

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي والبحث 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 Moléculaire  
et Cellulaire



جامعة جيجل  
كلية العلوم الدقيقة وعلوم الطبيعة والحياة  
قسم البيولوجيا الجزيئية والخلوية

جامعة محمد الصديق بن يحيى  
مكتبة علوم الطبيعة والحياة  
المكتبة  
رقم الجرد : 18.248.....

Mémoire De Fin D'études Pour L'obtention Du Diplôme  
Master II en Biologie

Option : Microbiologie Appliquée

Intitulé

Pouvoir bactériocinogène des *Lactobacillus* contre  
deux contaminants alimentaires *Listeria*  
*monocytogenes* et *Bacillus cereus*

Membres de Jury :

Président : Dr. Boudjerda J.  
Examinatrice : Dr. Laggoune S.  
Encadreure : Mme. Bahri F.



Présenté par :

Aissous Nedjma  
Zazoua Hasna



## *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. Bahri Fathia chargée 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 sincères remerciements aux membres de jury Dr. Laggoune S. et Dr. Boudjerda J. qui ont accepté d'évaluer notre travail.*

*Nous adressons nos remerciements à toute l'équipe de laboratoire de Microbiologie et à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à notre formation.*

## Liste des abréviations

**BAL** : Les **b**actéries **l**actiques.

**ABC**: **A**TP **B**inding **C**assette.

**DO** : **D**ensité **o**ptique.

**FPM** : **F**orce **P**roton-**M**otrice.

**CMI** : **C**oncentration **m**inimale **i**nhibitrice

**G+C** : **G**uanine+**C**ytosine.

**GN** : **G**élose **n**utritive.

**mM** : **m**illi **M**olaire

**MRS** : **M**an **R**ogosa **S**harp.

**Ppm** : **P**art **p**ar **m**illion.

$\Delta$ **pH** : gradient de pH

$\Delta$  **$\psi$**  : potentiel transmembranaire

**aw** : activité de l'eau.

**CWBI** : **C**entre de la **W**allonie **B**io- **I**ndustrie de la **B**elgique .

**Lb** : *Lactobacillus*.

*Lc* : *Lactococcus*

*Ln* : *Leuconostoc*

*strep* : *Streptomyc*.

**rpm** : **R**otation **p**ar **m**inute.

**UA/ml** : **U**nité **a**rbitraire par **m**illilitre.

# Liste des Figures

Figure	Page
<b>Figure (1)</b> : <i>Lactobacillus</i> observé au microscope électronique à transmission .....	2
<b>Figure (2)</b> : Distances phylogénétiques entre les genres principaux constituantes bactéries lactiques basées sur les séquences des ARNr 16S .....	5
<b>Figure (3)</b> : Séquence et structure de lantibiotique type A. ....	9
<b>Figure (4)</b> : Mode d'action des bactériocines des bactéries lactiques.....	12
<b>Figure (5)</b> : Aspect de <i>Listeria monocytogenes</i> au Gram. ....	16
<b>Figure (6)</b> : Antagonisme bactérien entre les souches de <i>Lactobacillus</i> et les germes indicateurs. ....	25
<b>Figure (7)</b> : Activité antimicrobienne des surnageant neutralisés et traités par catalase vis-à-vis de <i>Listeria monocytogenes</i> et <i>Bacillus cereus</i> .....	27
<b>Figure(8)</b> : Activité résiduelle des surnageants neutralisés et traités par les enzymes contre <i>Bacillus cereus</i> . ....	30
<b>Figure(9)</b> : Activité résiduelle des surnageants neutralisés et traités par les enzymes contre <i>Listeria monocytogenes</i> .....	31
<b>Figure (10)</b> : Activité résiduelle des SNTC soumis à différentes température et à différents pH sur <i>Listeria monocytogenes</i> .....	34
<b>Figure (11)</b> : Activité résiduelle des SNTC soumis à différentes température et à différents pH sur <i>Bacillus cereus</i> . ....	35
<b>Figure (12)</b> : Effet du stockage à différentes température sur l'activité antimicrobienne des SNTC testés sur <i>Listeria monocytogenes</i> .....	36
<b>Figure (13)</b> : Effet du stockage à différentes température sur l'activité antimicrobienne des SNTC testés sur <i>Bacillus cereus</i> . ....	37

## Liste des tableaux

Tableau	Page
<b>Tableau (1):</b> Vue d'ensemble des bactériocines des bactéries lactiques .....	10
<b>Tableau (2):</b> Rôle des protéines impliquées dans la biosynthèse d'une bactériocine.....	11
<b>Tableau (3):</b> Exemples d'application des bactéries lactiques productrices de bactériocine dans différents produits alimentaire .....	14
<b>Tableau (4) :</b> Les résultats de l'antagonisme bactérien entre les souches de <i>Lactobacillus</i> et les germes indicateurs. ....	25
<b>Tableau (5) :</b> Activité antimicrobienne des surnageant neutralisés et traités par catalase vis-à-vis de <i>Listeria monocytogenes</i> et <i>Bacillus cereus</i> .....	27
<b>Tableau (6) :</b> Concentrations minimales inhibitrices (CMI) des <i>Lactobacillus</i> vis-à-vis de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	28
<b>Tableau (7) :</b> Concentrations minimales inhibitrices (CMI) des <i>Lactobacillus</i> vis-à-vis de et <i>Bacillus cereus</i> . ....	29
<b>Tableau (8):</b> Effet des enzymes sur l'activité antimicrobienne des SNTC des souches de <i>lactobacillus</i> sur <i>Bacillus cereus</i> .....	30
<b>Tableau (9):</b> Effet des enzymes sur l'activité antimicrobienne des SNCT des souches des <i>Lactobacillus</i> sur <i>Listeria monocytogenes</i> .....	30
<b>Tableau (10):</b> Effet du pH sur l'activité antimicrobienne des SNCT des souches des <i>Lactobacillus</i> sur <i>Listeria monocytogenes</i> .....	32
<b>Tableau (11) :</b> Effet du pH sur l'activité antimicrobienne des SNTC des souches de lactobacilles sur <i>Bacillus cereus</i> .....	32
<b>Tableau (12) :</b> Effet du pH et de température sur l'activité antimicrobienne des SNCT des souches des <i>Lactobacillus</i> sur <i>Listeria monocytogenes</i> .....	34
<b>Tableau (13):</b> Effet du pH et de température sur l'activité antimicrobienne des SNTC des souches de lactobacilles sur <i>Bacillus cereus</i> .....	35
<b>Tableau (14) :</b> Effet du stockage à différentes température sur l'activité antimicrobienne des SNTC testés sur <i>Listeria monocytogenes</i> .....	36
<b>Tableau (15) :</b> Effet du stockage à différentes température sur l'activité antimicrobienne des SNTC testés sur <i>Bacillus cereus</i> .....	37

# Liste des photos

Page

**Photo (1) :** Antagonisme des *Lactobacillus* contre *Bacillus cereus*.....26

**Photo (2):** Activité résiduelle du SNTC sur *Listeria monocytogenes* après traitement par Protéinase K.....31

# Table de matières

Page

**Introduction** .....1

## *Synthèse bibliographique*

**I. Le genre *Lactobacillus*** ..... 2

I.1. Habitat .....3

I.2. Caractères morphologiques et physiologiques .....3

I.3. Caractères biochimiques .....3

I.4. Classification .....3

I.4.1. Classification phénotypiques .....3

    I.4.1.1. Groupe 1.....3

    I.4.1.2. Groupe 2.....3

    I.4.1.3. Groupe 3.....4

I.4.2. Classification génotypiques .....4

I.5. Identification.....5

## **II. Activité antimicrobienne des *Lactobacillus***

II.1. pH et les acides organiques .....6

II.2. Peroxyde d'hydrogène .....6

II.3. Diacétyl.....6

II.4. Dioxyde de carbone.....6

II.5. La reutérine.....7

II.6. Bactériocines .....7

II.6.1. Définition.....7

II.6.2. Nomenclature .....7

II.6.3. Classification .....8

    II.6.3.1. Classe I .....8

        II. 6.3.1.1. Sous-classe Ia .....8

        II. 6.3.1.2. Sous-classe Ib .....8

    II.6.3.2. Classe II .....8

        II. 6.3.2.1. Sous-classe IIa.....8



II.6.3.2.2. Sous-classe IIb.....	8
II. 6.3.2.3. Sous-classe IIc.....	9
II. 6.3.3. Classe III.....	9
II. 6.3.4. Classe IV .....	9
II.6.4. Biosynthèse .....	10
II.6.5. Mode d'action.....	12
II. 6.6. Conditionnement des bactériocines.....	13
II.7. Application des bactériocines dans le domaine alimentaire.....	13
II.7.1. Propriétés avantageuses des bactériocines pour une application alimentaire .....	13
II.7.2. Application des bactériocines dans le domaine alimentaire.....	13
II.7.3. Application de la bactérie productrice de bactériocines.....	14
II.7.4. Facteurs influençant l'efficacité des bactériocines dans les systèmes alimentaires .....	15
<b>III. Contamination des aliments par <i>Listeria monocytogenes</i> et <i>Bacillus cereus</i></b>	
<b>III.1. <i>Listeria monocytogenes</i> .....</b>	<b>16</b>
III.1.1. Définition .....	16
III.1.2. Caractères biochimiques .....	16
III.1.3. Habitat.....	17
III.1.4. Contamination des aliments par <i>L. monocytogenes</i> .....	17
III.1.5. Pouvoir pathogène de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	17
<b>III.2. <i>Bacillus cereus</i>.....</b>	<b>17</b>
III.2.1. Définition .....	18
III.1. 2. Caractères biochimiques .....	18
III.1.3. Habitat.....	18
III.1.4. Contamination des aliments par <i>Bacillus cereus</i> .....	18
III.2.5. Pouvoir pathogène de <i>Bacillus cereus</i> .....	18

<b>III.3. Inhibition de <i>Listeria monocytogenes</i> et <i>Bacillus cereus</i> par les bactériocines des <i>Lactobacillus</i></b> .....	<b>19</b>
--	-----------

## *Etude expérimentale*

<b>I. Matériel et méthodes</b> .....	<b>20</b>
<b>1.1. Matériel</b> .....	<b>20</b>
1.1.1. Matériel biologiques.....	21
1.1.2. Milieux de cultures.....	21
1.1.3. Réactifs.....	21
1.1.4. Matériel et appareillages .....	21
<b>1.2. Méthodes</b> .....	<b>22</b>
1.2.1. Enrichissement .....	22
1.2.2. Isolement .....	22
1.2.3. Pouvoir antagoniste des souches .....	22
1.2.4. Etude de l'activité bactériocinogène du surnageant .....	22
1.2.4.1. Préparation de surnageant .....	23
1.2.4.2. Détermination de l'activité bactériocinogène du surnageant du surnageant neutralisé et traité par catalase SNTC.....	23
1.2.5. Détermination de concentration minimal inhibitrice(CMI).....	23
1.2.6. Caractérisation des extraits bactériocinogènes .....	23
1.2.6.1. Effet des enzymes protéolytiques.....	22
1.2.6.2. Détermination du pH optimal d'action .....	24
1.2.6. 3. Effet de température et de pH .....	24
1.2.6.4. Détermination de la stabilité thermique de la bactériocine au cours du stockage .....	24
<b>II. Résultats et discussion</b> .....	<b>25</b>
II.1. Pouvoir antagoniste des souches .....	25
II.2. Détermination de l'activité bactériocinogène du SNTC .....	26
II.3. Test de détermination de La concentration minimale inhibitrice (CMI).....	28
II.4. Caractérisation de l'extrait bactériocinogène .....	29
II.4.1. Effet des enzymes sur l'activité antimicrobienne des surnageants .....	29

II.4.2. Détermination du pH optimal d'action des surnageants neutralisés et traités par catalase (SNTC) .....	32
II.4.3. Thermorésistante des surnageants neutralisés et traités par catalase (SNTC) à des pH Différents.....	33
II.4.4. Effet du stockage sur l'activité bactériocinogène des surnageants .....	36
<b>Conclusion.....</b>	<b>38</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>39</b>

## **Annexes**



# Introduction

Les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène qui rassemble des bactéries capables de produire de l'acide lactique par un métabolisme fermentaire. Les *Lactobacillus* constituent le genre le plus représentatif de ce groupe. Différentes espèces de ce genre sont utilisées comme auxiliaires technologiques et également comme probiotiques en industrie agroalimentaire et pharmaceutique.

Les *Lactobacillus* sont largement utilisées comme des cultures starter. Ils jouent un rôle important dans la conservation des aliments, la stabilité microbiologique et la production des composés aromatiques. Bon nombre de ces bactéries lactiques produisent des bactériocines. Par définition, les bactériocines sont de petites protéines à activité bactéricide ou bactériostatique dirigée contre les espèces bactériennes génétiquement proches de l'espèce productrice (**Privat et Thonart, 2011**).

La contamination et la détérioration des produits alimentaires par les microorganismes sont des problèmes qui ne sont pas encore sous contrôle malgré la disponibilité de la panoplie de techniques de conservation fiables et adéquates (e.g., réfrigération, congélation, stérilisation, séchage, préservation, etc.). Soucieux de résoudre ce problème tout en se conformant à la demande des consommateurs qui refusent les aliments préparés avec des agents conservateurs d'origine chimique, les chercheurs et les fabricants des produits alimentaires, se penchent de plus en plus sur des techniques de préservation beaucoup plus douces. Ces dernières conduisent à l'obtention d'aliments présentant un aspect beaucoup plus naturel avec une qualité nutritive excellente. Ces techniques sont basées sur l'activité antimicrobienne naturelle associée à des souches bactériennes agissant comme des cultures protectrices.

Une culture protectrice est une culture antagoniste ajoutée à un produit alimentaire pour inhiber les bactéries pathogènes et/ou altérantes et ainsi prolonger sa durée de vie en changeant ses propriétés organoleptiques le moins possible (**Dortu et Thonart, 2009**).

La découverte des bactériocines a donné une impulsion pour le développement des aliments de meilleure qualité sanitaire et a stimulé une recherche intensive sur la découverte de nouvelles bactériocines et notamment de nouvelles souches productrices.

Considérant le fort potentiel des *Lactobacillus* à produire des bactériocines à intérêt alimentaire, il nous a semblé intéressant de réaliser ce travail ayant pour objectifs :

- de tester le pouvoir bactériocinogène de nos souches de *Lactobacillus* isolés à partir de selles d'enfants contre deux contaminants alimentaires : un pathogène *Listeria monocytogenes* et un germe indésirable *Bacillus cereus*.
- de caractériser l'extrait bactériocinogène vis-à-vis de la température, le pH, le stockage et la digestion par les enzymes.



