

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIRUR  
ET DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

CENTRE UNIVERSITAIRE DE JIJEL

المركز الجامعي جيجل

INSTITUT DES SCIENCES DE LA NATURE

معهد علوم الطبيعة

## Mémoire

01/03

De Fin d'Etude en vue de l'obtention du diplôme  
D'étude supérieure en biologie moléculaire et cellulaire

Option : MICROBIOLOGIE

## Thème

*Contribution à l'étude de la production  
des bactériocines par quelques souches de  
bactéries lactiques isolées des yaourts.*

Jury composé de :

M <sup>m</sup> ROULA S.	Président
M <sup>r</sup> HAMAMES N.	Encadreur
M <sup>m</sup> BAHRI F.	Examineur

Présenté par :

HAINÉ Warda
RECHAK Lydia

Promotion 2000-2001

N° d'ordre.....

# Sommaire

Remerciement  
Dédicaces  
Abréviations

Introduction .....	1
<b>Partie Bibliographique</b>	
I-Les bactéries lactiques .....	2
I-1-Généralités.....	2
I-2-Classification.....	2
I-3-Exigences nutritionnelles.....	5
I-4-Symbiose et antibiose.....	8
II-Bactériocines.....	10
II-1-Définition et origine du terme.....	10
II-2-Caractéristiques.....	10
II-3-Différence entre bactériocines et antibiotiques.....	10
II-4-Différence entre bactériocines et bactériophage.....	11
II-5-Classification des bactériocines.....	11
III-Production de bactériocines.....	14
III-1-Quelques facteurs affectant la production de bactériocines.....	15
III-2-Déterminant génétique des bactériocines.....	17
III-3-Conséquence de la production d'une bactériocine pour la bactérie productrice.....	18
III-4-Purification des bactériocines.....	19
IV-Spectre et mode d'action.....	23
IV-1-Spectre d'activité.....	23
IV-2-Mode d'action.....	24
V-Les bactériocines produites par les bactéries lactiques.....	24
VI-Applications des bactériocines.....	30
VI-1-Applications de la nisine.....	30
VI-2-Possibilité d'utilisation dans les produits laitiers.....	31
VI-3-Dans les produits carnés.....	32
VI-4-Dans les produits de la 4 <sup>ème</sup> gamme.....	33
VI-5-Dans le domaine thérapeutique.....	34

## Partie Pratique

I-Matériels .....	35
II-Méthodes .....	35
II-1-Echantillonnage et technique de prélèvement .....	35
II-2-Méthodologie d'isolement .....	35
II-3-Milieux de cultures .....	38
II-4-Techniques d'isolement, d'enrichissement, de purification et de Conservation .....	38
II-5-Les micro-organismes .....	38
II-6-Mise en évidence de l'activité antibactérienne .....	39
II-7-Méthode des puits .....	40
II-8-Méthode des disques .....	41
Résultats et discussion .....	42
Conclusion .....	49
Références bibliographiques .....	50
Annexes	

# Remerciement

↳ Nous remercions dieu qui nous a donné la volonté d'étudier et qui nous a aidés à élaborer cet humble travail.

Nos plus vifs remerciements s'adressent :

↳ A Monsieur HAMAMES Nour-Eddine notre encadreur pour son aide et ses précieux conseils.

↳ A Monsieur KACEM C. de l'université de Constantine pour nous avoir fournis les germes cibles.

↳ Aux techniciens de laboratoire de l'institut de biologie YAHIA, RACHID et SONIA pour leur collaboration.

↳ A TOUFIK le responsable de la salle d'Internet pour son aide.

↳ A Monsieur LOUNIS.M de laboratoire d'hygiène pour son aide précieuse.

↳ A tous les membres de jury qui ont accepté de juger ce travail.

↳ A Monsieur ANANI.F qui nous a beaucoup aidé.

↳ A toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

*Lydia et Warda*

# *Dédicace*

Je dédie ce mémoire :

☞ A mes très chers parents, qui m'ont donné tous leur amour et soutien.

☞ A mon cher frère Messaoud.

☞ A mes très chères sœurs : Ibtissem, Ilham, Ikram, Nadjah, Zohra et Sabrina.

☞ A la pensée de ma chère H'BIBA qui nous a quittés et qui restera dans mon cœur à jamais.

☞ A mes neveux et nièces : Rawda, Mouloud, Taher, Didou, Touta et Sofia.

☞ A tout (e) mes oncles et tantes ainsi que cousins et cousines.

☞ A mes âmes sœurs Hanane et Ibtissem que j'aime très fort et qu'ensemble on a fait un trio magnifique.

☞ A mon amie Lydia avec qui j'ai partagé ce travail.

☞ A tous mes amis : Hamida, Amel, Farida, Bachir et Adel.

☞ A tous les étudiants de la 1<sup>ère</sup> promotion microbiologie et biochimie.

*Warda*

# *Dédicace*

Je dédie ce modeste travail :

☞ A mes très-chers parents : ma mère FARIDA, mon père AMMAR qui m'ont donné tout leur amour et soutien.

☞ A ma sœur unique : AMEL.

☞ A mes frères : RAFIK, RIAD, RACHID et sa femme SAMIRA.

☞ A mon petit bout de chou, mon neveu WALID.

☞ A tout(e) mes oncles et tantes.

☞ A mes cousins : ROCHDI, NINO, KARIM, AMIR, SAMY, YANIS et DJAMEL.

☞ A mes cousines : RYM et MICHMICHE.

☞ A mon amie WARDA, ma compagnante dans ce travail et avec qui j'ai tant partagé.

☞ A mes amis : KARIMA d'Alger et HAYAT, HANANE, IBTISSEM, FADIA, AIDA, MUSTAPHA et BACHIR.

☞ A tous les étudiants de la 1<sup>ère</sup> promotion microbiologie et biochimie.

*Lydia*

## Les abréviations

A.T.P: adénosine tri phosphate

Bac<sup>+</sup> : Bactérie productrice de bactériocine

B.H.I : Brain Heart Infusion

B.G.T : Bouillon Glucosé Tamponné

Da : Dalton

KDa :Kilo Dalton

E.N.S.A.I.A : Ecole nationale supérieure d'Agronomie et des industries alimentaires

ml : millilitre

M.R.S : Man, Rogosa and Sharpe

mm : millimètre

mn : minute

sp : espèce

Sub sp : sub espèce

U.A : unité arbitraire

U.I : unité internationale

Kpb : kilo paire de bases

Pb : paire de bases .

