Beverages of the World*, 41-84.
- **Todorov, S. D., Prévost, H., Lebois, M., Dousset, X., LeBlanc, J. G., & Franco, B. D.** (2011). Bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya (Caricapapaya)—from isolation to application: Characterization of a bacteriocin. *Food Research International*, 44(5), 1351-1363.
- **Todorov, S. D., & Dicks, L. M.** (2005). Characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from spoiled black olives. *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*, 45(4), 312-322.

W

- **Wambui, J. M., Lamuka, P. O., & Njage, P. M.** (2017). Lactic acid bacteria isolates from fermented camel milk (suusac) are potential protective cultures of raw camel meat. *International Journal of Agriculture and Environmental Research*, 3(3), 2960-2975.
- **Wegkamp, A., Teusink, B., De Vos, W. M., & Smid, E. J.** (2010). Development of a minimal growth medium for *Lactobacillus plantarum*. *Letters in Applied Microbiology*, 50(1), 57-64.
- **Wen, L. S., Philip, K., & Ajam, N.** (2016). Purification, characterization and mode of action of plantaricin K25 produced by *Lactobacillus plantarum*. *Food Control*, 100(60), 430-439.

Z

- **Zhang, W., Xiao, S., Samaraweera, H., Lee, E. J., & Ahn, D. U.** (2010). Improving functional value of meat products. *Meat Science*, 86(1), 15-31.
- **Zhao, S., Han, J., Bie, X., Lu, Z., Zhang, C., & Lv, F.** (2016). Purification and characterization of plantaricin JLA-9: a novel bacteriocin against *Bacillus* sp. produced by

Lactobacillus plantarum JLA-9 from *Suan-Tsai*, a traditional Chinese fermented cabbage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(13), 2754-2764.

- **Zineddine, B. A., Anas, M., Rizk, H. A., Eddine, H. J., & Mebrouk, K.** (2011). Identification and characterization of functional and technological *Lactobacillus plantarum* strains isolated from raw goat and camel milk collected in Algeria. *J. Pure Applied Microbiol*, 5(2), 553-566.

Annexe I composition des milieux de culture• **Milieu MRS**

Peptone	10g
Extrait de viande	8g
Extrait de levure	04g
Glucose	20g
Tween 80	1ml
Phosphate bipotassique.....	2g
Acétate de sodium.....	5g
Citrate d'ammonium.....	2g
Sulfate de magnésium ,7H ₂ O.....	0.2g
Sulfate de manganèse , 4H ₂ O.....	0.05g
Agar	15g
Eau distillée.....	1000 ml
PH.....	6.5

Autoclavage à 120°C pendant 15 min.

• **Bouillon MRS**

Peptone	10g
Extrait de viande	08g
Extrait de levure	04g
Tween 80	01ml
Phosphate bipotassique.....	02g
Acétate de sodium.....	05g

Citrate d'ammonium.....	02g
Sulfate de magnésium ,7H ₂ O.....	0.2g
Sulfate de manganèse , 4H ₂ O.....	0.05g
Lait écrémé	01g
Kh ₂ PO ₄	01ml
Eau distillée.....	1000 ml
PH.....	6.5

Autoclavage à 120°C pendant 15 min.

- **Milieu Mueller-Hinton**

Ingrédients en grammes par litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Peptone	17,5 g
Extrait de viande	2,0 g
Amidon	1,5 g
Agar	17,0 g
pH=7.4 ; Autoclavage 120°C/ 20 minutes	

- **Bouillon nutritif**

Extrait de viande	1 g
Extrait de levure	2 g
Peptone	5 g
Chlorure de sodium	5 g
Eau distillée	1000 ml
pH 7,4 ; Autoclavage 120 °C pendant 20 minutes.	