**Etude bibliographique**

## I. Le genre *Lactobacillus*

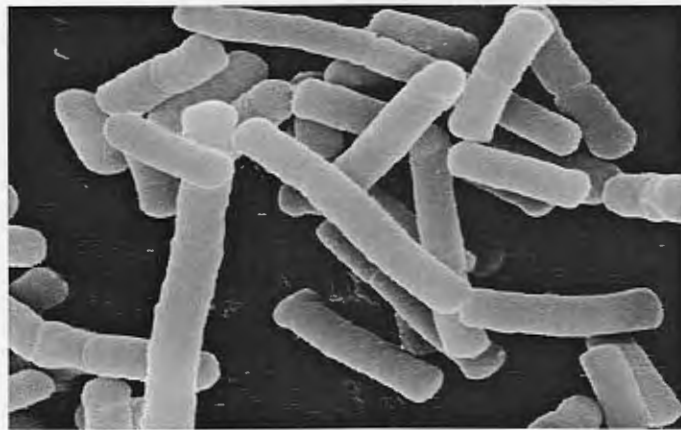
Il a été décrit en 1901 pour regrouper des bactéries à Gram positif isolées de produits laitiers et à métabolisme fermentaire. Ces bactéries possèdent la capacité de produire de l'acide lactique comme métabolite final, et sont classées dans le groupe des bactéries lactiques.

D'un point de vue phylogénétique, les bactéries lactiques appartiennent à la branche des *Clostridia*, regroupant des genres tels que *Clostridium*, *Bacillus*, *Listeria* et *Staphylococcus* (Rapport ADIV/OFIVAL, 2004).

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 (Larpen et Larpen, 1997).

Les principales souches reconnues en tant que probiotique et utilisées dans les produits alimentaires appartenant aux genres *Lactobacillus*. En effet, ces bactéries sont des membres de la flore normale de l'intestin, connu pour ne pas présenter de risque toxique ou infectieux et sont relativement faciles à inclure dans les produits alimentaires (Izquierdo, 2009).

La capacité de ces bactéries, d'exclure les espèces indésirables est certainement accrue par la production de toxines antimicrobiennes. Parmi ces derniers, les plus souvent rencontrées sont les bactériocines que l'on retrouve chez les principales espèces des *Lactobacillus*. L'utilisation potentielles des souches productrices de bactériocines comme probiotiques et agents bioprotecteurs a bénéficié récemment d'un intérêt croissant. Elles peuvent cibler certaines souches et sont donc éliminer ou empêcher l'installation d'un pathogène spécifique, de façon à ne pas altérer la flore endogène de l'hôte (Izquierdo, 2009).



**Figure (1) :** *Lactobacillus* observé au microscope électronique à transmission (x 10000). (Makhloufi, 2012).

### I.1. Habitat :

Les lactobacilles ont colonisé un nombre important de niches écologiques et représentent le groupe de bactéries lactiques le plus ubiquitaire dans l'environnement. Certains lactobacilles peuvent être isolés de plusieurs niches écologiques. *L. plantarum* par exemple, se retrouve dans un grand nombre de produits fermentés (lait, viandes, légumes) ainsi que dans le tractus digestif humain (Penaud, 2006).

Les lactobacilles comptent parmi la flore dominante de la microflore intestinale et sont présents tout au long du tractus gastro-intestinal en des quantités variables. Ils représentent environ 1% des micro-organismes, soit approximativement  $10^3$  à  $10^7$  bactéries/g de contenu intestinal (Saad, 2010).

## I.2. Caractères morphologiques et physiologiques

Les *Lactobacillus* sont des cellules allongées, régulières en forme de bâtonnets ou coccobacilles isolés ou en chaînettes de 2,7  $\mu\text{m}$  de longueur sur 0,5  $\mu\text{m}$  de diamètre, asporogènes, immobiles ou mobiles grâce à des flagelles péritriches. Leurs exigences nutritionnelles complexes et leurs températures de croissance (2 à 53 °C) sont très variables d'une espèce à l'autre, mais elles sont toutes acidophiles avec un pH optimal de croissance de 5,5 à 6,2 (Privat et Thonart, 2011). Ces bactéries ont aussi besoin d'acides aminés, de nucléotides et de vitamines pour se multiplier (Talliez, 2004).

## I.3. Caractères biochimiques :

Les *Lactobacillus* sont des aéro-anaérobie ou parfois anaérobies stricts, fermentant le glucose en produisant de l'acide lactique, oxydase négative, indole et H<sub>2</sub>S négative, Catalase négative, généralement nitrate réductase négative, gélatinasse négative et Arginine négative (Sutra *et al*, 1998).

## I.4. Classification

### I.4.1. Classification phénotypiques des espèces de *Lactobacillus*

Le genre *Lactobacillus* a été proposé par Beijerinck en 1901. Les critères phénotypiques restent encore très importants aujourd'hui pour la classification des Lactobacilles. Le genre est composé de plus de 120 espèces décrites et est génétiquement assez divers parce que le pourcentage en G+C varie entre 32 et 54 % (Penaud, 2006). Leur mode de fermentation donne lieu à une classification répartie en trois groupes distincts (Privat et Thonart, 2011 ; Sutra *et al*, 1998 ; Saad, 2010) :

**I.4.1.1. Groupe I** regroupe les lactobacilles homofermentaires stricts qui ne fermentent que les hexoses par la voie d'Embden-Meyerhof en produisant presque exclusivement du lactate. Ce groupe comprend notamment : *Lb. acidophilus*, *Lb. farciminis*, *Lb. johnsonii*, *Lb. amylovorus*, *Lb. paralimentarius*, *Lb. Delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lb. delbrueckii* subsp. *Lacti*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. nantensis*, *Lb. amylophilus*, *Lb. gallinarum*, *Lb. gasseri*, *Lb. helveticus*, *Lb. jensenii*, *Lb. kefiranofaciens*, *Lb. kefirgranum*, *Lb. mali*, *Lb. ruminis*, *Lb. salivarius* subsp. *salicinus*, *Lb. salivarius* subsp. *salivarius*, *Lb. sharpeae*.

La plupart des espèces sont présentes dans le lait et les produits laitiers, mais un grand nombre a été isolé chez l'Homme et les animaux (tractus digestif, organes génitaux) et participe à l'équilibre de la microflore de l'organisme.

**I.4.1.2. Groupe II** renferme les lactobacilles homohétérofermentaires facultatifs qui fermentent les hexoses, mais aussi les pentoses en lactate et acétate par la voie d'Embden-Meyerhof. Il s'agit en particulier de *Lb. alimentarius*, *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum*, *Lb. graminis*, *Lb. paracasei*, *Lb. paraplantarum*, *Lb. pentosus*, *Lb. sakei*, *Lb. agilis*, *Lb. acetotolerans*,

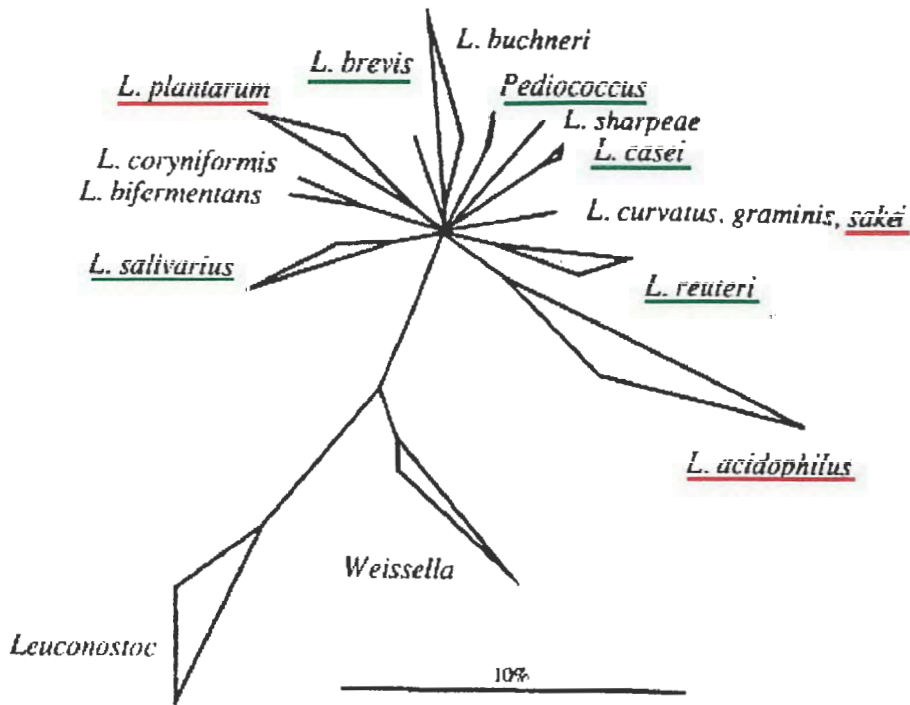


*Lb. Bifermentans*, *Lb. coryniformis*, *Lb. hamsteti*, *Lb. homohiochii*, *Lb. intestinalis*, *Lb. murinus*, *Lb. paracasei subsp. paracasei*, *Lb. tolerans*, *Lb. pentosus*, *Lb. rhamnosus*, Ces espèces bactériennes sont présentes dans les végétaux fermentés comme l'ensilage et dans les produits carnés et laitiers fermentés. Leur cellules sont courtes, souvent arrangées en filaments. Ils sont isolés dans les fourrages, les produits laitiers et les produits carnés.

**I.4.1.3. Groupe III** regroupe les lactobacilles hétérofermentaires stricts qui fermentent les hexoses en lactate, acétate (ou éthanol) et CO<sub>2</sub>. Les pentoses aussi sont fermentés en lactate et en acétate. Ces *Lactobacillus* ont un faible pouvoir acidifiant et produisent des substances aromatiques. Il s'agit notamment de *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, *Lb. fermentum*, *Lb. hilgardii*, *Lb. fructivorans*, *Lb. panis*, *Lb. pontis*, *Lb. reuteri*, *Lb. hammesii*, *Lb. sanfranciscensis*, *Lb. spicheri*, *Lb. Kimchii*, *Lb. frumenti*. Ces espèces se retrouvent dans les levains de panification et les produits laitiers fermentés, *Lb. collinoides*, *Lb. fructosus*, *Lb. malefermentans*, *Lb. oris*, *Lb. parabuchneri*, *Lb. parakefir*, *Lb. suebicus*, *Lb. vaccinofermentans*, *Lb. vaginalis*.

#### **I.4.2. Classification génotypiques des espèces de *Lactobacillus***

En raison de la diversité des phénotypes et des morphotypes des lactobacilles, l'identification de certaines espèces par les approches classiques reste délicate voire impossible. C'est le cas en particulier des espèces apparentées à *Lb. Acidophilus*, *Lb. plantarum*, *Lb. casei* dont certaines font l'objet de nombreux travaux compte tenu de leur importance dans le domaine des probiotiques. L'utilisation des outils de taxonomie moléculaire comme l'hybridation quantitative ADN/ADN, les séquences des gènes d'ARNr 16S ont permis de lever des ambiguïtés et de nommer 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 (Talliez, 2004).



**Figure (2) :** Distances phylogénétiques entre les genres principaux constituant les BL basées sur les séquences des ARNr 16S. Les bactéries à bas G+C (en haut) sont phylogénétiquement éloignées des bactéries à haut G+C (en bas). Sont soulignés en rouge les genres pour lesquels la séquence d'au moins un génome est disponible, en vert ceux pour lesquels au moins un génome est en cours de séquençage. La barre indique une divergence de séquence estimée de 10%. Adapté de Schleifer et Ludwig, 1995 (Penaud, 2006).

### I.5. 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 API50 CH avec l'utilisation du milieu pour Lactobacilles est la méthode biochimique la plus utilisée et probablement la plus fiable (Tankovic, 2007).

## I. Activité antimicrobienne des *Lactobacillus*

Le genre *Lactobacillus* a un rôle fondamental dans l'inhibition des flores non lactiques, dont certaines sont préjudiciables à la qualité des produits alimentaires. Cette action est due à l'abaissement du pH (qui inhibe la croissance de la plupart des germes non lactiques), à la toxicité des acides organiques, du peroxyde d'hydrogène et du diacétyl, mais aussi à la sécrétion de bactériocines (Privat et Thonart, 2011).

### II.1. pH et les acides organiques

Les produits principaux du métabolisme des *Lactobacillus* sont les acides organiques. Les acides organiques sont produits soit par la voie homofermentaire, soit par la voie hétérofermentaire. Le métabolisme du pyruvate conduit à la formation uniquement d'acide lactique chez les homofermentaires tandis qu'il conduit à la formation d'acide lactique, acétique et formique, d'éthanol et de dioxyde de carbone chez les hétérofermentaire (Smaoui, 2010). Grâce à cette production d'acides organiques, les *Lactobacillus* diminuent le pH du milieu dans lequel ils se multiplient en inhibant une partie de la flore qui s'y développe (Dortu, 2008). Les acides organiques sont un des agents classiques de préservation des aliments et sont reconnus comme des additifs alimentaires. Ils sont utilisés pour prévenir ou retarder la croissance des bactéries dégradant la nourriture (Smaoui, 2010). Le principal problème consécutif à leur utilisation est la haute concentration nécessaire pour inhiber les bactéries pathogènes ou indésirables et qui est parfois inacceptable pour le consommateur (Dortu, 2008).

### II. 2. Peroxyde d'hydrogène

Les bactéries lactiques ne possèdent pas de catalase typique contenant un noyau hème pour dégrader le peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau. Il peut s'accumuler et être inhibiteur de différents micro-organismes par l'oxydation des lipides membranaires et la destruction des structures des protéines cellulaires (Dortu, 2008., Baliarda, 2003., Smaoui, 2010). Son action se manifesterait aussi bien sur les germes indésirables que sur ceux qui sont indispensables au bon déroulement de la fermentation (Dortu, 2008).

### II.3. Diacétyl

Le diacétyl est produit suite à la dégradation du citrate (Ammor, 2004). Il est synthétisé par différents genres de bactéries lactiques comme *Lactococcus* sp., *Leuconostoc* sp., *Lactobacillus* sp. et *Pediococcus* sp. Le diacétyl (C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>) est un des composants aromatiques essentiels du beurre. Il a des propriétés antimicrobiennes qui sont dirigées contre les levures, les bactéries Gram-négatif et les bactéries Gram-positif non lactiques, ces dernières y sont néanmoins moins sensibles (Dortu, 2008).

### II.4. Dioxyde de carbone

*Lactobacillus* hétérofermentaires synthétisent du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) comme métabolite secondaire. Son accumulation dans le milieu extérieur crée une anaérobiose qui peut être toxique pour les microorganismes aérobies présents dans l'aliment. Toutefois, le dioxyde de carbone peut aussi, à faible concentration, stimuler la croissance de certaines bactéries (Baliarda, 2003).

## II.5. La reutérine

La reutérine (ou 3-hydroxypropionaldéhyde) est une substance antimicrobienne qui est produite comme métabolite intermédiaire pendant la fermentation anaérobie du glycérol par certaines espèces de *Lactobacillus* ainsi que par d'autres genres bactériens non lactiques tels que *Bacillus*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* et *Clostridium*. La reutérine s'accumule dans le microorganisme producteur et à haute concentration, elle est excrétée dans le milieu. Sa toxicité contre la cellule productrice limite sa production. La reutérine a un large spectre d'activité et a une action contre les bactéries (Gram-positif ou Gram-négatif), les champignons et les protozoaires (Smaoui, 2010).