Pm : poids moléculaires

### Abréviations des souches :

E.coli : Escherichia coli

Lb. : Lactobacillus

Lc. : Lactococcus

L. : Leuconostoc

St. : Staphylococcus

S. : Streptococcus

**Les produits de la quatrième gamme :** ce sont les produits frais, crus, épluchés, lavés, prédécoupés en sachets dans un emballage souple (braquette, sachet...) bref, prêts pour un emploi immédiat (LARPENT, 1997).

## Introduction

L'aptitude des bactéries lactiques à se développer à pH relativement acide et à produire simultanément des substances active (acide lactique, eau oxygénée, bactériocines et antibiotiques...) leur confère un rôle bactériostatique ou bactéricide vis-à-vis d'espèce visibles, responsables de défauts sensoriels (Pseudomonas, Achromobacter, Flavobacterium...) ou présentant des risques pour la santé publique (Salmonella, Clostridium, Staphylococcus...) (DEROISSART, 1986).

Pour mieux préserver les qualités organoléptique des aliments (texture, goût, couleur...), un problème se pose : « comment assurer l'innocuité de ces aliments sans utilisés des traitements thermiques ou additionnés des agents chimiques ? ».

Une des réponses pourrait être de mettre à profit les antagonismes existant entre des micro-organismes «utiles» et des micro-organismes «nuisibles».

Une des voies possibles est l'utilisation des bacteriocines contrairement aux antibiotiques proprement dits, ces substances protéiques, généralement de faible poids moléculaire, ont une action bactéricide contre des espèces proches de celles qui les produisent (LARPENT, 1996).

L'incorporation d'antibiotiques est de souches bactériennes productrices d'antibiotiques ayant un spectre d'action plus large n'est pas souhaitable dans les aliments. En effet, elle pourrait favoriser l'apparition de souches résistantes.

Selon PILET et al. (1998) la nature protéique des bactériocines permettant leur destruction rapide dans l'estomac ou l'intestin, élimine ce risque.

Plusieurs bactériocines notamment la Nisine sont utilisées dans l'industrie laitière pour éliminer les bactéries indésirables comme Clostridium tyrobutyricum responsable du gonflement et de l'altération de la saveur des fromages à pâte pressée non cuite et à pâte cuite (PILET et al., 1998).

L'objectif de notre travail est d'étudié la possibilité de la production de bactériocines par quelques souches de bactéries lactiques utilisées dans la fabrication de yaourt commercial.

Deux méthodes sont utiliser :

- Méthode des puits.
- Méthode des disques.



## I-Les bactéries lactiques :

### I-1-Généralités :

Les bactéries lactiques sont des cocci ou des bâtonnets Gram(+), nitrate réductase (-), catalase(-), cytochrome oxydase(-), en général aéro-tolérantes, mais certaines espèces vivant dans le tube digestif des animaux sont anaérobies strictes (LARPENT, 1996). Elles fermentent les glucides dans le but d'obtenir de l'énergie selon deux voies :

- Homofermentaire produisant de l'acide lactique comme produit terminal.
- Hétérofermentaire produisant en plus de l'acide lactique : de l'éthanol, de l'acétate et du CO<sub>2</sub>. La différence entre ces deux voies est détectable par le dégagement du CO<sub>2</sub>.

Ces bactéries tolèrent des pH acides (inférieurs à 7) et produisent de l'acide lactique, ces deux caractéristiques sont utilisées dans la conservation des aliments : produits carnés, produits végétaux fermentés et produits laitiers, ce qui n'est pas le cas pour beaucoup d'autres bactéries qui pourront être des agents d'altérations diverses (putrification, pourriture, rancissement ... etc.) (LARPENT, 1996). D'autre part les bactéries lactiques pourront créer des difficultés pour d'autres industries, entraînant un surissement des produits : jus de fruits, vin, viandes ... etc. (LARPENT, 1996).

### I-2-Classification :

#### I-2-1-Coccis :

Sont de forme sphérique ou ovoïde, se groupant en tétrades ou en chaînettes, généralement immobiles, exigeants dans leurs besoins nutritionnels (LARPENT, 1996).

#### a) Streptococcus :

Cité par (LECLERC, 1995), ce sont des bactéries homofermentaires, fermentant les glucides en acide lactique (D), anciennement classé selon quelques caractères et antigènes décrits par LANCEFIELD, (1993). Ce genre compte la majorité des streptocoques, ayant un contenu en GC de 35% à 46%, divisé en quatre groupes :

- Le groupe Pyogenes qui compte 5 espèces, hémolytiques ( $\alpha$  ou  $\beta$ ) et réagissant avec les protéines sériques.
- Le groupe Oralis compte les espèces S.mitior, S.viridans, S.intermedius.
- Le groupe Mutans qui a un rôle primordial dans la formation de la plaque dentaire compte six espèces.

- Le groupe contenant les autres streptocoques, compte S. salivarius subsp salivarius apparentée à S. salivarius subsp. thermophilus (LARPENT, 1996).

#### **b) Lactococcus :**

Ces bactéries peuvent avoir un pouvoir hémolytique qui permet de les classer dans des groupes sérologiques. Notant que le groupe des streptocoques lactiques compte des streptocoques non hémolytiques. Traditionnellement ce genre regroupait deux espèces : S. lactis et S. cremoris, distinguant la sous espèce : S. lactis subsp. diacetylactis capable de produire du diacétyle à partir du citrate.

Récemment SCHLEIFER et al. (1985) cité par NOVEL. (1992) ont proposé de classé dans ce genre les anciennes espèces de S. lactis et les trois sous espèces de S. raffinolactis et deux autres espèces : S. plantarum et S. garviae.

Chez ces bactéries la présence ou pas des plasmides varie selon les groupes, donnant des caractéristiques en plus que celles déterminées par le chromosome telles que : la protéolyse, le métabolisme du saccharose et la production des bactériocines (nisine, diplococcine), mais aussi portant des gènes qui procurent la résistance à certains bactériophages, ils peuvent être nombreux (1à14) chez les streptocoques mésophiles ou réduit (1à2) chez S. thermophilus (LARPENT, 1996).

#### **C) Leuconostoc :**

Sont des bactéries hétérofermentaires ayant un métabolisme du citrate variable, c'est à dire qu'en absence d'un stimulateur de croissance ces bactéries utilisent peu le citrate (LARPENT, 1996). Ils sont aérobies anaérobies facultatifs, exigeantes sur le plan nutritionnel, produisant en plus de l'acide lactique D(-), du CO<sub>2</sub> et de l'éthanol, avec un optimum de température autour de 25°C (LEVEAU et BOUIX, 1980).