- **Eau Physiologique**

Chlorure de sodium	8,5 g
Peptone	0,5 g
Eau distillée	1000 ml

pH =7,0 ; Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

Annexe II Coloration de Gram

Principe

La coloration de Gram est basée sur l'affinité tinctoriale différente des bactéries à certains colorants due à la constitution de leur paroi. Cette paroi constituée d'une substance, la muréine qui est un peptidoglycane. Celle-ci est recouverte par une membrane externe chez les bactéries Gram-, tandis que les bactéries à Gram+ en sont dépourvues. Cette coloration permet aussi d'observer la morphologie des bactéries et leur mode de regroupement. Le principe de la technique est le suivant :

- **Réalisation d'un frottis** sur une lame de microscope à partir d'une suspension bactérienne
- **Coloration au violet de Gentiane** (colorant basique) pendant 1 minute puis rincé à l'eau déminéralisée.
- **Mordantage au lugol** (solution iodo-iodurée) : étaler le lugol et laisser agir 20 secondes ; Rincer à l'eau déminéralisée. Cette étape permet de stabiliser la coloration violette.
- **Décoloration à l'alcool**: Surveiller la décoloration (5 à 10 secondes). Rincer à l'eau déminéralisée. L'alcool pénètre dans la bactérie. La coloration au violet de Gentiane disparaît. Les bactéries décolorées sont des bactéries Gram-. Si l'alcool ne traverse pas la paroi, on est en présence de bactéries Gram+.
- **Contre coloration avec de la Fuchsine** : laisser agir de 30 secondes à 1 minute. Laver doucement à l'eau déminéralisée. Les bactéries **Gram-** sont colorées **en rose** et les bactéries **Gram +** sont colorées **en violet**.

Annexe III Coloration au bleu de méthylène

La coloration au bleu de méthylène est très utilisée en bactériologie, elle permet de voir la forme et le mode de groupement des bactéries.

La Réalisation :

- Le prélèvement ayant été déposé sur une lame puis fixé (chaleur et/ou alcool) :
- refroidir la lame
- verser quelques gouttes de bleu de méthylène phéniqué,
- attendre 20 à 30 s,
- rincer la lame,
- la sécher,
- l'examiner à l'immersion, au x 100.

Présenté par : M^{elle} HASSAOUS Chaima

M^{elle} BRAHMA Sabrina

M^{elle} BITAT Roumaissa

Encadreur : M^{me} .BOUCHEFRA Amina

Date de soutenance : 18/ 07/ 2019

Caractérisation de Bactériocine produite par *Lactobacillus plantarum* isolée

D'El Kadid

Résumé

Les bactériocines sont des composés synthétisés par le ribosome, elles sont de nature protéiques bioactifs libérés extracellulairement, produites à la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire de croissance. Notre travail a permis de caractériser que *L. plantarum* LB2G isolé d'*Elkadid* est productrice de bactériocine, son activité s'exerce vis-à-vis de *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853. La bactériocine est caractérisée par une tolérance au pH acide, (2 à 6) et une thermostabilité.

Mots clés : *El kadid*, *Lactobacillus plantarum* LB2G, bactériocine, activité antimicrobienne, stabilité.

Abstract

Bacteriocins are compounds synthesized by the ribosome, they are bioactive protein released extracellularly, produced at the end of the exponential phase and at the beginning of the stationary phase of growth. Our work has shown that *L. plantarum* LB2G isolated from *Elkadid* is a producer of bacteriocin, its activity is exercised against *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853. Bacteriocin is characterized by its tolerance to acid pH (2 to 6) and its thermostability.

Key words : *El kadid*, *Lactobacillus plantarum* LB2G, bacteriocin , antimicrobial activity, stability.

ملخص

Bactériocines مادة عن مركبات يتم تصنيعها بواسطة الريبوسوم ، وهو ذات طبيعة بروتينية نشطة بيولوجياً تُفرز خارج الخلية ، ويتم إنتاجها في نهاية المرحلة الأسية وفي بداية المرحلة الثابتة من النمو . لقد أظهر عملنا أن *Lactobacillus plantarum* LB2G المعزولة من القديد منتجاً للبكتيريوسينات ولديها نشاط مضاد للبكتيريا مثل *S. aureus* ATCC 25923 ، *E. coli* ATCC 25922 ، *P. aeruginosa* ATCC 27853 ، و يتميز بالعمل في الأوساط الحامضية (2 – 6) ومقاومة للحرارة.

الكلمات المفتاحية : القديد ، *Lactobacillus plantarum* LB2G ، الثبات ، نشاط مضاد للجراثيم.