## II.6. Bactériocine

Le premier prototype des bactériocines produites par les bactéries lactiques fût découvert en 1928 quand l'inhibition de la croissance de différentes bactéries lactiques par un métabolite produit par *Streptococcus lactis* fut observée. En 1953, Jacob *et al.* proposèrent le terme général « bactériocine ». Elles furent définies comme des antibiotiques protéiques, caractérisés par une activité bactéricide intra-espèce et une absorption par des récepteurs spécifiques sur la surface des cellules. En 1976, Tagg *et al.* Les définirent comme des composés protéiques ayant une action bactéricide contre les espèces apparentées à la souche productrice. Cette définition est correcte pour la majorité des bactériocines mais est trop restrictive étant donné que certaines peuvent avoir une activité bactéricide contre des espèces plus distantes de la souche productrice (Dortu, 2008).

### II.6.1. Définition

Les bactériocines sont définies comme des molécules sécrétées par les bactéries dans le milieu extracellulaire, de nature protéique ou partiellement protéique et douées d'une activité antagoniste vis-à-vis de souches phylogénétiquement proches des souches productrices (Morisset, 2003 ; Dacosta, 2000). Cette activité est soit bactéricide provoquant la mort de la bactérie cible, soit bactériostatique inhibant la croissance bactérienne (Makhloufi, 2012) Leur synthèse par voie ribosomique les différencie des antibiotiques de nature peptidique provenant de l'assemblage enzymatique d'acides aminés libres (Morisset, 2003).

Ou sont des peptides antimicrobiens le plus souvent cationiques, modifiés ou non post-traductionnellement (Makhloufi, 2012). Toutes les bactériocines produites par des bactéries lactiques décrites jusqu'à présent ont une activité dirigée contre les bactéries Gram+. La membrane externe des bactéries Gram- ne permettant pas aux bactériocines d'atteindre la membrane interne, siège de leur activité (Dortu et Thonart, 2008).

Les bactériocines représentent une large classe de substances antagonistes qui varient considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leur spectre d'action et de leur mode d'action (Dortu, 2008).

### II.6.2. Nomenclature

La nomenclature consiste à ajouter le suffixe « cine » (« cin » en anglais) au nom du genre ou de l'espèce dont elles proviennent ; par exemple, pédiocine 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, lactacine 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.6.3. Classification

Les bactériocines sont des protéines, avec une activité bactéricide contre les espèces proches de la souche productrice. Les bactériocines représentent une large classe de substances antagonistes qui varient considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leur spectre d'action et de leur mode d'action (Dortu, 2008).

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont réparties en quatre classes, comme proposé par Klaenhammer (1993). Ces quatre classes sont (Diop, 2008 ; Dortu et Thonart, 2009 ; Naghmouchi, 2007 ; Morisset, 2003 ; Dortu, 2008 ; Smaoui, 2010 ; Makhloufi, 2012) (tableau 2):

**II.6.3.1. Classe I :** Les lantibiotiques : peptides de taille inférieure à 5 kDa, stables à la chaleur et qui contiennent des acides aminés inhabituels soufrés formés post-traductionnellement, c'est-à-dire la lanthionine, la  $\beta$ -méthyl lanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine. Les séquences et structures d'un lantibiotique de chaque type se trouvent à la **figure 3**. Ils ont été subdivisés en deux sous-classes sur la base de leurs propriétés structurales et fonctionnelles :

**II.6.3.1.1. Sous classe Ia:** Qui comprend des peptides cationiques hydrophobes allongés contenant jusqu'à 34 acides aminés. En général, sont des peptides flexibles. Elles agissent en perturbant l'intégrité de la membrane cellulaire des cellules cibles où elles forment des pores qui provoquent un efflux important de métabolites cellulaires.

**II.6.3.1.2. Sous classe Ib:** Qui comprend les peptides globulaires chargés négativement ou sans charge nette et contenant jusqu'à 19 acides aminés. Certains lantibiotiques sont par ailleurs constitués de deux peptides agissant ensemble pour avoir une activité comme la lacticin 314.

**II.6.3.2. Classe II :** Peptides de taille inférieure à 10 kDa, stables à la chaleur, ne contenant pas d'acides aminés modifiés de manière post traductionnelle. Cette classe comprend une grande variété de structures, ce qui nécessite la création de plusieurs sous classes, elle est divisée en trois sous-classes.

**II.6.3.2.1. 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. Elles ont toutes une activité contre *Listeria monocytogenes*. 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.

**II.6.3.2.2. 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.





**Tableau (1):** Vue d'ensemble des bactériocines des bactéries lactiques (Diop, 2008).

Classe	Type	Caractéristiques	Taille KDa	charge	Exemples et producteur
Ia	lantibiotique	Modifications post-transcription, molécules flexibles	<5		Nisin ( <i>Lc. lactis</i> ) Lacticin ( <i>Lc. Lactis</i> )
Ib	lantibiotique	Modifications post-transcription, molécules globulaires	<5		Ancovenin ( <i>Strep ssp</i> )
IIa	Non lantibiotique	Thermostable, grande activité anti-listeria de type pediocin, un pont disulfure	<10	Fortement cationiques	Sakacin A ( <i>Lb. sake</i> ) Bavaricin A ( <i>Lb. bavaricus</i> )
IIb	Non lantibiotique (2peptides)		<25-65	faible	Lactacin F ( <i>Lb. johnsoni</i> ) Lactocin 705 ( <i>Lb. casei</i> )
IIc			<30-65	Cationique	
III		Grande taille, haut poids moléculaire, thermosensibles	>30		Helveticin J ( <i>Lb. helveticus</i> )
IV		Protéines complexes (moitié lipidique ou glucidique)			Leuconocin S ( <i>Ln. paramesenteroide</i> )

#### II.6.4. Biosynthèse

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 productrice ou être adsorbées à sa surface, ce qui mène à sa baisse de concentration de bactériocines dans le milieu de culture (Smaoui, 2010). Les souches productrices de bactériocines sont résistantes (immunité) à l'activité de leur propre bactériocine (Diop, 2008).

Plusieurs étapes sont nécessaires à la production d'une bactériocine mature par une bactérie (Izquierdo, 2009). 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 lanthionines, 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 (Izquierdo, 2009).

Différentes protéines sont impliquées dans la production des bactériocines et sa régulation. Cette production est souvent régulée par un système de *Quorum Sensing*; un mécanisme permettant à certains gènes d'être exprimés en fonction de la densité de la population bactérienne (Dortu et Thonart, 2009).

La comparaison des clusters génétiques de plusieurs bactériocines révèle un certain nombre de gènes conservés codant pour des protéines avec des fonctionnalités similaires. 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 avec son gène d'immunité qui protège le producteur des effets de bactériocine (Izquierdo, 2009).

Habituellement, un autre groupe de gènes codant un transporteur ABC impliqué dans le transport de la bactériocine vers le milieu extracellulaire ainsi que chez quelques bactériocines (Makhloufi, 2012), 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 les enzymes responsables des modifications post-traductionnelles (Izquierdo, 2009).

Les bactériocines des bactéries lactiques sont souvent synthétisées sous forme d'une prébactériocine, sorte de prépeptide inactif dont l'extension N-terminal très conservée, ou peptide leader est clivée pour libérer la bactériocine au cours de l'étape de maturation. 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 prébactériocine, 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 de sécrétion de la cellule (Izquierdo, 2009).

**Tableau (2):** Rôle des processus impliqués dans la biosynthèse d'une bactériocine (Lachance, 2000).

Processus	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 lantibiotique, modifie des acides aminés sur la bactériocine immature.
Transport	Transport 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.



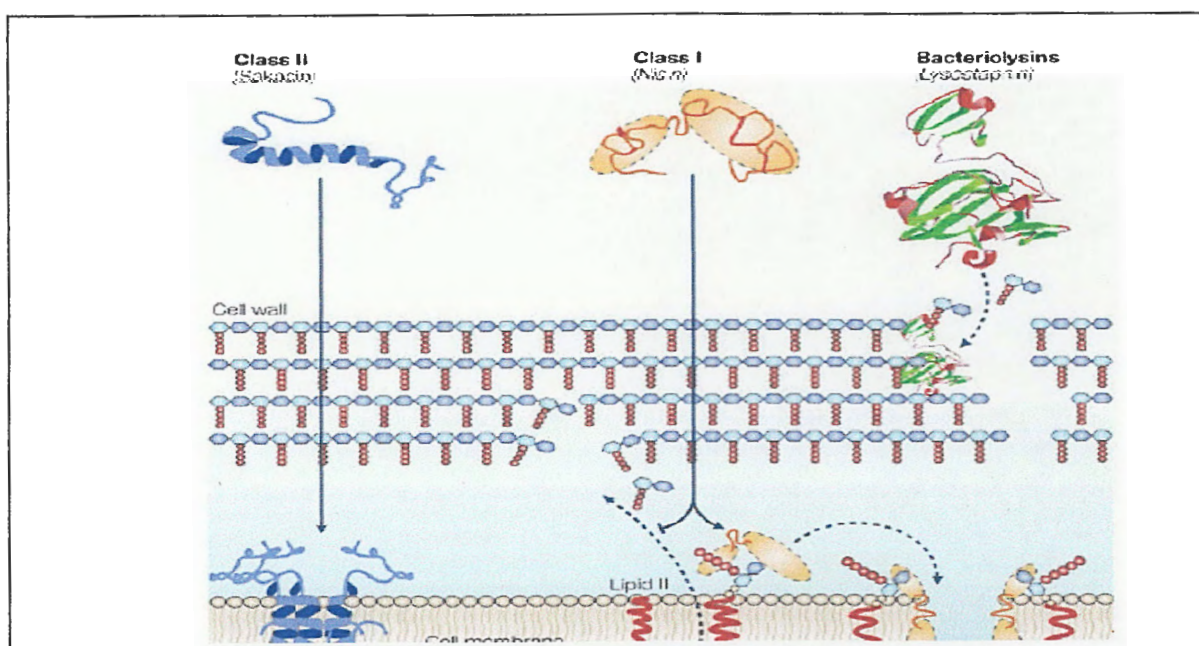
### II.6.5. Mode d'action :

Le siège d'activité des bactériocines est la membrane cellulaire, raison pour laquelle les bactériocines n'ont pas d'activité contre les bactéries Gram-. Cependant, les mécanismes d'action des bactériocines sur la membrane sont variés (**Dortu et Thonart, 2009**).

Les bactériocines de classe II représentent le cas typique de bactériocine agissant sur la membrane cytoplasmique des cellules sensibles en dissipant la force proton motrice (PMF : La force motrice protonique est un gradient électrochimique composé d'un potentiel transmembranaire ( $\Delta\psi$ ) et d'un gradient de pH ( $\Delta\text{pH}$ )). Ces gradients jouent un rôle de moniteur pour plusieurs processus cellulaires dépendant de l'énergie, permettant à la cellule de maintenir son intégrité (**Diop, 2008**) par la formation de petits pores membranaires. 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 des pores (**figure 4**), ceci résulte en un flux d'ions, d'acides aminés et d'ATP vers l'extérieur de la cellule et en la dissipation de PMF, avec comme conséquence la mort de la cellule (**Izquierdo, 2009**).

D'un autre coté, 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 la cellule, d'autre part elles utilisent le lipide II comme point d'ancrage pour initier le processus d'insertion dans la membrane et la formation de pores provoquant la mort rapide de la cellule. Les bactériocine 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 lysostaphine, dont l'action bactéricide consiste à cliver la partie peptidique du peptidoglycane des cellules cibles (**Izquierdo, 2009**).



**Figure 4** : Mode d'action des bactériocines des bactéries lactiques (**Izquierdo, 2009**).

## II.6.6. 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 est la semi - purification. Les bactériocines semi-purifiées peuvent alors être conditionnées sous forme sèche par atomisation ou lyophilisation. La nisine, la seule bactériocine légalement approuvée comme additif alimentaire, est commercialisée sous une forme semi-purifiée (Smaoui, 2010).

## II.7. Application des bactériocines dans le domaine alimentaire :

### II.7.1. Propriétés avantageuses des bactériocines pour une application alimentaire :

L'utilisation des bactériocines dans le domaine alimentaire est avantageuse non seulement à cause de leur large spectre d'activité, mais aussi parce qu'elles sont non toxiques (Smaoui, 2010). Elles ont une grande tolérance aux variations de pH et aux traitements thermiques facilement dégradables par les enzymes digestives et ne compromettent pas la prise des médicaments, elles peuvent donc cibler sélectivement des bactéries pathogènes ou détériorantes sans inhiber les bactéries indispensables et ont un mode d'action bactéricide (Dortu, 2008).

Du fait qu'elles sont des substances naturelles, l'emploi des bactériocines permettrait d'avoir des produits plus sains et réduirait l'utilisation des agents chimiques de conservation (Smaoui, 2010). Les bactériocines doivent cependant être considérées comme un moyen de préservation complémentaire à ceux déjà existant (Dortu, 2008).

### II.7.2. Application des bactériocines dans le Domaine alimentaire :

Ces dernières années, l'application des bactériocines dans la technologie agroalimentaire a gagné une grande attention (Baliarda, 2003). Les bactériocines peuvent être employées directement comme additifs et leur utilisation raisonnée permet sans aucun doute d'améliorer la sécurité microbiologique et la qualité des aliments, la nisine par exemple, produite et commercialisée sous une forme partiellement purifiée, est utilisée comme conservateur depuis plus de 40 ans. Malgré la variété de bactériocines connus à ce jour, la nisine reste la seule ayant reçu l'agrément de nombreux pays pour son utilisation comme additif alimentaire. Ce qui est vrai pour la nisine l'est aussi pour un grand nombre d'autres bactériocines dont l'utilisation n'est autorisée qu'à travers les souches productrices. Cependant, à ce jour, aucun autre bactériocines n'a été autorisée comme additif alimentaire (Izquierdo, 2009).

En effet, plusieurs bactériocines montrent des effets synergiques ou additionnels lorsqu'elles sont utilisées en combinaison avec d'autres agents antimicrobiens, incluant des conservateurs chimiques, des composés phénoliques naturels, et même d'autres protéines antimicrobiennes. L'utilisation combinée de bactériocines différentes, peut être aussi une approche attirante pour éviter le développement de souches résistantes. La combinaison de bactériocines avec des traitements physiques, comme le traitement à haute pression, offre une conservation plus efficace des produits alimentaires, fournissant ainsi une barrière complémentaire aux formes les plus résistantes comme les endospores bactériennes (Baliarda 2003).

**Tableau (3):** exemples d'application des bactéries lactiques productrices de bactériocine dans différents produits alimentaire (**Baliarda, 2003**).