Les Leuconostoc sont soit acidifiant (L. lactis) soit aromatisant (L. mesenteroïdes subsp cremoris) inhibant ainsi la contamination par des micro-organismes acidosensibles. Ils sont responsables soit de la fermentation panaire pour L. mesenteroïdes subsp mesenteroïdes avec Lb. plantarum soit de la fermentation malolactique du vin pour L. oenos (LARPENT, 1996).

#### **d) Pediococcus :**

Ce sont des micro-organismes microaérophiles, homofermentaires qui ont comme produit principal l'acide DL lactique (LARPENT, 1996). Ils sont saprophytes contaminant des produits végétaux et dégradant des produits de brasserie (GUIRAUD et GALZY, 1980). Pediococcus. acidi-lactici et

Pediococcus pentosacens sont utilisées dans l'industrie alimentaire (produits carnés fermentés). Notant que Tetragenococcus halophilus était anciennement appelée Pediococcus halophilus (LARPENT, 1996).

### **I-2-2-Bacilles :**

Ce sont des bactéries Gram (+), catalase (-), indole (-), H<sub>2</sub>S (-), nitrate(-), asporogènes, immobiles pour la majorité, aérotolérantes pour la plupart. De forme allant de cocci plus au moins allongés jusqu'à des formes longues. Ces bactéries se développent en milieu acide (pH 4,5 - 6,4) mais elles sont inhibées à pH 3,3 - 4,0, demandant ainsi des exigences nutritionnelles complexes surtout les vitamines, aussi une concentration en CO<sub>2</sub> de 5% à 10% stimule leur croissance (LARPENT, 1996).

#### **a) Carnobacterium :**

Le genre des Carnobacterium a été créé par COLLINS et al. (1987), isolés de viande de bœuf, de volailles emballées sous vide et stockés à basse température décrite comme des lactobacilles mobiles, ayant une teneur en GC de 33% à 37%, l'acide lactique est principalement de forme L(+) (NOVEL, 1992)

Leur croissance est possible à 0°C et 10°C, mais inhibée à 45°C ou en présence de Na Cl 8% ou en milieu à l'acétate (LARPENT, 1996).

#### **b) Lactobacillus :**

Ce sont des bâtonnets groupés généralement en chaînettes, demandant une forte exigence en facteurs de croissance, de 11 à 15 acides aminés pour Lc.delbrueckii, suivant les différentes souches, tolérant des pH acides (allant jusqu'à pH 3,5), et une teneur en GC% de 32% à 53% (NOVEL, 1992).

Les Lactobacillus sont groupés en trois grands groupes :

**Groupe I :** Homofermentaire obligatoire comprenant des espèces du groupe Thermobacterium homofermentaire et thermophile, mais aussi d'autres espèces décrites récemment. Ce groupe contient deux complexes d'espèces de Lb.delbrueckii et Lb.acidophilus. Les sous espèces de Lb.delbrueckii sont : Lb.delbrueckii subsp.delbrueckii, Lb.delbrueckii subsp bulgaricus, Lb.delbrueckii subsp.leichmanii et Lb.delbrueckii subsp.lactis ont un ADN homologue à plus de 80% (NOVEL,1992).

Les sous espèces de Lb. cidophilus est très hétérogène formé de 3 sous groupes caractérisés chacun par les espèces suivantes : Lb glasseri, Lb.helveticus et Lb. cidophilus (NOVEL, 1992).

**Groupe II :** Homofermentaire facultatif comprenant des espèces du groupe Streptobacterium homofermentaire et mésophile, et d'autres espèces, formé par trois complexes d'espèces (NOVEL, 1992).

- Le complexe Lb.casei avec ses trois géotypes montrant une homologie moyenne et constante.
- Le complexe Lb.sake, Lb.curvatus et Lb.bavaricus qui compte des espèces très voisines par leur génome.
- Le complexe Lb.plantarum comportant des souches à homologie variable (NOVEL, 1992).

**Groupe III :** Hétérofermentaire obligatoire, comprenant des espèces du groupe Betabacterium hétérofermentaire mésophiles ou thermophile. Ce groupe renferme des espèces différentes, présentant peu d'homologie entre elles malgré un GC% très voisin, les plus remarquables espèces sont Lb.buchneri, Lb.kefir et Lb.renteri mais aussi des espèces ayant la capacité de produire de l'hydrogène grâce à une enzyme : la formiate hydrogène lyase. Enfin un groupe se rapprochant de Leuconostoc renfermant les espèces : Lb.viridescens et Lb.confusus (NOVEL, 1992).

### c) Bifidobacterium :

Ce sont des bactéries Gram (+), bâtonnets courts, bifurqués, spatulés ou même cocoïdales, aérobies pour la plupart pouvant être aérotolérantes pour quelques espèces en présence du CO<sub>2</sub> tout en restant catalase (-) ou devenant catalase(+) (LARPENT, 1996).

Ce genre produit plus d'acide acétique que d'acide lactique, avec un rapport de 3/2, de l'éthanol mais pas de CO<sub>2</sub>, et compte 24 espèces pouvant présenter une homologie entre elles parfois importante (NOVEL, 1992).

Le Bifidobacterium est commensale de l'homme se localisant dans les intestins, la bouche, les bronches et le vagin avec une température optimale de 39°C, et chez les animaux se localisant dans les intestins et une température optimale de 43°C à 45°C. Il possède une enzyme caractéristique qui est : le fructose-6-phosphate phosphocétolase et une teneur en GC% de 57,2% à 64,5% (LARPENT, 1996).

### I-3-Exigences nutritionnelles :

Le lait n'est sûrement pas le milieu idéal pour la croissance des bactéries lactiques. (ACCOLAS et al., 1980). Ce sont des micro-organismes exigeants en nutriments, nécessitant ainsi pour leur croissance un sucre fermentescible, des

vitamines et des composés azotés. Par exemple l'addition d'extrait de levure stimule leur croissance, ceci s'explique par la présence dans cet extrait de peroxydase, d'acides aminés libres, de bases azotées et de peptides (DESMAZEAUD, 1983).

### I-3-1-Utilisation des glucides :

Le sucre fermentescible du lait est le lactose (disaccharide composé de glucose et galactose). Chez les bactéries lactiques du yaourt S. thermophilus et Lb. bulgaricus l'utilisation du sucre se fait selon la voie homofermentaire de la glycolyse, notant qu'il existe chez les autres espèces une fermentation autre que la précédente dite hétérofermentaire (ACCOLAS et al., 1980).