Bactériocine	Application	Résultats
<b>Produits laitiers et fromages</b> Pediocine PA1	Utilisation d'un <i>Lc. lactis</i> producteur de pédiocine en tant que ferment dans la production de cheddar.	Réduction du nombre de <i>Listeria monocytogenes</i> .
Nisine	Utilisation d'un <i>Lc. lactis</i> producteur de nisine dans la préparation d'un dessert lacté.	Réduction du nombre de bactéries sporulantes durant la conservation à 4°C et 20°C.
Lacticine 3147	Utilisation d'un <i>Lc. lactis</i> producteur de lacticine dans la production du « cottage cheese ».	Réduction de 99,9% du nombre de <i>L. monocytogenes</i> Scott après 5 jours à 4°C.
<b>Produits carnés</b> Lactocine	Utilisation d'un <i>Lb. casei</i> producteur de lactocine pour contrôler la présence de <i>L. monocytogenes</i> dans la viande.	Inhibition de la croissance de <i>L. monocytogenes</i> dans la viande cuite.
Sakacine A	Incorporation d'un <i>Lb. sakei</i> producteur de skacine dans la viande hachée.	Inhibition de <i>L. monocytogenes</i> .

### II.7.3. Application des bactéries productrices de bactériocines :

C'est durant le XIXe siècle, au Danemark, que la première boisson fermentée fabriquée à partir d'un mélange de souches bactériennes isolées à partir de lait cru a été commercialisée. Le concept de ferment a ensuite évolué au début du XXe siècle après l'identification de quelques souches impliquées dans la fermentation (**Makhloufi, 2012**).

Les bactéries productrices de bactériocines peuvent être ajoutées comme starter dans des produits fermentés ou comme culture protectrice. Elles doivent être capables de croître et de produire des bactériocines dans l'aliment à conserver. La composition du produit (nutriments accessibles, pH, additifs alimentaires, etc.) et les conditions de stockage (température, atmosphère, activité d'eau, etc.) doivent donc permettre la croissance et la production des bactériocines (**Dortu et Thonart, 2009., Smaoui, 2010**).

Si les bactéries sont ajoutées en tant que starter dans des produits fermentés, elles doivent pouvoir conférer au produit les propriétés organoleptiques désirables tout en produisant des bactériocines. Les bactéries productrices de bactériocines peuvent être également ajoutées en combinaison avec un autre starter qui confèrera les propriétés organoleptiques désirables. Dans ce cas, la bactérie productrice de bactériocines ne doit pas détériorer les qualités organoleptiques de l'aliment fermenté et la bactériocine produite ne doit pas avoir d'activité contre le starter (**Dortu et Thonart, 2009., Smaoui, 2010**).



Si la bactérie est appliquée en tant que culture protectrice, elle doit être capable de produire sa bactériocine sans modifier les propriétés organoleptiques (**Dortu et Thonart, 2009., Smaoui, 2010**).

#### **II.7.4. Facteurs influençant l'efficacité des bactériocines dans les systèmes alimentaires :**

La production et l'activité des bactériocines dans les systèmes alimentaires peuvent être influencées par de nombreux facteurs, notamment ceux affectant négativement la production :

- La composition du produit est un des premiers facteurs pouvant réduire ou totalement dissiper l'activité de la bactériocine de par son adsorption sur des composantes du produit, la limitation de sa solubilité et de sa diffusion, sa dégradation par des protéases, l'interaction avec des additifs alimentaires ou des ingrédients.
- La température : 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.
- 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 (**Privat et Thonart, 2011**).

La composition du milieu, tout particulièrement les sources et concentrations de carbone et d'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. D'autre part, quelques études ont montré 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*. 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 lacticine 3147 et la nisine (**Smaoui, 2010**).

L'exposition des bactéries cibles à une condition environnementale défavorable, tel un pH modérément acide avant un stress, va lui conférer une résistance bien supérieure à celle observée quand le stress est appliqué directement (**Privat et Thonart, 2011**).

Les conditions de culture influencent fortement la production de bactériocines. En effet, l'optimisation de la croissance ne résulte pas nécessairement de l'optimisation de la production de bactériocines. Il a même été suggéré que des conditions de croissance défavorables permettent de stimuler leur production. Les températures et pH optimaux de production sont souvent inférieurs à ceux optimaux de la croissance. C'est par exemple le cas pour la production de sakacin P par *L. sakei* CCUG42687, d'amylovorin L471 par *L. amylovorus* DCE471 (**Smaoui, 2010**).

### III. Contamination des aliments par *Listeria monocytogenes* et *Bacillus cereus*

Les *Lactobacillus* sont recherchés en technologie alimentaire pour leurs propriétés acidifiantes et leur pouvoir inhibiteur vis-à-vis des micro-organismes pathogènes ou d'altération telles que *Listeria monocytogenes* et *Bacillus cereus* (Larpent et Larpent, 1997).

#### III.1. *Listeria monocytogenes*

##### III.1.1. Définition

Les cellules de *Listeria* sont des bacilles à coloration de Gram positif se présentant sous forme de bâtonnets courts et réguliers de 0,4 à 0,5 µm de diamètre sur 0,5 à 2 µm de long, aux extrémités arrondies, certaines cellules pouvant toutefois être incurvées. Elles se présentent de manière isolée ou groupées en V, mobile à 20-25°C au moyen de 5 à 6 flagelles péritriches et peu mobile ou immobile à 37°C, non sporulé, non capsulé **Figure (5)**.

*Listeria monocytogenes* peut être considérée comme un agent pathogène alimentaire « Parfait » car elle est ubiquiste, très résistante aux conditions difficiles (température, aw, pH...) et surtout elle est capable de se développer aux températures de réfrigération des aliments. La virulence des souches pourrait d'ailleurs être exaltée par leur développement à basse température (Sutra *et al*, 1998).



**Figure 5** : Aspect de *Listeria monocytogenes* au Gram (Belleflamme *et al*, 2006).

##### III.1.2. Caractères biochimiques

Aérobie-anaérobie facultatif, fermente de nombreux glucides sans gaz, ne produit pas d'urée et d'indole, Catalase positive et oxydase négative, D-xylosse: négative, L-rhamnose: négative, Ribose: positive, Mannitol: négative, Rouge de méthyle: positive, Voges proskauer : positive, Production de H<sub>2</sub>S: négative, glucose (acidification): positive, Citrate: négative, Nitrate réduit en nitrite : négative, Gélatine: négative (Rossel, 2003. Sutra *et al*, 1998).

##### III.1.3. Habitat

*Listeria monocytogenes* est une bactérie que l'on retrouve dans le sol, l'eau, les végétaux et l'environnement des ateliers de production alimentaire. Elle peut également être présente dans le tractus intestinal des animaux et de l'homme. *Listeria monocytogenes* est recherchée dans le

cadre des analyses obligatoires pour l'autocontrôle car elle peut être à l'origine d'intoxications alimentaires grave (Belleflamme *et al.*, 2006).

#### **III.1.4. Contamination des aliments par *L. monocytogenes***

Du fait de son caractère ubiquiste, *L. monocytogenes* peut contaminer les aliments à différents stades :

- Lors de la production des matières premières : viandes, lait produit végétaux ou produits d'origine aquatique.
- Lors de la transformation industrielle, du transport, de la commercialisation ou chez le consommateur (Sutra *et al.*, 1998).

Toutes les grandes catégories d'aliments, qu'il s'agisse du lait et des produits laitiers, de la viande crue et des produits carnés, des végétaux, ou encore des poissons ou crustacés et des plats préparés peuvent être contaminés par cette bactérie, avec des fréquences et des taux de contamination variables (Federighi, 2005).

#### **III.1.5. Pouvoir pathogène de *Listeria monocytogenes***

*Listeria monocytogenes* est un agent pathogène à l'origine de toxi-infections alimentaires. Aussi, elle peut être transmise à l'homme et aux animaux par voie orale, oculaire, cutanée, respiratoire ou par les voies urogénitales. L'hémolysine soluble est le produit toxique majeur de *Listeria monocytogenes*. Cette toxine est produite pendant la croissance de la bactérie, y compris en position intracellulaire. Cependant, la pathogénicité de listériose est rattachée essentiellement à sa capacité de multiplication dans l'organisme.

En matière de listériose humaine, il existe 3 types de personnes à risque : les nouveau-nés, les femmes enceintes et les personnes immunodéprimés.

Chez les nouveau-nés, la listériose entraîne deux formes anatomo-cliniques : une forme dite précoce, la plus fréquente, survenant souvent chez un prématuré et qui provoque la septicémie; et une forme tardive qui provoque la méningite (neurolistériose) chez l'enfant né à terme et chez l'enfant prématuré.

Chez les femmes enceintes, la listériose peut provoquer un avortement, si la contamination s'est produite pendant les trois premiers mois de la grossesse, ou un accouchement prématuré, si la contamination s'est produite pendant les derniers mois.

Par contre chez les adultes immunodéprimés, la listériose se traduit par plusieurs formes, parfois graves : méningites, méningo-encéphalite, encéphalite pures, septicémies très souvent mortelle (Tortura *et al.*, 2003).

#### **III.2. *Bacillus cereus***

*Bacillus cereus* est une bactérie largement présente dans l'environnement, capable de résister aux agressions environnementales et à certains procédés industriels grâce à la production

d'endospores. Elle est ainsi connue depuis fort longtemps dans l'industrie alimentaire comme une bactérie d'altération (Sutra *et al*, 1998).

### III.2.1. Définition

Les souches de *Bacillus cereus* sont constituées de bacilles à Gram positif ou à Gram variable, aux extrémités arrondies, généralement mobiles grâce à une ciliature péritriche, d'une longueur supérieure à 3 µm et d'un diamètre moyen de 1,4 µm, souvent groupés en chaînes, formant des spores non déformantes, ovales (ou parfois cylindriques), en position subterminale (ou parfois en position paracentrale), dépourvus de corps parasporal, (Leveau et Bouix, 1993).

Certaines souches de *Bacillus cereus* et notamment les souches associées à des infections ou à des toxi-infections possèdent une couche S (S-layer) qui recouvre la totalité de la paroi (Sutra *et al*, 1998).

### III.2.2. Caractères biochimiques

Aéro-anaérobies, catalase positive, fermentes le glucose, et réduit les nitrates, oxydase négative, manitol négative, Voges proskauer (VP) positive (Leveau et Bouix, 1993).

### III.2.3. Habitat

*Bacillus cereus* est une bactérie aérobie sporulée qui est largement répandue dans l'environnement, surtout dans le sol. A partir de laquelle elle se propage facilement à de nombreux types d'aliments, en particulier ceux d'origine végétale, ainsi que de la viande, les œufs, le lait et les produits laitiers (Abriouel *et al*, 2001).

### III.2.4. Contamination des aliments par *Bacillus cereus*

Les aliments incriminés sont très divers : potages, riz cuisinés, nouilles, légumes (purée d'épinards, carottes râpées, salades de lentilles, salades de tomates...) purées de pomme de terre, aliments déshydratés (poivre, poudre d'œufs, curry en poudre...), produits laitiers, lait en poudre, laits pour enfants, crèmes pâtisseries, crèmes glacées, pain, cookies, viandes de dinde, viandes de porc, viandes de bœuf, viandes en sauce, œufs, crevettes, homards....(Leveau et Bouix, 1993).

### III.2.5. Pouvoir pathogène de *Bacillus cereus*

Très largement répandu dans la nature, *Bacillus cereus* se comporte comme un pathogène opportuniste et cette espèce est également responsable de toxi-infections alimentaires. La présence de spores de *Bacillus cereus* pose de sérieux problèmes dans les industries agro-alimentaires (notamment les industries laitières) car non seulement elles sont résistantes à la chaleur mais elles ont la capacité d'adhérer fortement à de nombreuses surfaces y compris l'acier inoxydable.

Le *Bacillus cereus* est responsable chez l'homme :

- . Des infections respiratoires (dont des pneumonies nécrosantes, des pleurésies, des abcès...).
- . Des infections du système nerveux central (méningites, encéphalites, abcès...).



- . Des bactériémies, des septicémies, des endocardites et exceptionnellement des péricardites.
- . Des abcès et des gangrènes nécrotiques entraînant parfois l'amputation.
- . Des surinfections des plaies.
- . Des arthrites et des infections des prothèses articulaires.
- . Des infections génitales chez la femme.

Chez l'animal, le *Bacillus cereus* est responsable principalement des avortements et les mammites (Euzéby, 2003)

### III.3. Inhibition de *Listeria monocytogenes* et *Bacillus cereus* par les bactériocines des *Lactobacillus*

L'action des bactériocines de classe IIa sur les cellules sensibles tels que *L.monocytogenes* et *Bacillus cereus* est semblable aux autres bactériocines produites par les *Lactobacillus* (Naghmouchi, 2007).

Le mécanisme d'action des bactériocines de classe IIa est très largement étudié. Il a été admis qu'il se décompose en trois étapes. La première consiste en la fixation du peptide avec la membrane, c'est durant cette étape que la bactériocine adopte sa conformation tridimensionnelle permettant l'expression de son activité. La seconde étape est l'insertion de la bactériocine dans la membrane ou un récepteur spécifique, le « mannose perméase ». C'est durant cette étape que plusieurs peptides antibactériens sont recrutés pour former un pore dans la membrane de la cellule. La dernière étape est la formation du pore; La formation des pores membranaires se fait via un récepteur protéique (non lantibiotique) ou par une insertion directe dans les bicouches phospholipidiques (lantibiotiques) ce qui induit la perméabilisation de la membrane cytoplasmique, causent la perte de la force proton-motrice (FPM) et induit le relargage du potassium intracellulaire et du phosphate inorganique ainsi que les acides aminés libres et par conséquent, la mort de la cellule (Jasnirwski, 2008 ; Dortu et Thonart, 2009; Smaoui, 2010 ; Naghmouchi, 2007).

L'adhésion de la bactériocine de type classe IIa à la membrane cytoplasmique est influencée par différents paramètres tel que le pH et la composition lipidique de la membrane. Ces paramètres ont des rôles déterminants dans l'interaction bactériocine membrane. Ainsi, un milieu acide favorise la protonation des résidus (histidine, lysine qui contribuerait de façon significative à la liaison de la bactériocine aux membranes. Les bactériocines de classe IIa n'induisent pas un flux d'ATP puisque les diamètres des pores formés par la bactériocine ne permettent pas le relargage de l'ATP (Naghmouchi, 2007).







**Etude expérimentale**

Ce travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences Exactes et des Science de la Nature et de la Vie de l'Université de Jijel durant la période entre le mois de mars et juin de l'année 2012.

## I. Matériel

### I.1. Matériel biologique

#### I.1.1. Souches bactériennes

Les souches de *Lactobacillus* isolées et identifiées par nos collègues durant l'année 2010 et 2011, ont été testées pour leur activité antimicrobienne contre *Listeria monocytogenes* CWBI\* et *Bacillus cereus* CWBI\* isolées tous les deux à partir d'aliments. Il s'agit des souches:

A8 : *Lactobacillus*, D8: *Lactobacillus gasserii*, B3 : *Lactobacillus*, A13 : *Lactobacillus*, H7' : *Lactobacillus*, B7: *Lactobacillus*, I2 : *Lactobacillus acidophilus*, A20 : *L. paracasei subsp paracasei*.

\*CWBI : Centre de la Wallonie Bio- Industrie de la Belgique / Faculté de agro-alimentaire. Gembloux.