La première étape débute par l'hydrolyse du lactose en galactose et glucose qui seront ensuite converti en acide lactique. La quantité de ce dernier est variable : elle est plus grande chez les streptocoques thermophiles de 0,42 pour 100 chez les streptocoques mésophiles à 0,5 - 0,6 pour 100 chez les streptocoques mésophiles et pouvant atteindre 2,5 pour 100 chez Lb. helveticus. La plupart des bactéries lactiques utilisent le glucose plus rapidement que le galactose, alors que S. thermophilus ne peut même pas métaboliser le galactose ce qui explique la présence du sucre dans certains laits fermentés. De plus certaines souches de streptocoques peuvent être incapables de fermenter le lactose (DESMAZEAUD, 1983).

### I-3-2-Exigences en acides aminés :

La plupart des bactéries lactiques sont incapables d'effectuer la synthèse d'acides aminés à partir d'une source azotée, et donc ils leurs seront fournis par un apport exogène. Les besoins en acides aminés varient selon les genres et les espèces portant essentiellement sur l'histidine, la cysteine, la méthionine, la valine, l'acide glutamique, la leucine et le tryptophane chez les streptocoques thermophiles (DESMAZEAUD, 1983). Alors que chez les lactobacilles, surtout Lb. casei, Lb. acidophilus, Lb. sabivarus et Lb. bulgaricus ses exigences portent essentiellement sur l'arginine (LARPENT, 1996).

### I-3-3-Exigences vitaminiques :

D'après REITHER et ORAM. (1962), cité par DESMAZEAUD (1983), les streptocoques du groupe N exigent un certain nombre de plus particulièrement la niacine et l'acide pantothénique. Ce dernier qui se voit absolument exigé pour les streptocoques thermophiles, en plus de la riboflavine et à un moindre degré la thiamine, nicotinamide et la biotine. Les espèces du genre Lactobacillus ont

un besoin en pantothénate de calcium, en niacine et des exigences différentes pour les autres vitamines que sous résumant dans le tableau suivant :

**Tableau 1 : Exigences vitaminiques des lactobacilles  
(DESMAZEAUD, 1983)**

	<u>Lb.lactis</u>	<u>Lb.bulgari</u> <u>cus</u>	<u>Lb.helvit</u> <u>icus</u>	<u>Lb.acide</u> <u>phifus</u>	<u>Lb.casei</u>	<u>Lb.plantar</u> <u>um</u>	<u>Lb.brevis</u>
Calcium							
Pantothénate	++	++	++	++	++	++	++
Niacine	++	++	++	++	++	++	++
Riboflavine	++	++	++	++	++	±	-
Vitamine B12	±	±	-	±	-	-	-
Inosamine	-	-	-	-	-	-	++
Pyridoxal ou pyrodoxamine	-	-	++	-	+	-	-
Acide folique	-	-	-	++	++	-	++
Thymidine	-	-	-	-	-	-	nd

++ :vitamine exigée

+ : vitamine parfois exigée ou stimulante

± : vitamine exigée chez quelques souches seulement

- : vitamine non exigée

nd :exigence non déterminée

#### I-4-Symbiose et antibiose :

Il existe entre les souches de bactéries lactiques utilisées en industrie laitière des interactions positives regroupées sous le terme de coopération, là on parle de symbiose, et des interactions négatives ou inhibitions et dans ce cas on parle d'antibiose (JUILLARD et al., 1987).

##### I-4-1-Symbiose :

Elle se traduit par une stimulation de la croissance des souches ou par la production de métabolites particuliers (acide lactique, arômes) (JUILLARD et al., 1987). MOON et REINBOLD (1976) cité par (JUILLARD et al., 1987) ont montré qu'un mélange de souches pures de *Lb. bulgaricus* et *S. thermophilus* donnait un taux et une vitesse de croissance plus élevée que celles obtenus avec des souches cultivées seules.

ACCOLAS et al. en 1977 ont montré l'effet stimulant de *Lb. bulgaricus* sur *S. thermophilus* et vis-versa sur la quantité d'acide lactique produite, et que cette dernière augmentait lorsqu'il s'agissait de cultures mixtes comparées à celle produite par des souches cultivées seules. Le phénomène de coopération entre les souches de bactéries lactiques se répercute également sur la production de métabolites secondaires, dans ce cas c'est la production de composés d'arômes (JUILLARD et al., 1987).

##### I-4-2-Antibiose :

Les interactions négatives ou inhibitions peuvent avoir pour origine la production de composés toxiques (bactériocines, antibiotiques, compétition vis à vis du substrat ou le rejet de catabolites (JUILLARD et al., 1987).

- L'inhibition par le système "lactoperoxydase-thiocyanate-peroxyde d'hydrogène", qui met en jeu trois facteurs, dont deux d'entre eux sont présents de façon naturelle dans le lait, il s'agit de lactoperoxydase et le thiocyanate. Le premier se combine avec le peroxyde d'hydrogène pour oxyder le thiocyanate en un produit d'oxydation, et qui serait responsable des phénomènes d'inhibition de la croissance et de l'activité des bactéries lactiques. Le troisième facteur c'est le peroxyde d'hydrogène,  $H_2O_2$  qui provient du métabolisme des lactobacilles ou des streptocoques et peut être autoinhibiteur (JUILLARD et al., 1987).
- L'inhibition par rejet de produits du métabolisme cellulaire et dont la plus importante est l'inhibition de la croissance et de l'activité des bactéries lactiques par production de l'acide lactique (JUILLARD et al., 1987).

- L'inhibition par compétition vis-à-vis du substrat détecté par la disparition d'une souche lorsqu'on cultive dans un même milieu de culture plusieurs souches de bactéries lactiques (JUILLARD et al., 1987).
- L'inhibition par production de bactériocines qui inhibent la croissance et l'activité de différentes souches de bactéries lactiques et d'autres bactéries (Staphylocoques, Clostridies ...etc.) (JUILLARD et al., 1987).



## II-Bactériocines :

### II-1-Définition et origine du terme :

Le terme bactériocine a d'abord été utilisé pour les substances produites par les bactéries Gram (-) telles que les colicines produite par *E.coli*. Plus tard on a découvert d'autre antibiotiques élaborés par des bactéries de différents genres aussi bien Gram (+) que Gram (-) (JACOB et al., 1953).

Les bactériocines sont des protéines ou complexes protéiques biologiquement actifs, inhibiteurs de bactéries Gram (+) exclusivement et plus particulièrement de bactérie taxonomiquement proche de la souche productrice (MATHOT et al., 1996). Toutes ces substances sont conditionnées par leur adsorption préalable sur des récepteurs spécifiques présents sur la paroi des bactéries sensibles (JACOB al., 1953).

### II-2-Caractéristiques :

Les bactériocines se caractérisent par :

- Un spectre d'action limité à des espèces proche de l'espèce productrice.
- Une nature protéique, responsable de leur activité.
- Un mode d'action bactéricide.
- La présence d'un récepteur spécifique sur les cellules cibles.
- Un support plasmidique pour l'information génétique nécessaire à la production de l'inhibiteur et a celle des molécules responsables de l'immunité de cellule productrice (TAGG et al., 1976).
- Elles sont thermoresistantes.
- Elles sont dégradées partiellement par certains enzymes protéolytiques (SEROT et al., 1996).

Cependant dans le cas de composés inhibiteurs produits par les bactéries Gram (+) notamment les lactobacilles et les streptocoques de groupe N, toutes ces conditions ne sont pas remplies. Dans cette situation, on peut reprendre la démarche de TAGG et al., (1976) qui appellent «bactériocines» les molécules satisfaisant aux critères 2 et 3 (nature protéique et action bactéricide).

### II-3-Différence entre bactériocines et antibiotiques :

Les bactériocines diffèrent des antibiotiques par leur nature protéiques dont la séquence en acides aminés est codée par des gènes et dont la biosynthèse se fait au niveau des ribosomes par contre les antibiotiques ont une nature polypeptidique qui présentent une synthèse non ribosomique comme la

baïcitracine qui est synthétisée grâce à un système multienzymatique, de plus les bactériocines ne sont pas des métabolites secondaires comme la plupart des antibiotiques, c'est le cas de la nisine dont la synthèse se fait pendant la phase de la croissance de la bactérie (REKHIF, 1990).

#### II-4-Différence entre l'action des bactériocines et celle des bactériophages :

La principale différence entre l'action des bactériophages et celle des bactériocines : est que les premiers se comportent comme des virus qui sont infectieux pour les bactéries sensibles et que celles-ci les répliquent à un grand nombre d'exemplaires que la lyse va libérer. Par contre les bactériocines mises en présence des bactéries sensibles les tuent sans les lysér et sans déterminer de la part de celles-ci le moindre phénomène de réplication, excepté les mégacines qui lysent les bactéries sensibles, sans pour autant se multiplier (JACOB et al., 1953).

#### II-5-Classification des bactériocines :

##### II-5-1-Les lantibiotiques :

Le nom de lantibiotique est donné à de petits peptides contenant des ponts soufres intrachânes. Ils sont synthétisés par plusieurs genres bactériens Gram (+) (MATHOT et al., 1996). Dans le cas des bactéries lactiques, le plus connu des inhibiteurs de ce type est la nisine. Sa production par *S.lactis* est mise en évidence par MATTICK et HIRSCH en 1944 cité par SEROT et al., 1990. Cette substance a un spectre d'activité étendue et est employée comme conservateur dans les industries agro-alimentaire. D'autre lantibiotique, non apparenté à la nisine sont également produit par différentes souches de bactéries lactiques comme la lacticine 481 produite par *Lc.lactis* et la carnocine U 149 produite par *Carnobacterium piscicola* U 149. La synthèse de ces inhibiteurs s'effectue par voie ribosomale, sous forme d'un peptide qui subit des modifications post-traductionnelle (MATHOT et al., 1996). HIRSCH en 1951 à étudier la synthèse de la nisine par *S.lactis*, il a montré que sa synthèse se déroule en 2 étapes, il y' aurait synthèse d'une protéine : la "prénisine" et ce précurseur serait converti en «nisine» au niveau de la membrane. Le polypeptide formé a un poids moléculaire de 3500 Da mais ne serait active que sous forme de dimère (JUILLARD et al., 1987). La structure de la nisine est représentée dans la Figure 1.

Les lantibiotiques sont thermoresistants et sensibles aux enzymes protéolytiques leur spectre d'action est en général assez large. La nisine est inhibitrice pour la majorité des bactéries Gram (+), pour les autres lantibiotiques, peu de souches ont été testées (MATHOT et al., 1996).

#### **II-5-2-Peptide de faible poids moléculaire (non antibiotiques) :**

La majorité des bactériocines de bactéries lactiques est constituée de peptide de faible poids moléculaire (<15KDa). Comme les lantibiotiques, ces bactériocines sont issus d'un précurseur synthétisé au niveau ribosomale. Parmi les bactériocines de cette classe : la pediocine qui a un spectre d'action relativement large comprenant certaines espèces de bactéries lactiques, Streptococcus, Bacillus, Listeria, Clostridium ...etc. Les autres bactériocines sont les lactococcines A et B, celles-ci sont produites par des souches de Lc.lactis subsp. Lactis ou Lc.cremoris. Ces bactériocines sont hydrophobes, ne contiennent pas d'acides aminés inhabituels, sont également thermorésistantes et sensibles à diverses protéases (MATHOT et al., 1996).



### **II-5-3-Peptide de haut poids moléculaire :**

Ces peptides d'un poids moléculaire supérieur à 30 KDa se caractérisent par leur faible thermoresistance. Ils sont en effet détruits par un chauffage de 10 à 15 mn à 60°C. ils sont produit principalement par des souches de lactobacilles homofermentaire comme l'acidophilucine A de Lb.acidophilus L ATP 1060. Ce sont des molécules complexes formant des agrégats d'un poids moléculaire supérieur à 300 KDa. La majorité des peptides de faible poids moléculaire ayant tendance à former des agrégats plus au moins aisés à dissocier, certains auteurs estiment qu'il peut être difficile de classer avant purification complète, les bactériocines dans l'une ou l'autre de ces deux classes. Seule l'helvéticine J a été séquencée (MATHOT et al., 1996).

Le spectre d'action de ce type de bactériocines est limité aux souches taxonomiquement proches. Il existe très peu d'informations sur le mode d'action et les propriétés biochimiques de ces bactériocines à cause de leur taille et de leur caractère thermolabile, les changements de conformation et leur structure secondaire pourrait être importante pour leur activité (MATHOT et al., 1996).