#### I.1.2. Milieux de cultures

- Gélose MRS (Man, Rogosa, Sharp) : Milieu sélectif pour la culture des *Lactobacillus* additionné de 1%de cystéine (préparer au laboratoire).
- Bouillon MRS
- Gélose nutritive : pour la recherche de l'activité antimicrobienne pour *Bacillus cereus* (Institut Pasteur d'Alger).
- Gélose M17 : pour la recherche de l'activité antimicrobienne pour *Listeria monocytogenes* (Institut Pasteur d'Alger).
- Milieu Muller- Hinton : pour la détermination de l'antagonisme microbien (Institut Pasteur d'Alger).
- Bouillon nutritif : pour la culture des souches indicatrices (Institut Pasteur d'Alger).

**I.1.3. Réactifs**

- HCL (1N), la soude NaOH (5N).
- Les enzymes : Catalase (Sigma), Trypsine (Fluka),  $\alpha$ -amylase (Fluka),  $\alpha$ -chymotrypsine (Merck), Protéinase-K (Sigma).
- Cystéine.
- Antifongique : Nystatine.

**I.1.4. Matériel et appareillages**

- Etuve de 37,20°C (Memmert).
- pH mètre (Hanna Instruments).
- Four Pasteur (Controls).
- Agitateur magnétique chauffant (Bunsen).
- Centrifugeuse (Hettich).
- Spectrophotomètre (UV Shimadzu).
- Vortex (Minishaker Ika).
- Bain Marie (Gerhart, Memmert).
- Autoclave (Slli).
- Haut (Tel star).
- Réfrigérateur (Condor).
- Balance (Denver).
- Filtre millipore (0,22  $\mu$ m).
- Les seringues de 5ml.
- Papier Wattman N°3.

## I.2. Méthodes

### I.2.1. Enrichissement

Les souches de *Lactobacillus* conservées dans des billes d'alginate sont ensemencées dans de bouillon MRS enrichi à la cystéine, ensuite les bouillons MRS sont homogénéisés au moyen d'un vortex et incubées 37<sup>0</sup> C en anaérobiose.

### I.2.2. Isolement

L'isolement est réalisé sur milieu MRS solide, milieu adapté à la recherche spécifique des lactobacilles. Les cultures sont incubées 24 à 72 heure à 37°C dans des boîtes de Pétri en anaérobiose. Après l'incubation, 04 repiquages successifs sont effectués afin de s'assurer de la pureté des souches.

### I.2.3. Pouvoir antagoniste des souches :

L'étude du pouvoir antagoniste des *Lactobacillus* vis-à-vis des germes indicateurs a été réalisée par la méthode des disques ou portes germes.

Des cultures jeunes sont préalablement préparer aussi bien pour les *Lactobacillus* que pour les germes tests. Les cultures doivent avoir une DO<sub>620nm</sub> de 0,08 après 18 à 24h d'incubation.

Le test consiste à :

- Inonder en surface les boites de Pétri contenant de la gélose nutritive par un millilitre de la culture jeune de *Bacillus cereus* et le milieu M17 gélosé par un millilitre de la culture de *Listeria monocytogenes*.

- incuber les boites pendant 3 heures à 37°C. Après incubation, déposer à la surface de la gélose des disques en papier Wattman N° 3 stériles et imprégnés par la culture des *Lactobacillus* à tester

- Mettre les boites à 4°C pendant 4h pour assurer la diffusion des substances responsables de l'interaction antagoniste, enfin incuber les boites 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 (Celestine *et al.*, 2011).

### I.2.4. Etude 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 bactériocines est détectée par le pouvoir inhibiteur du filtrat du micro-organisme testé sur la croissance du germe cible (Elmoualdi *et al.* 2008).

Les *Lactobacillus* produisent différentes substances antimicrobiennes entre autres l'acide lactique (diminution du pH), le peroxyde d'oxygène et les bactériocines. Le but de notre travail est de mettre en évidence l'effet antagoniste par l'action de bactériocines des souches de *Lactobacillus* étudiées.

### I.2.4.1. Préparation de surnageant

Une culture des souches de *Lactobacillus* est réalisée sur bouillon MRS à 1% de glucose pendant 24 heures à 37 °C, 20ml pour chaque souche. Cette étape une fois effectuée, la culture est soumise à une centrifugation à 6000 rpm durant 40min à 4°C et le surnageant obtenu est filtré sur filtre millipores stériles de diamètre 0,22µm.

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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a été réalisée par ajustement du pH à 6,5 et l'addition de quelques gouttes de la catalase au surnageant des souches sélectionnées (Diop *et al.*, 2007 ; Arokiyarny et Sivakumar ., 2012).

### I.2.4.2. Détermination de l'activité bactériocinogène du surnageant neutralisé et traité à la catalase SNTC

L'activité antimicrobienne du SNTC a été testée selon la méthode de la diffusion des puits selon la technique de Barefoot et al (1983) cité dans Diop *et al* (2007), 10µl d'une culture d'une nuit des germes indicateurs sont ensemencés dans 20ml de gélose Muller-Hinton fondue dans des boîtes de Petri.

Des puits de 6 mm de diamètre sont creusés stérilement sur cette surface. Ces puits seront remplis avec 60 µL du surnageant. Ces boîtes de Pétri sont mises à une température de +4°C pendant 4h pour permettre la bonne diffusion de la substance antibactérienne.

Les cultures seront mises dans leur condition optimale de croissance. La lecture se fait par la mesure du diamètre en mm des zones d'inhibition formée autour des puits. On dit qu'une inhibition est positive si le diamètre est supérieur à 8 mm) .

### I.2.4.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice, des dilutions décimales des nos surnageants ont été préparées comme suit : 1ml du surnageant SNTC est ajouté à 9ml d'eau distillée stérile : c'est la dilution 10<sup>-1</sup>, à partir de cette dernière ; on prépare les dilutions suivantes 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> jusqu'à 10<sup>-7</sup>. L'activité bactériocinogène des ces différents dilutions de la solution de bactériocines, est testée par la technique des puits décrite précédemment. Après incubation à 37°C, les zones d'inhibitions sont mesurées. La CMI est exprimée en unité arbitraire/ millilitre ou par gramme (AU/ml ou AU/g) et est déterminée en utilisant les techniques de la dilution critique et de diffusion selon la formule [(1000/60) x (1/D)]. 60 étant le volume de l'échantillon (µl) inoculé dans le puits et D, la plus grande dilution de la solution de bactériocine ayant montré une activité inhibitrice contre la souche indicatrice (Diop, 2008 ; Izquierdo, 2009).

## I.2.5. Caractérisation des extraits bactériocinogènes

### I.2.5.1. Effet des enzymes protéolytiques

L'effet des enzymes protéolytiques suivantes: Trypsine, α- chymotrypsine et l'amylase a été étudié afin de déterminer la nature protéique de la bactériocine. Le SNTC doté d'une activité inhibitrice est additionné aux enzymes à une concentration finale de 1mg/ml. Après incubation à 37 °C pendant 1 heure, l'activité inhibitrice résiduelle est déterminée sur nos deux germes tests

*B. cereus* et *L. monocytogenes* par comparaison avec le témoin, par la technique des puits (Rajaram *et al.*, 2010 ).

#### **I.2.5.2. Détermination du pH optimal d'action**

Le pH optimum d'action des substances présumés bactériocinogènes est mis en évidence à différents pH. L'extrait bactériocinique est ajusté à des valeurs de pH de 5,7 et 9 avec HCl (1N) ou du NaOH (5N). Après une incubation de 4h 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 pH (Ogunbanwo *et al.* , 2003), L'activité bactériocinogène a été testée par la suite sur les germes cibles : *Bacillus cereus* et *Listeria monocytogenes* par la technique des puits.

#### **I.2.5.3. Effet de la température et du pH**

Pour déterminer l'effet combiné de la température et du pH sur la stabilité des substances présumées bactériocinogènes, des dilutions correspondants à la CMI de l'activité bactériocinogène de SNTC de chaque souche ont été préparées et ajustées à pH 5, 7 et 9, et des aliquotes de chacune d'elles ont été ensuite chauffées à 60, 70, 90, 100, et 120 ° C pendant 10 min. L'activité résiduelle a été mesurée par rapport à l'activité de chaque pH avant traitement thermique. L'activité bactériocinogène a été testée par la suite sur les germes cibles : *Bacillus cereus* et *Listeria monocytogenes* par la technique des puits (Diop, 2008).

#### **I.2.5.4. Détermination de la stabilité thermique de la bactériocine au cours du stockage**

Afin d'examiner la stabilité thermique de la bactériocine au cours du stockage, différentes fractions d'extraits bactériocinogènes sont conservées à pH optimal à des températures différentes: 37 °C, 4 °C et à 20 °C pendant 7 jours. L'activité de la bactériocine est testée vis-à-vis de *Bacillus cereus* et *Listeria monocytogenes* par la technique des puits (Ogunbanwo *et al.*, 2003 ; Banerjee *et al.*, 2011).



## I. Résultats et discussion

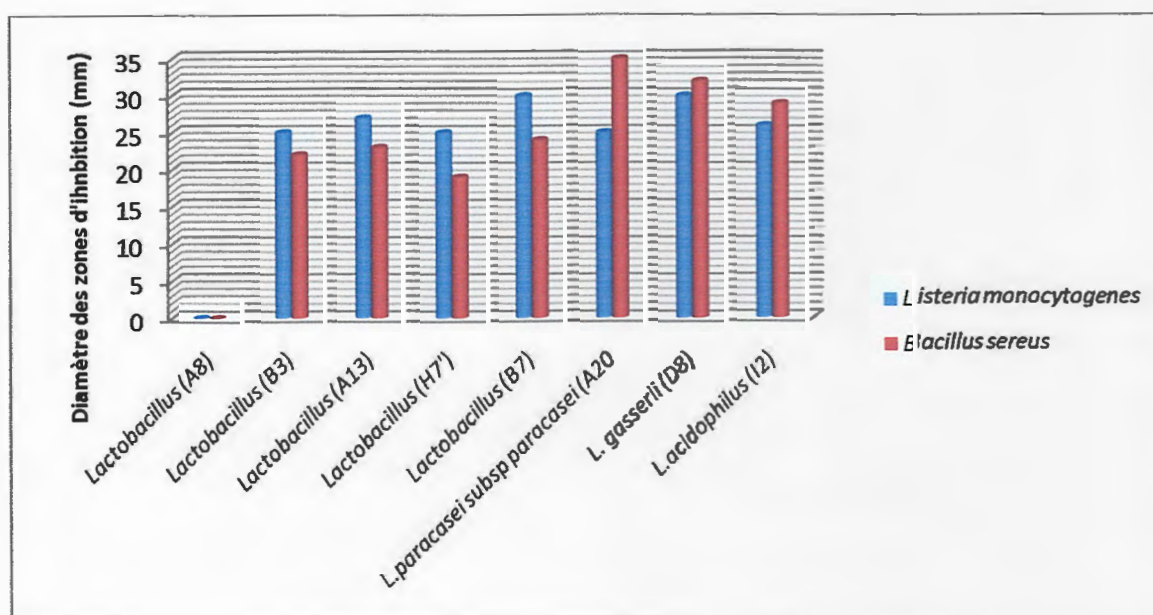
### I.1. Pouvoir antagoniste des souches :

Les résultats obtenus au cours de ce test, visant à mettre en évidence une éventuelle production de substances inhibitrices par notre collection de souches de *Lactobacillus* envers *Listeria monocytogenes* et *Bacillus cereus*, sont résumés dans le **tableau (4)**.

**Tableau (4)** : les résultats de l'antagonisme bactérien entre les souches de *Lactobacillus* et les germes indicateurs.

Souches indicatrices <i>Lactobacillus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Lactobacillus</i> (A8)	-	-
<i>Lactobacillus</i> (B3)	25	22
<i>Lactobacillus</i> (A13)	27	23
<i>Lactobacillus</i> (H7')	25	19
<i>Lactobacillus</i> (B7)	30	24
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> (A20)	25	35
<i>Lactobacillus gasserii</i> (D8)	30	32
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (I2)	26	29

Les zones d'inhibition sont mesurées en mm.



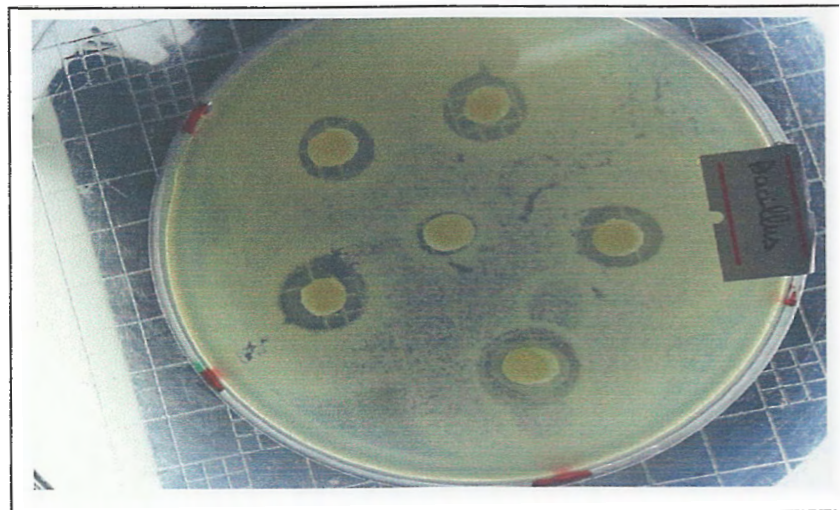
**Figure (6)** : L'antagonisme bactérien entre les souches de *Lactobacillus* et les germes indicateurs.

Les huit souches sélectionnées et mises au test de l'activité antimicrobienne ont manifestés un antagonisme vis-à-vis de *Listeria monocytogenes* et *Bacillus cereus*, sauf la souche qui porte le code A8 comme le montre la **figure (6)**.

Selon **Dortu et Thonart (2009)**, le pouvoir inhibiteur des *Lactobacillus* provient la production de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes tels que :

- Production d'acides organiques, essentiellement de l'acide lactique qui provoque l'abaissement de pH ;
- Production de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ;
- Production de bactériocines.

A ce stade de notre travail, nous ne pouvons pas donc déterminer quelle est la cause de l'antagonisme des souches de *Lactobacillus* contre les germes indicateurs.