### **II-5-4-Complexes lipo-ou glyco-protéiques :**

Certaines bactériocines de bactéries lactiques sont inactivées à la fois par les protéases et par d'autres types d'enzymes : lipases, phospholipases, amylases, ce qui suppose l'existence d'une partie non protéique active dans les phénomènes d'inhibition. Des souches de lactobacilles et de Leuconostoc produisent des bactériocines de ce type. C'est probablement le cas également pour des souches de Lactococcus la structure de ces molécules est peu connue et le rôle des parties lipidiques ou glucidiques n'est pas précisé. Elles pourraient jouer un rôle déterminant dans ces molécules complexes qui présentent une affinité pour les membranes cytoplasmiques (MATHOT et al.,1996).

### **III-Production des bactériocines :**

Les techniques pour mettre en évidence la propriété bactériocinogène de bactéries lactiques sont nombreuses et semble être simple. Néanmoins, soulignons que plusieurs facteurs, même mal connus peuvent affecter la production des bactériocines. Il est donc important de savoir l'impact de quelques facteurs principaux sur la culture des bactéries potentiellement productrices de bactériocines. (MATHOT et al.,1996).

### III-1-Quelques facteurs affectant la production des bactériocines :

Avec un bon nombre d'exemples impliqués dans la production significative des bactériocines par les micro-organismes Gram(+). TAGG et al. (1976) ont constaté combien il est important le choix du milieu de culture, les conditions d'incubation et l'induction.

#### III-1-1-La composition du milieu de culture :

TAGG et al. (1976) ont montré que l'augmentation de viscosité du milieu liquide par addition d'agar, de dextrane, de glycérol ou d'amidon, a élevé la production des bactériocines synthétisées par les streptocoques isolés de la cavité buccale de l'homme et des rongeurs.

La production de staphylococcine 1580 est 20 fois plus élevée dans un milieu semi-solide que dans un milieu à l'état liquide.

La biosynthèse de bactériocines par *Corynebacterium* et par staphylocoque dépend des acides aminés contenus dans le milieu de culture alors que les ions  $Mn^{++}$  sont nécessaires pour la production de mégacine.

L'addition de manitol (0,5%) au milieu cœur cerveau (BHI) a élevé la production de staphylococcine 462, alors qu'elle diminue celle de staphylococcine 414.

#### III-1-2-Les conditions d'incubation :

La variation des conditions de culture, à savoir, température-temps, aération et pH joue beaucoup sur la production de bactériocines.

##### a)La température d'incubation :

D'une manière générale, la production de bactériocine est élevée à des températures optimales de croissance. La température élevée supprime complètement la production de bactériocine et conduit quelques fois à une perte irréversible du facteur bacteriocinogénique (TAGG et al., 1976).

##### b)Le temps d'incubation :

La production maximale de bactériocines dans une culture peut se présenter à différentes phases de croissance, celle de streptococcine TH est meilleure pendant la phase exponentielle de croissance avec une diminution brusque avant la phase stationnaire de croissance. Par contre, la production de streptococcine A-FF22 débute un peu plus tard et l'activité décroît lentement lors d'une incubation prolongée (TAGG et al., 1976).

LACHWICZ (1965) cité par TAGG et al., (1976) a étudié la production de staphylococcine A-1262 sur milieu solide. L'activité a été détectée au bout de

8 heures, alors que la production est maximale entre 18 et 24 heures d'incubation, et par la suite elle a diminué jusqu'à zéro.

#### c) Le pH :

L'influence apparentée du pH sur l'obtention des bactériocines n'est pas à négliger. Concernant la production de colicine K, GOEBEL et al., (1955) cité par TAGG et al., 1976 ont montré que le contrôle du pH du milieu est un facteur critique. D'autres travaux prouvent que la production de streptococcine A-FF22 sur milieu TODD-Hevitt agar a augmenté suite à l'ajustement du pH initial à 6,5. JOERGER et KLAENHAMMER (1986) ont montré l'effet du pH sur la production de l'helveticine J : à pH 7,0, 800 U.A/ml ont été détectées après 12 heures d'incubation. A pH initial de 6,0 la production s'élève à 3200 U.A/ml après 5 heures d'incubation. La production maximale de l'helveticine J a été remarquée à pH 5,5 avec une concentration de 6400 U.A/ml après 11 heures d'incubation.

#### d) L'aération :

L'aération des cultures favorise la production de bactériocines produites par des staphylocoques. La dénaturation mécanique des bactériocines peut être minimisée par addition d'agents anti-moussants en outre, la présence d'oxygène peut inhiber partiellement ou complètement la croissance de certaines bactéries lactiques (TAGG et al., 1976).

### III-1-3-Inductibilité des bactériocines :

La production de quelques bactériocines des bactéries Gram (+) est inductible pour cela, deux méthodes sont souvent utilisées :

- L'irradiation par l'ultraviolet (UV) de la culture bactériogène.
- Le traitement de la souche par la mitomycine C.

Selon JACOB et al., (1953), l'irradiation d'une culture bactériocinogène augmente la production de bactériocines. Ainsi, IVANOVICS et al. (1958) et MARJAI et al. (1964) cités par TAGG et al. (1976) ont réussi à favoriser la production de mégacine par irradiation (UV) de *Bacillus megaterium*.

Grâce à l'induction par la mitomycine C, (RAMMELSBERG et RADLER, 1990) ont réussi à produire la caseïne 80 synthétisée par *Lb. casei*. Par ailleurs, l'induction peut varier selon les souches CLARKE et al. (1975) cités par TAGG et al. (1976) ont montré que la mitomycine C utilisées pour le traitement des souches productrices de bactériocines augmente 4 fois la production de perfringocine 11.105 alors qu'aucune augmentation n'a été détectée avec l'irradiation par l'ultraviolet.

### III-2-détermination génétique des bactériocines :

Les propriétés qui possèdent des bactéries à dégrader ou à synthétiser certaines substances telles que les bactériocines, sont contrôlés par des gènes. (NOVEL, 1992). En ce qui concerne les bactériocines ces gènes dits "facteurs bactériocinogènes" sont stables et se transmettent héréditairement de bactéries mères aux bactéries filles. Ces facteurs déterminent spécifiquement la production des bactériocines et en même temps, la résistance de bactérie productrice à l'action de la bactériocine élaborée mais non à d'autres bactériocines (RICHOUX, 1998).