**Photo (1) :** Antagonisme des *Lactobacillus* contre *Bacillus cereus*.

## I.2. Détermination de l'activité bactériocinogène du SNTC

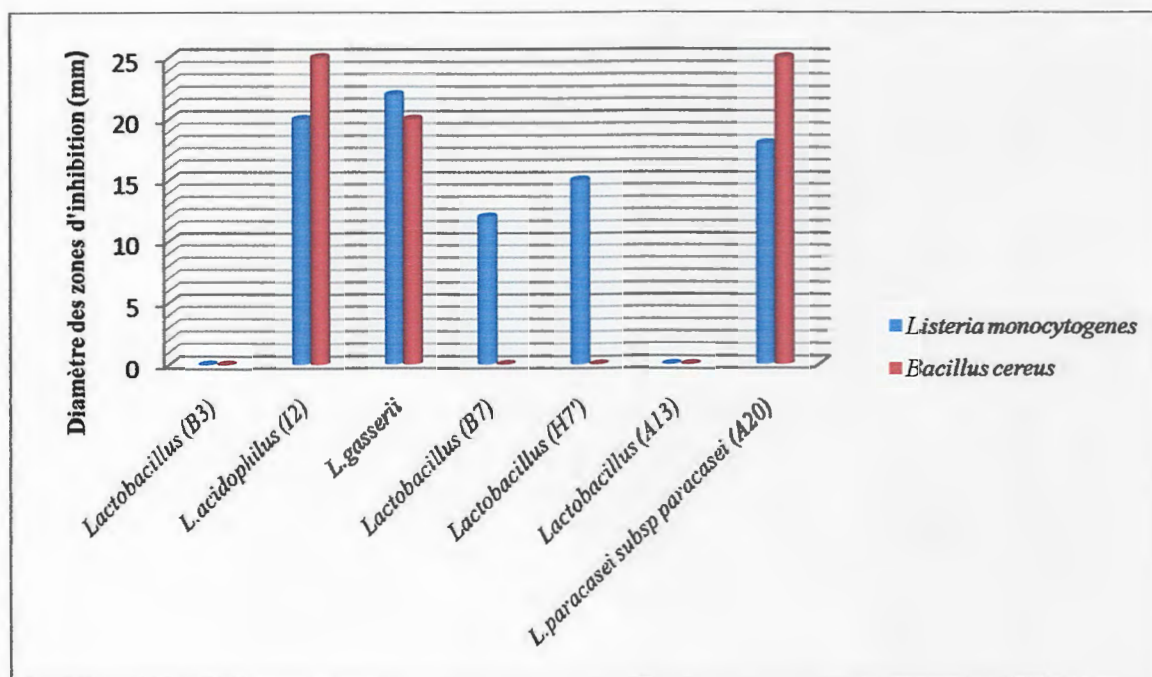
Les résultats de l'activité antimicrobienne des surnageant neutralisés et traités par Catalase vis-à-vis de *Listeria monocytogenes* et *Bacillus cereus* sont résumés dans le **tableau (5)**.



**Tableau (5) :** Activité antimicrobienne des surnageants neutralisés et traités par catalase vis-à-vis de *Listeria monocytogenes* et *Bacillus cereus*.

Souches indicatrices <i>Lactobacillus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Lactobacillus</i> (B3)	-	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (I2)	20	25
<i>Lactobacillus gasseri</i> (D8)	22	20
<i>Lactobacillus</i> (B7)	12	-
<i>Lactobacillus</i> (H7')	15	-
<i>Lactobacillus</i> (A13)	-	-
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> (A20)	18	25

Les zones d'inhibition sont mesurées en mm.

**Figure (7) :** Activité antimicrobienne des surnageants neutralisés et traités par catalase vis-à-vis de *Listeria monocytogenes* et *Bacillus cereus*.

D'après le **tableau (5)** et la **figure (7)**, on remarque que les souches : *L. acidophilus* (I2), *L. paracasei subsp paracasei* (A20) et *L. gasserii* (D8) présentent de bons profils d'inhibition bactériociniques vis-à-vis des germes indicateurs, par ailleurs les souches B7 et H7', leurs SNTC ne sont actifs que sur *L. monocytogenes* et les SNTC des souches portant les code B3 et A13 ne présentent aucune activité inhibitrice vis-à-vis des germes tests.

L'inhibition par l'acide lactique et l' $H_2O_2$  étant exclue par neutralisation du pH des surnageants et l'ajout de catalase, par conséquent, l'activité antimicrobiennes des surnageants des souches de *Lactobacillus* I2, D8 et A20 est probablement due à des substances de nature bactériocines (Yang et al., 1992).

Les souches *L. acidophilus* (I2), *L. paracasei subsp paracasei* (A20) et *L. gasserii* (D8) ayant présentées une activité sur les deux germes contaminants testés : *L. monocytogenes* et *Bacillus cereus* ont été sélectionnées pour la suite de notre travail.

### I.3. Test de la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

**Tableau (6)** : concentrations minimales inhibitrices (CMI) des *Lactobacillus* vis-à-vis de *Listeria monocytogenes* exprimées en UA/ml.

<i>Lactobacillus</i> Dilutions	<i>L. paracasei subsp paracasei</i> (A20)	<i>L. acidophilus</i> (I2)	<i>L. gasserii</i> (D8)
SNTC non dilué (témoin)	20 mm	19 mm	21 mm
$10^{-1}$	11 mm	10 mm	10 mm
$10^{-2}$	9 mm ( $1,6 \cdot 10^3$ UA/ml)	8 mm ( $1,6 \cdot 10^3$ UA/ml)	8 mm ( $1,6 \cdot 10^3$ UA/ml)
$10^{-3}$	-	-	-
$10^{-4}$	-	-	-
$10^{-5}$	-	-	-
$10^{-6}$	-	-	-
$10^{-7}$	-	-	-

Les valeurs entre parenthèses expriment les unités arbitraires par millilitre.

**Tableau (7) :** concentrations minimales inhibitrices (CMI) des *Lactobacillus* vis-à-vis *Bacillus cereus* exprimées en UA/ml.

<i>Lactobacillus</i> Dilutions	<i>L. paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> (A20)	<i>L. acidophilus</i> (I2)	<i>L. gasserii</i> (D8)
SNTC non dilué	22 mm	20 mm	24 mm
10 <sup>-1</sup>	11 mm	10 mm	14 mm
10 <sup>-2</sup>	9 mm (1,6 .10 <sup>3</sup> UA/ml)	8 mm (1,6 .10 <sup>3</sup> UA/ml)	8 mm (1,6 .10 <sup>3</sup> UA/ml)
10 <sup>-3</sup>	-	-	-
10 <sup>-4</sup>	-	-	-
10 <sup>-5</sup>	-	-	-
10 <sup>-6</sup>	-	-	-
10 <sup>-7</sup>	-	-	-

Les valeurs entre parenthèses expriment les unités arbitraires par millilitre

L'unité arbitraire (UA/ml ou UA/g) est définie comme l'inverse de la plus grande dilution ayant donné une zone d'inhibition > 8mm (Diop *et al*, 2007).

D'après nos résultats, nous remarquons que la plus grande dilution de la solution bactériocinogène des *Lactobacillus* ayant montré une activité inhibitrice contre les souches indicatrices est 10<sup>-2</sup> et de ce fait l'unité arbitraire de nos souches est de l'ordre de 1,6.10<sup>3</sup> UA/ml. Diop *et al* (2007) ont rapporté des résultats similaires aux notre (Diop *et al* 2007).

#### I.4. Caractérisation de l'extrait bactériocinogène

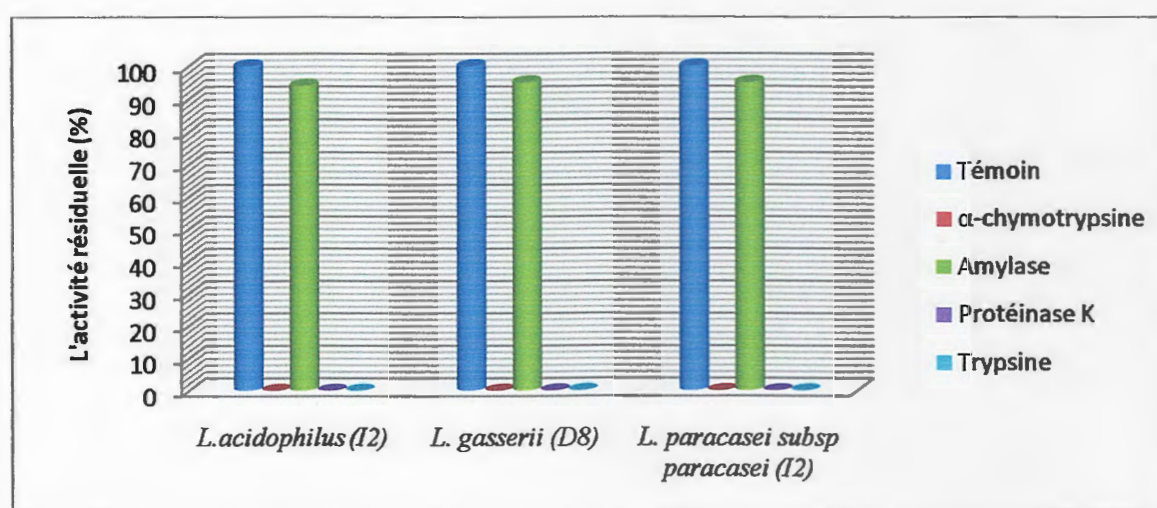
##### I.4.1. Effet des enzymes sur l'activité antimicrobienne des surnageants

Les résultats concernant l'effet des enzymes sur les SNTC de nos souches testées sur les germes indicateurs sont présentés dans les tableaux (8 et 9).

**Tableau (8):** Effet des enzymes sur l'activité antimicrobienne des SNTC des souches de *Lactobacillus* sur *Bacillus cereus*.

Enzymes <i>Lactobacillus</i>	Témoin	$\alpha$ -chymotrypsine	Amylase	Protéinase K	Trypsine
<i>L. acidophilus</i> (I2)	25 mm (100%)	0 mm (0%)	24 mm (96%)	0 mm (0%)	0 mm (0%)
<i>L. gasseri</i> (D8)	21mm (100%)	0 mm (0%)	20 mm (95%)	0 mm (0%)	0 mm (0%)
<i>L. paracasei</i> <i>subsp paracasei</i> (A20)	20 mm (100%)	0 mm (0%)	18 mm (90%)	0mm (0%)	0 mm (0%)

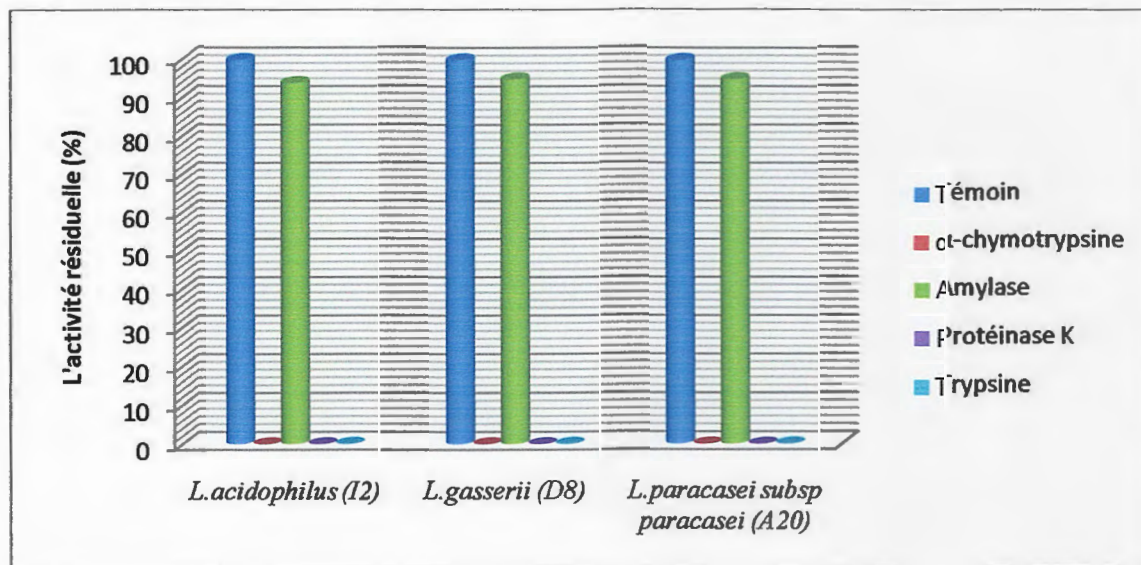
Les chiffres entre parenthèses représentent l'activité résiduelle des surnageants neutralisés traités par enzymes.

**Figure(8) :** L'activité résiduelle des surnageants neutralisés et traités par les enzymes contre *B.cereus*.**Tableau (9):** Effet des enzymes sur l'activité antimicrobienne des SNTC des souches de *Lactobacillus* sur *Listeria monocytogenes*.

Enzymes <i>Lactobacillus</i>	Témoin	$\alpha$ - chymotrypsine	Amylase	Protéinase K	Trypsine
<i>L.acidophilus</i> (I2)	19 mm (100%)	0 mm (0%)	18 mm (94 %)	0 mm (0%)	0 mm (0%)
<i>L.gasseri</i> (D8)	21 mm (100%)	0 mm (0%)	20 mm (95%)	0 mm (0%)	0 mm (0%)
<i>L.paracasei</i> <i>subsp</i> <i>paracasei</i> (A20)	20 mm (100%)	0 mm (0%)	19 mm (95%)	0 mm (0%)	0 mm (0%)

Les chiffres entre parenthèses représentent l'activité résiduelle des surnageants neutralisés traités par enzymes.





**Figure (9)** :L'activité résiduelle des surnageants neutralisés et traités par les enzymes contre *Listeria monocytogenes*.

D'après nos résultats et les graphes, on remarque qu'après le traitement des SNTC avec différentes enzymes protéolytiques (trypsine,  $\alpha$ -chymotrypsine, la protéinase K), il y'a une perte totale de l'activité inhibitrice de nos surnageants ; ceci laisse à suggérer que les substances présentes dans les surnageants de nos souches sont de nature protéique et qu'elles ont été digérées par ces enzymes, par contre, le traitement avec l' $\alpha$ -amylase, n'a pas affecté l'activité de ces substances produites par les *Lactobacillus*, ceci montre que ces « bactériocines » ne sont pas composées d'une fraction glucidique et par conséquent ne peuvent pas appartenir à la classe IV des bactériocines. Des résultats similaires ont été rapportés par Rattanachakunsopon Phumkhachorn (2006), Hernandez et al. (2005) (Tiwari et Srivastava, 2008 ; Banerjee et al, 2011 ; Todorov et Dicks, 2005 ; Rajaram et al., 2010)



**Photo (2)**: L'activité résiduelle du SNTC sur *Listeria monocytogenes* après traitement par Protéinase K.

#### I.4.2. Détermination du pH optimal d'action des surnageants neutralisés et traités par catalase (SNTC)

Les résultats de la détermination du pH optimal des surnageants neutralisés et traités par catalase sont mentionnés dans le **tableau (10,11)**.

**Tableau (10):** L'effet du pH sur l'activité antimicrobienne des SNCT des souches de *Lactobacillus* sur *Listeria monocytogenes*.

Souche indicatrice: <i>Listeria monocytogenes</i>			
<i>Lactobacillus</i> pH	<i>L. paracasei subsp paracasei</i> (A20)	<i>L. acidophilus</i> (I2)	<i>L. gasserii</i> (D8)
5	21	25	23
7	18	19	18
9	11	11	12

Les zones d'inhibition en mm.

**Tableau (11):** L'effet du pH sur l'activité antimicrobienne des SNCT des souches de *Lactobacillus* sur *Bacillus cereus*.

Souche indicatrice : <i>Bacillus cereus</i>			
<i>Lactobacillus</i> pH	<i>L. paracasei subsp paracasei</i> (A20)	<i>L. acidophilus</i> (I2)	<i>L. gasserii</i> (D8)
5	14	16	14
7	16	15	13
9	10	11	10

Les zones d'inhibition en mm.

D'après nos résultats, nous remarquons que l'activité des surnageants neutralisés et traités par catalase se manifeste le mieux à des pH 5 et pH 7, avec une réduction plus ou moins importante de l'activité à pH 9. Des études ont montrées des résultats similaires aux notre ; selon lesquelles plus forte activité a été enregistrée dans l'intervalle de pH de 5,5 à 7,5 (**Sarika et al 2010 ; Diop et al. 2007**).

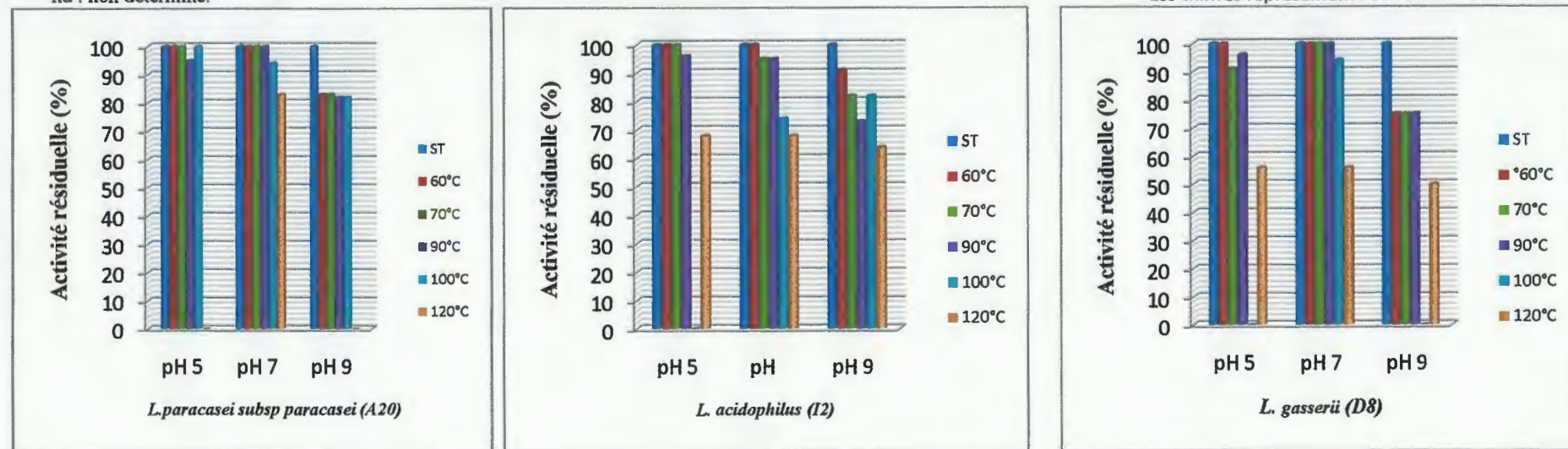
Egalement, une récente étude de Sivakumar *et al.* (2010), montra que les bactériocines produites par les souches de *Lactobacillus* sont stables entre des valeurs de pH 5 et 7, avec une diminution d'activité s'affichant aux pH 9 et 10.

Tableau (12) : Effet de la température à différents pH sur l'activité antimicrobienne des SNTC des souches des *Lactobacillus* sur *Listeria monocytogenes*.

pH	5					7					9				
T°C	60	70	90	100	120	60	70	90	100	120	60	70	90	100	120
<i>Lactobacillus</i>															
<i>L. paracasei</i> sp <i>paracasei</i> (A20)	100	100	95	100	nd	100	100	100	94	83	83	83	82	82	nd
<i>L. acidophilus</i> (I2)	100	100	96	nd	68	100	95	95	74	68	91	82	73	82	64
<i>L. gasserii</i> (D8)	100	91	96	nd	56	100	80	100	94	56	75	75	75	nd	67

- nd : non déterminé.

-Les chiffres représentent l'activité résiduelle des SNTC (%).



ST : surnageant non traité par la chaleur (Témoin).

Figure (10) : L'activité résiduelle des SNTC soumis à différentes température et à différents pH sur *Listeria monocytogenes*

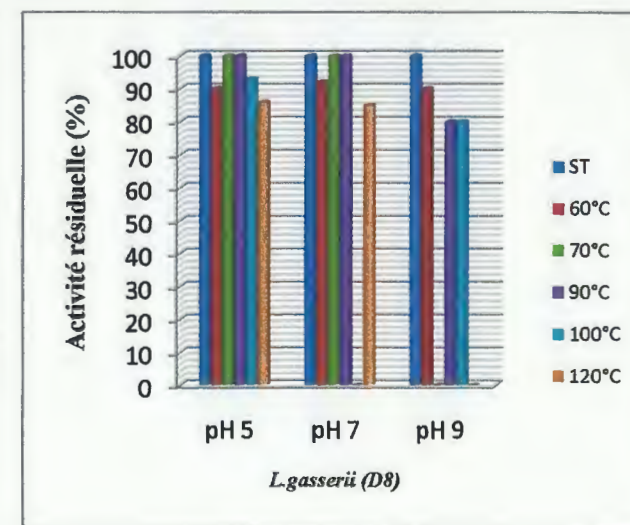
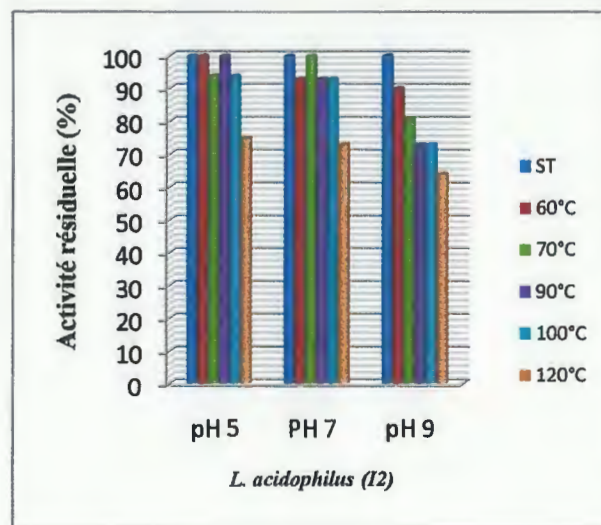
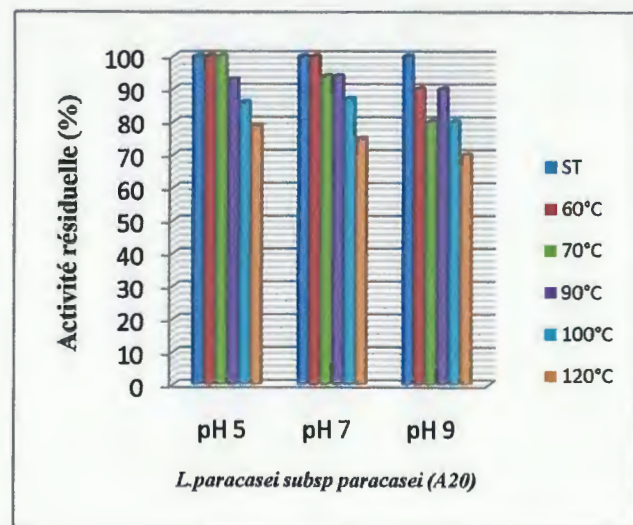


Tableau (13): L'effet de la température à différents pH sur l'activité antimicrobienne des SNCT des souches des *Lactobacillus* sur *Bacillus cereus*.

pH	5					7					9				
	60	70	90	100	120	60	70	90	100	120	60	70	90	100	120
<i>Lactobacillus</i>															
<i>L. paracasei</i> sp <i>paracasei</i> (A20)	100	100	93	86	79	100	94	94	87	75	90	80	90	80	70
<i>L. acidophilus</i> (I2)	100	94	100	94	75	93	100	93	93	73	90	81	73	73	64
<i>L. gasseri</i> (D8)	90	100	100	92	86	92	100	100	nd	85	90	nd	80	80	nd

-nd : non déterminé.

-Les chiffres représentent l'activité résiduelle des SNCT (%).



ST : surnageant non traité par la chaleur (Témoin).

Figure (11) : L'activité résiduelle des SNCT soumis à différentes température et à différents pH sur *Bacillus cereus*.

Les résultats retrouvés dans notre travail montrent que les SNTC sont stables à la chaleur à des pH 5, 7 et 9 avec une résistance variable selon les souches mais qui reste intéressante même à pH 9 et à 120°C.

Ces résultats montrent que le ou les substances présumées bactériocinogènes produites par nos souches sont des protéines stables à la chaleur. Des résultats similaires ont été rapportés par **Diop et al, (2007)**. Cela suggère que ces substances sont thermostables et par conséquent n'appartiennent pas à la classe III dont les bactériocines sont thermolabiles. Par contre celles des trois autres classes sont thermostables ceci laisse à supposer que nos substances bactériocinogènes appartiennent à la classe I ou IIa étant donné que toute les bactériocines de cette dernière classe inhibent *L. monocytogenes* et *B. cereus*.

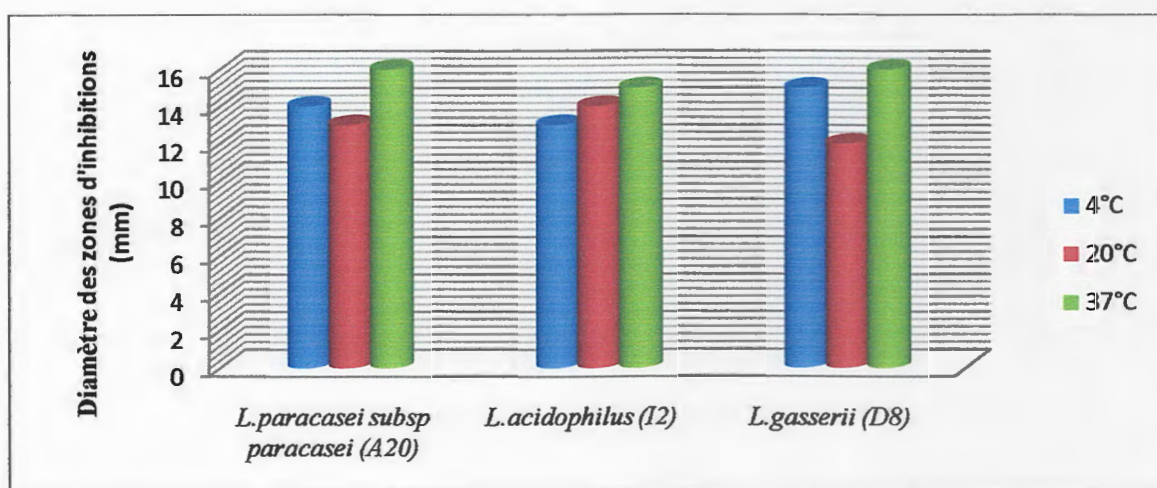
La stabilité à la chaleur des SNTC et aux variations du pH est importante si la bactériocine est utilisée comme conservateur alimentaire, parce que les procédures de préparation de nombreux aliments impliquent généralement un traitement thermique à un pH donné selon le type d'aliment.

#### I.4.4. Effet du stockage sur l'activité bactériocinogène des surnageants

Les résultats obtenus après stockage de 7 jours à différentes températures sont résumés dans les Tableaux (14 et 15).

**Tableau (14) :** Effet du stockage à différentes température sur l'activité antimicrobienne des SNTC testés sur *Listeria monocytogenes*.

<i>Lactobacillus</i> T°C	<i>L. paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> (A20)	<i>L. acidophilus</i> (I2)	<i>L. gasserii</i> (D8)
4°C	14 mm	13 mm	16 mm
20°C	13 mm	14 mm	15 mm
37°C	15 mm	12 mm	16 mm

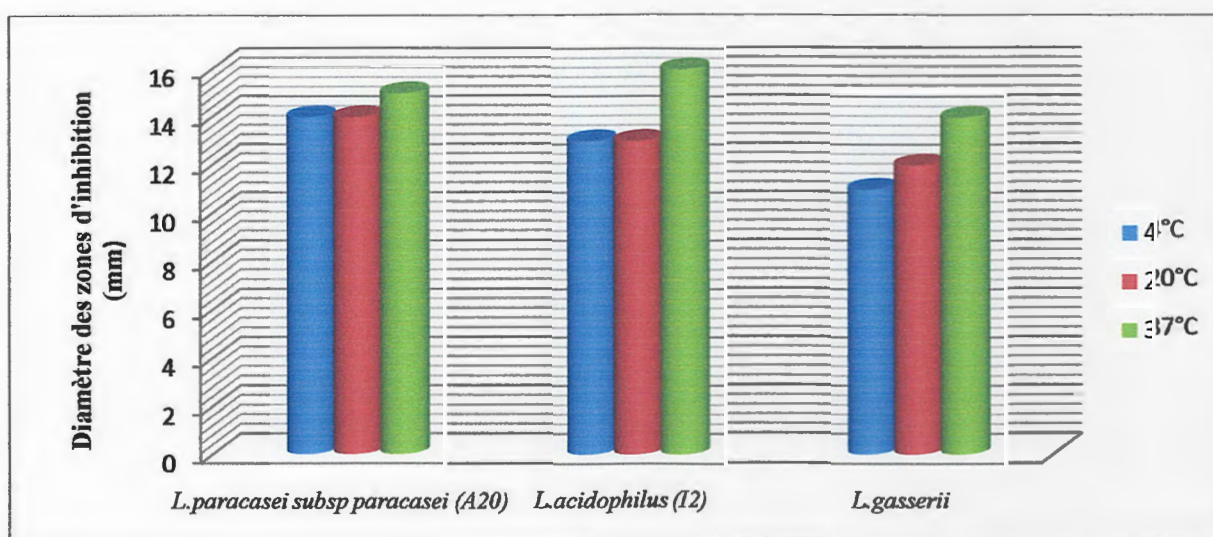


**Figure (12) :** Effet du stockage à différentes température sur l'activité antimicrobienne des SNTC testés sur *Listeria monocytogenes*.



**Tableau (15) :** Effet du stockage à différentes température sur l'activité antimicrobienne des SNTC testés sur *Bacillus cereus*

<i>Lactobacillus</i> T°C	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> (A20)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (I2)	<i>Lactobacillus gasserii</i> (D8)
4°C	14 mm	14 mm	15 mm
20°C	13 mm	13 mm	16 mm
37°C	11 mm	12 mm	14 mm



**Figure (13) :** Effet du stockage à différentes température sur l'activité antimicrobienne des SNTC testés sur *Bacillus cereus*.