#### III-2-1-Nature de déterminant génétique des bactériocines :

Dans la définition des bactériocines des bactéries Gram (+) TAGG et al., (1976) précisent que le déterminant génétique de ces substances est un plasmide. Pour les antibiotiques la synthèse de ces inhibiteurs s'effectue par voie ribosomale, les gènes codant pour la production de ces bactériocines sont portés par des plasmides de 50 Kb pour la lactocine S et de 70Kb pour la lactine 481 et la lactococcine DR dans le cas de la souche de *Lc. lactis* NizoR5, productrice de nisine, les gènes sont situés sur un transposon conjugatif portant à la fois le gène de la pré-nisine et celui d'une protéine de 851 acides aminés. (MATHOT et al., 1996).

Les non antibiotiques sont issus d'un précurseur synthétisé au niveau ribosomal, la rupture d'une séquence leader du côté N-terminal permet l'obtention du peptide actif. Ces séquences leader présentent des homologues : site de coupure de type Gly.Gly (positions 1 et 2) et résidus méthionine et en générale lysine à l'extrémité N-terminale du peptide leader. Ceci suggère un mécanisme post-traductionnel commun à la maturation de toutes les petites bactériocines hydrophobes de bactéries lactiques. Le gène codant pour la production de ces bactériocines est porté par des plasmides de taille variable en général, les portions responsables de la production et l'immunité sont situées sur le même plasmide, à proximité l'une de l'autre (MATHOT et al., 1996).

Cependant, dans d'autres études, il a été montré que le support génétique de la production de bactériocines peut être chromosomique, c'est le cas des bactériocines de haut poids moléculaire, le gène codant pour l'helvéticine J est chromosomique. La localisation n'est pas connue précisément dans le cas de l'helvéticine V-1829 et de la caseicine 80, mais ne semble pas dans ces deux cas, plasmidique. (RAMMELSBERG et RADLER, 1990).



### III-2-2-Transfert du déterminant génétique des bactériocines :

La transmission de facteurs bactériocinogènes s'opère normalement par la voie héréditaire de bactéries mères aux bactéries filles lors de la multiplication bactérienne. Ils peuvent également se transmettre par transduction (par intermédiaire d'un bactériophage). (NOVEL, 1992).

La voie la plus intéressante concerne le génie génétique, c'est celle de la transmission par conjugaison d'une bactérie F(+) (donatrice) avec une bactérie F(-) (réceptrice), chez la souche S.lactis diacetylactis.WM4 un plasmide de 132 Kpb est responsable de la production d'une bactériocine. Ce plasmide est transmissible par conjugaison au dérivé LM 2301 ( $lac^-$ ,  $str^R$ ) de

Lb.lactis subsp.lactis. Les deux types de conjuguants obtenus sont des cellules  $lac^+ Bac^+$  et des Cellules  $lac^+ Bac^-$  chez les conjuguants  $Lac^+ Bac^+$ , les deux plasmides lactose et bactériocinogène sont présents, chez les  $Lac^+ Bac^-$ , un seul plasmide est présent et sa taille est supérieure (83 ou 98 Kpb) à celle du plasmide lactose(45Kpb). Seuls les conjuguants porteurs du plasmide recombiné sont capables de transférer  $Lac^+$  à forte fréquence ( $10^{-2}$  par cellule réceptrice contre  $10^{-5}$  pour les  $Lac^+ Bac^+$ ) mais ils ne sont pas capables d'agrégation (NOVEL, 1992).

Chez les souches non conjugatives, un plasmide au moins de chaque souche productrice est homologue de ces plasmides conjugatifs, les gènes de ces bactériocines pourraient avoir une origine commune, une souche de Lb.lactis subsp.lactis, porteuse de deux plasmides, transfère le caractère  $Bac^+$  sans l'intervention apparente d'un plasmide, les gènes Bac seraient soit intégrés au chromosome soit portés par un plasmide instable ce résultat est comparable à celui obtenu avec un dérivé de la souche Lb. Lactis Subsp.lactis productrice de nisine qui demeure  $Nis^+$  et qui ne possède pas de plasmide (NOVEL, 1992).

### III-3-Conséquence de la production d'une bactériocine pour la bactérie productrice :

Pour un nombre limité de bactéries, la biosynthèse de bactériocine est létale. Généralement, la cellule productrice synthétise également une molécule qui l'immunise contre son propre bactériocine. Cette propriété acquise de produire et résister à la bactériocine se transmet héréditairement(MATHOT et al., 1996).

Pour Lc.lactis Nizo.R5, productrice de nisine, les gènes sont situés sur un transposon conjugatif (Tn 5276, 70Kb) portant à la fois le gène de la pré-nisine (NISA : 57 acides aminés) et celui d'une protéine de 851 AA (NISA B) qui

B) qui pourrait être impliquée dans l'immunité des souches productrice (MATHOT *et al.*, 1996).

TAGG *et al.*, (1976), ont montré qu'on peut rendre une culture artificiellement résistante à une colicine, en prélevant des colonies secondaires apparues dans la zone d'inhibition produite par cette colicine. En répétant de la même façon la sélection du mutant résistant après l'action de plusieurs colicines, on obtient une souche qui devient successivement résistante a ces colicines. Les mécanismes d'immunité des souches productrice ainsi que ceux de résistance des autres bactéries non productrices sont encore peu connus. Dans le cas de la nisine, la résistance est dans certains cas, due à la production de nisinases, enzymes protéolytique détruisant la nisine (*Bacillus, S. thermophilus*) (MATHOT *et al.*, 1996).

#### III-4-Purification des bactériocines :

Les méthodes de purification des bactériocines restent difficiles à déterminer quant au protocole expérimental, car il diffère d'une bactériocine à une autre. La purification de quelques bactériocines à été réaliser et de meilleurs résultats ont été obtenus (PIARD *et al.*, 1990). D'une manière générale, cette opération consiste à concentrer des préparations des bactériocines brutes (surnageants) par précipitation avec des acides, des sels, de l'éthanol ou divers solvants.

La récupération de la bactériocine pure peut être réalisée en se basant :

- Sur la différence de taille et deux méthodes peuvent être appliquées à savoir chromatographie sur gel et l'ultrafiltration.
- Sur la différence de charge, pour cela trois techniques sont proposées,
  - \*Chromatographie échangeuse d'ions.
  - \*Electrophorèse.
  - \*Focalisation isoélectrique.

Cependant, il y'a abaissement de l'activité des bactériocines après purification progressive (PIARD *et al.*, 1990). La caseicine 80 perd totalement sont activité après passage à travers une résine anionique, alors qu'elle est purifiée d'une manière satisfaisante sur résine cationique. Il est donc important de bien choisir la technique en contrôlant l'activité spécifique des bactériocines, afin de ne pas abaisser considérablement leur activité (RAMMELSAERG *et RADLER*, 1990).