Après 7 jours de stockage à 4°C, 20°C et 37°C, les surnageants testés contre les germes indicateurs ont conservés, majoritairement, leurs activités. Selon Galvez *et al.* La température de stockage peut réduire ou non l'activité des bactériocines (Dortu et Thonard, 2009). Il est important lors de la conservation des aliments que les bactériocines produites par souches protectrices ne perdent pas leur activité au cours de stockage.



**Conclusion**

Le but de ce travail est de tester le pouvoir bactériocinogène des souches de *Lactobacillus* isolées à partir de selles d'enfants contre deux contaminants alimentaires : un pathogène *Listeria monocytogenes* et un germe indésirable *Bacillus cereus*. L'activité bactériocinogène a été déterminée par la technique des puits sur milieu gélosé, la caractérisation du surnageant bactériocinogène a été testée vis-à-vis de la chaleur, du pH, les enzymes et par détermination de la concentration minimale inhibitrice.

Les tests visant à révéler le potentiel antagoniste des *Lactobacillus* et de leur surnageant respectif, suivi d'une caractérisation de l'agent inhibiteur supposé bactériocinogène, nous ont amené aux résultats suivants :

- Sur huit (8) souches testées, sept (7) ont manifestées un antagonisme vis-à-vis de *Listeria monocytogenes* et *Bacillus cereus*.
- Les résultats obtenus avec les surnageants neutralisés et traités par catalase ont conduit à trois souches : *L. acidophilus* (I2), *L. paracasei subsp paracasei* (A20) et *L. gasserii* (D8), ayant manifestées une activité sur les deux germes contaminants testés. Elles ont été sélectionnées pour la suite du travail.
- Le test de détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) montre que la plus grande dilution de la solution de bactériocine ayant montré une activité inhibitrice contre toutes les souches indicatrices est  $10^{-5}$  et de ce fait l'unité arbitraire de nos souches est de l'ordre de  $10^5$  UA/ml.
- La caractérisation des substances présumés comme bactériocines a montré que : ces substances sont de nature protéique ; leurs activités se manifestent le mieux, pour la majorité des souches de *Lactobacillus*, à pH 5 et 7. Elles sont thermostables et résistent à l'action combinée de la chaleur et au pH d'une manière variable, selon les souches, mais qui reste intéressante même à pH 9 à 120°C.
- les surnageants testés contre les germes indicateurs ont conservés, majoritairement, leurs activités après stockage de 7 jours.



Références bibliographiques

## Références bibliographiques

- Abriouel H., Maqueda M., Gálvez A., Martínez-Bueno M., and Valdivia E. (2002).** Inhibition of Bacterial Growth, Enterotoxin Production, and Spore Outgrowth in Strains of *Bacillus cereus* by Bacteriocin AS-48. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**(3) : pp 1473–1477.
- Ammor M. S. (2004).** Ecosystème microbien d'un atelier fermier de salaison : Identification et propriétés des bactéries lactiques. Thèse de Doctorat. Université de Rennes 1.France.
- Arokiyarny A. Sivakumar P.K. (2012).** Antibacterial Spectrum, and Mode of Action of Bacteriocin produced by *Lactobacillus* sp., isolated from Traditional Dairy products. *International Journal of PharmTech Research*. **4**(1): pp 315-320.
- Baliarda A. (2003).** Evaluation de la réponse au stress chez les bactéries lactiques appartenant aux genres *Pediococcus* et *Tetragenococcus* approches physiologiques et génétiques. Thèse de Doctorat. Université de Bordeaux 1.France.
- Banerjee S.P., Dora K.C., et Chowdhury S. (2011).** Detection, partial purification and characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus brevis* FPTLB3 isolated from freshwater fish. *J Food Sci Technol*. pp 0240-4.
- Belleflamme C., Di Tanna S, .Sindic M. (2006).** Le risque *Listeria monocytogenes* pour la transformation laitière fermière. Filière Ovine et Caprine n°18.
- Celestine S., Kok-Khiang P., Rajeev B and Min-Tze L. (2011).** Probiotic properties of bifidobacteria and lactobacilli isolated from local dairy products. *Ann Microbiol*. pp 0349-8.
- Dacosta Y. (2000).** La bio-protection des aliments. Edition. Edit du Yves Dacosta. Paris. pp 14-23.
- Diop M.B. (2008).** Sélection et caractérisation de souches bactériennes aptes a améliorer la technique de conservation des poissons par salaison au Sénégal. Thèse de Doctorat. Université de Gembloux. Belgique.
- Diop M.B., Dubois D.R., Tine E., Ngom A., Destain J. and Thonart P. (2007).** Bacteriocin Producers from traditional food products. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*. **11** (4), 275-281.
- Dortu C. (2008).** Isolement d'une bactérie lactique produisant de la sakacin G et utilisation sur des matrices alimentaires. Thèse de Doctorat. Université de Gembloux. Belgique.
- Dortu F., Thonart P., (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*. **13**(1), 143-154.
- Elmoualdi L., Labioui H., Boushama L., Bezbekour A., Oussine M et El yachioui M. (2008).** Activité bactéricide d'une souche de *Lactococcus lactis subsp.cremoris*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **147**, 7-18.



**Euzéby J.P. (2003).** Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire.

<http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/bb/cereus.html>

**Federighi M. (2005).** Bactériologie alimentaire. 2<sup>ème</sup> Edition. Edit de l'ECONOMICA. Paris. pp 101,230.

**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.

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

**Larpent J.Y et Larpent G. M. (1997).** Memento technique microbiologiques .3<sup>ème</sup> Edition. Edit du Toc et Doc, Lavoisier, Paris. pp 549-550.

**Leveau J.Y et Bouix M. (1993).** Les microorganismes d'intérêt industriel in « *Microbiologie industriel* ». Édition TEC et DOC. Lavoisiers, Paris. pp 459-474.

**Makhloufi K. M. (2012).** Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Thèse de Doctorat. Université de Pierre et Marie Curie. France.

**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).** Divergine 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).** Characterisation of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F<sub>1</sub> and *Lactobacillus brevis* OG1. Afr J Biotechnol. **2(8):** 219-277.

**Penaud S. (2006).** Analyse de la séquence génomique et Etude de l'adaptation à l'acidité de *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ATCC11842. Thèse de Doctorat. Institut National Agronomique De Paris-Agronomie. France.

**Privat K., Thonart P. (2011).** Action des cultures protectrices : cas des germes lactiques sur la flore alimentaire indésirable. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. **15(2),** 339-348.

**Rajaram G., Manivasagan P., Thilagavathi B., Saravanakumar A. (2010).** Purification and Characterization of a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus lactis* Isolated from Marine Environment. Advance Journal of Food Science and Technology **2(2):** 138-144.

**Rapport final ADIV/OFIVAL. (2004).** Altérations microbiennes liées aux bactéries lactiques hétérofermentaires dans le jambon cuit supérieur. France.

**Rossel C. (2003).** *Listeria monocytogenes* en abattage et découpe de porc : Contrôle de la contamination environnementale des frigos de ressuage et salles de découpe. Thèse de Doctorat. Université de Paul-Sabatier de Toulouse. France.

**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 Limoges. 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. *J. Food sci. Technol.* 2(5): pp 209-297.

**Smaoui S. (2010).** Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse. France.

**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.

**Sutra L., Federighi M., Jouve j .L. (1998).** Manuel de bacteriologie alimentaire. Edit du Polytechnica. Paris. pp 134, 136, 146, 163, 164, 165, 166, 236, 237.

**Tailliez P. (2004).** Les35-41. Lactobacilles : propriétés, habitats, rôle physiologique et intérêt en santé humaine in « *Antibiotique* ». Masson, Paris, 6, pp 35-41.

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

**Tiwari S.K et Srivastava S. (2008).** Characterization of a Bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* Strain LR/14. *Food Biotechnology.* 22:247–261

**Todorov S.D et Dicks L.M.T. (2005).** Effect of Growth Medium on Bacteriocin Production by *Lactobacillus plantarum* ST194BZ, a Strain Isolated from Boza. *Food Technol. Biotechnol.* 43 (2) 165–173.

**Tortura G.J., Funcke B.R et Case C.L. (2003).** Les maladies infectieuses du système nerveux in « *Introduction à la microbiologie* ». Edit du Renouveau Pédagogique. Québec. pp 662-687.

**Yang R., Monty C.J and Ray B. (1992).** Novel method to extract large amounts of bacteriocin from lactic acid bacteria. *Applied and environmental microbiology.* 58(10):3355-3359.



Annexe

## Annexe I

### Milieux d'identification :

#### -MSR (Man, Rogosa et Sharp ) (bouillon et gélose)

- Peptone.....10g
- Extrait de viande.....8g
- Extrait de levure.....4g
- Acétate de sodium.....5g
- Phosphate dipotassique.....2g
- Citrate d'ammonium.....2g
- Sulfate de magnésium.....2g
- Sulfate de manganèse.....0.05g
- Glucose.....20g
- Tween 80.....1 ml
- Agar (dans le cas de gélose).....15g
- Cystéine.....1..g
- Eau distillée qsp.....1000 ml

PH=6.2

#### -Gélose Mueller Hinton

- Infusion de viande de bœuf.....30 ml
- Peptone de caséine.....17 ,5g
- 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.....10 g
- Agar.....10 g

PH=7,5

#### -Bouillon nutritif

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

PH=7,2

**- Gélose M17**

- Tryptone..... 2,50 g
- Peptone pepsique de viande .....2,50 g
- Peptone papaïnique de soja .....5,00 g
- Extrait autolytique de levure.....2,50 g
- Extrait de viande .....5,00 g
- Lactose .....5,00 g
- Glycérophosphate de sodium .....19,00 g
- Sulfate de magnésium .....0,2 g
- Acide ascorbique .....0,50 g
- Agar bactériologique.....15,00 g
- Eau distillée.....1000 ml

pH =7,1 ± 0,2.

**Annex II**

**Tableau (15) :** Effet de la température à différents pH sur l'activité antimicrobienne des SNTC des souches des *Lactobacillus* sur *Listeria monocytogenes*.

pH	5					7					9					
	T°C	60	70	90	100	120	60	70	90	100	120	60	70	90	100	120
<i>Lactobacillus</i>																
<i>L. paracasei</i> <i>sp paracasei</i> (A20)		22	21	20	22	nd	24	22	21	17	15	8	8	9	9	nd
<i>L. acidophilus</i> (I2)		25	25	24	nd	17	20	18	18	14	13	10	9	8	9	7
<i>L. gasserii</i> (D8)		23	21	22	nd	13	20	20	18	17	10	9	9	9	nd	8

nd: non déterminé.

Les zones d'inhibition en mm.

**Tableau (16):** L'effet de la température à différents pH sur l'activité antimicrobienne des SNCT des souches des *Lactobacillus* sur *Bacillus cereus*.

pH	5					7					9					
	T°C	60	70	90	100	120	60	70	90	100	120	60	70	90	100	120
<i>Lactobacillus</i>																
<i>L. paracasei</i> <i>sp paracasei</i> (A20)		15	16	13	12	11	16	15	15	14	12	9	8	9	8	7
<i>L. acidophilus</i> (I2)		16	15	16	15	12	14	10	17	17	11	10	9	8	8	7
<i>L. gasserii</i> (D8)		14	14	15	13	12	12	16	16	nd	11	9	nd	8	8	nd

nd: non déterminé.

Les zones d'inhibition en mm.



<b>Membre de Jury:</b> <b>Président: Dr. Boudjerda J.</b> <b>Examinatrice : Dr. Laggoune S.</b> <b>Encadreure : Mme. Bahri F.</b>	<b>Réalisé par :</b> <b>Aissous Nedjma</b> <b>Zazoua Hasna</b>
--	--

### Thème

Pouvoir bactériocinogène des *Lactobacillus* contre deux contaminants alimentaires  
*Listeria monocytogenes* et *Bacillus cereus*

### Résumé

Le but de ce travail est de tester le potentiel bactériocinogène de souches de *Lactobacillus* isolées à partir de selles d'enfants contre deux contaminants alimentaires : un pathogène *Listeria monocytogenes* et un germe indésirable *Bacillus cereus*. Les tests visant à révéler le potentiel antagoniste des *Lactobacillus* et de leurs surnageants neutralisés et traités à la catalase, nous ont amené à trois souches ayant manifestées une activité sur les deux germes contaminants testés, il s'agit de : *L. acidophilus* (I2), *L. paracasei subsp paracasei* (A20) et *L. gasserii* (D8). La caractérisation des substances supposées bactériocinogènes a déterminé qu'elles sont de nature protéique ; que leurs activités se manifestent le mieux, à pH 5 et 7, elles sont thermostables et qu'elles résistent à l'action combinée de la chaleur et le pH d'une manière variable, selon les souches, mais qui reste intéressante même à pH 9, à 120°C.

Les surnageants testés contre les germes indicateurs ont conservés, majoritairement, leurs activités après stockage de 7 jours.

**Mots clés :** *Lactobacillus*, Bactériocines, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*.

### Abstract

The purpose of this study was to test the bacteriocin potential of *Lactobacillus* strains isolated from stool of children against two food contaminants: a pathogen *Listeria monocytogenes* and undesired germs *Bacillus cereus*. Tests to reveal the antagonistic potential of *Lactobacillus* and their supernatants neutralized and treated with catalase, led us to three strains who manifested an activity on both contaminating germs tested, these are: *L. acidophilus* (I2), *L. paracasei subsp paracasei* (A20) and *L. gasserii* (D8). The characterization of substances supposed bacteriocinogenic determined that they are protein in nature, that their activities are manifested best at pH 5 and 7, they are heat stable and they resistant to the combined action of heat and pH in a variable manner, depending on the strain, but still interesting, even at pH 9 at 120°C.

The supernatants tested against the indicator organisms have retained, mainly, their activities after storage for 7 days.

**Key words:** *Lactobacillus*, Bacteriocins, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*.

### ملخص

الهدف من هذه الدراسة اختبار القدرة البكتريوسينية لسلاسلات *Lactobacillus* المعزولة من براز الأطفال ضد اثنين من الملوثة الغذائية : الأولى ممرضة *Listeria monocytogenes* والثانية غير مرغوب فيها *Bacillus cereus*. الاختبارات التي تعكس القدرة العدائية لسلاسلات *Lactobacillus* وكذا مطولها الطافي المعدل والمعالج بإنزيم الكاتلاز , أدت إلى ظهور ثلاث سلالات ذات نشاط بكتريوسيني ضد الملوثة المختبرة :

*L. acidophilus* (I2), *L. paracasei subsp paracasei* (A20), *L. gasserii* (D8)

خصائص المواد المحتملة أنها ذات قدرة بكتريوسينية كانت ذات طبيعة بروتينية ; والتي يتجلى أفضل نشاط لها في درجة حموضة 5 و 7 ; مقاومة للحرارة وتقاوم العامل المشترك للحرارة والحموضة على نحو متغير , حسب السلالات ولكن تبقى مثيرة للاهتمام حتى عند درجة الحموضة 9 و 120 درجة مئوية .

وقد أحتفظ المحلول الطافي المختبر بقدرته البكتريوسينية بعد التخزين لمدة 7 أيام .

الكلمات المفتاحية : *Lactobacillus* , بكتريوسين , *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* .