Le tableau 2 résume d'une façon générale les déterminants génétiques et les conditions de productions et de purification des bactériocines.

**Tableau : déterminant génétique, conditions de production et purification des bactériocines**

Bactériocine	Biosynthèse	Condition de production	Protocole de purification	Déterminant génétique	Références
Nisine	Commence après la phase exponentielle de la croissance de <u>S.lactis</u>	Milieu complexe tamponné au pH compris entre 5,9 et 6,1	Précipitation par solvant organique ou chromatographie par échange d'anion+chromatographie par gradient de pH ou chromatographie par interaction hydrophobique	Plasmide intégration	(MATHOT et al., 1996)
Diplococcine Phase stationnaire	Phase stationnaire	/	Précipitation au $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ +chromatographie à échange cationique	Plasmide conjugaison	(RICHOUX. 1998) (SEROT et al., 1990)



Lactostrepsine	A la fin de la phase Logarithmique de croissance (après 4 à 5 h d'incubation)	pH de culture non régulé	/	/	(MATHOT et al., 1996)
Helveticine J	Un peu tard pendant la phase Logarithmique de croissance	Culture anaérobie Maintenu à pH 5,5 dans le bouillon MRS	Précipitation par $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ filtration sur gel	chromosomique	(SEROT et al., 1990)
Caseïcine 80	2% de l'activité intracellulaire	Culture jus de tomate, augmente la production de la caseïcine plus que lors de l'induction à la mytomycine C	Ultrafiltration + chromatographie à échange cationique + filtration sur gel	chromosomique	(RAMMELSBERG et RADLER, 1990)
Sakacine A	Un peu tard pendant la phase logarithmique de croissance	/	Ultrafiltration + chromatographie échangeuse d'ions	Plasmide	(RICHOUX, 1998)
Lacticine 481	Phase logarithmique de croissance	Cultures maintenues à pH 5,5 dans le bouillon ELLIKER	Précipitation au $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ + filtration sur gel	Plasmide	(MATHOT et al., 1996)

Pediocine	Un peu tard pendant la phase logarithmique de croissance	/	/	Plasmide	(GIRAFFA et al., 1989)
Plantaricine S	Phase stationnaire	Culture maintenue à pH 5,0 dans le bouillon MRS	/	Plasmide	(MATHOT et al., 1996)
Lactacine F	Pendant la phase logarithmique de croissance	Culture maintenue à pH 7	Précipitation par $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + filtration sur gel + $\text{C}_{18}\text{Rp}$	Plasmide	(RAMMELSBERG et RADEL, 1990)
Lactococcine B	Pendant la phase logarithmique de croissance	Culture maintenue à pH 6,0 dans le bouillon MRS	Chromatographie à échange cationique	Plasmide	(GIRAFFA et CARMINATI, 1991)
Lactocine 27	Phase logarithmique de croissance activée non intracellulaire	Culture dans le milieu APT maintenue à une température de 37°C	Précipitation par solvant organique + filtration sur gel avec SDS et sans tampon	Chromosomique	(PIARD et al., 1991)

#### IV-Spectre et mode d'action :

##### IV-1-Spectre d'activité :

**RAMMELSBERG et RADLER (1990)** ont montré que les bactériocines isolées de 9 souches indicatrices de Lb.casei B80 et Lb.brevis B37 présentent une grande diversité d'activité. Ceci est confirmé quand ces deux substances ont été testées avec la méthode de diffusion d'agar contre une large classe de différents micro-organismes, le total de 221 souches (145 de bactéries Gram(+), 42 bactéries Gram(-), et 3 levures) ont été testés. La caseine B 80 était active, seulement, contre 24 souches de Lb.casei testées.

La substance antimicrobienne de Lb.brevis (brevicin37) montre un large spectre d'activité. Elle est active, seulement, contre les bactéries Gram positives à l'exception de Nocardia corralina, notant que, toutes les souches sensibles sont des bactéries lactiques, et que les souches des espèces :

Pediococcus . damnosus, Lb.brevis et L.oenos étaient les plus sensibles (**RAMMELSBERG et RADEL.R.1990**).

S.thermophilus produit un composé actif contre Lc.lactis, Bacillus, Pseudomonas et des Entérobactéries, alors que des espèces de Lactobacillus produisent des bactériocines avec un spectre d'activité restreint aux espèces voisines (**RAMMELSBERG etRADLER.1990**).

La nisine produite par Lc.lactis subsp.lactis agit sur les cellules végétatives mais empêche aussi la germination des spores de bactéries sporulées comme Bacillus ou Clostridium dont Clostridium tyrobutyricum tout en gardant un spectre d'activité restreint aux Gram(+) (**NOVEL.1992**).

La diplococcine produite par Lc.lactis.subsp.cremoris inhibe certaines souches de bactéries lactiques, mais reste inactif sur les bactéries sporulantes (**NOVEL.1992**).

La lactocine 27 produite par Lb.helviticus, Lb.bulgaricus et Lb.lactis est active, seulement sur des souches de Lb.helviticus ou Lb.acidophilus (**NOVEL.1992**).

La pediocine PA.1 a un spectre d'action relativement large comprenant certaines espèces de bactéries lactiques, Staphylococcus, Bacillus, Listeria, Enterococcus, Propionibacterium, Clostridium, ainsi que Brochothrix thermosphacta (**NOVEL.1992**)

La lactacine résultat de purification d'une bactériocine produite par Lb.acidophilus active seulement sur Lb.leichmanii,

Lb.delbrueckii, subsp.bulgaricus, Lb.helveticus et Lb.lactis, la lactacine F produite par d'autres souches de Lb.acidophilus agit sur Lb.fermentum et Enterococcus.faecalis (NOVEL, 1992).

Les lactococcines A et B produites par des souches de Lc.lactis.subsp.lactis ou Lc.lactis.subsp.cremoris ont un spectre d'activité étroit ne concernant que les lactocoques (MATHOT et al., 1996).

#### IV-2-Mode d'action :

Les bactériocines agissent généralement en altérant la membrane des bactéries Gram(+). Elles s'adsorbent de manière non spécifique, ce que n'est pas le cas pour les lactocines A et B qui nécessiteraient un récepteur spécifique sur des souches sensibles ou résistantes, sur des récepteurs utilisant l'acide teichoïque (composant exclusif des bactéries Gram (+)) (RICHOUX, 1998).

Le mécanisme général est la formation de pores ou de canaux dans la membrane de la bactérie cible (MATHOT et al., 1996). Ceci provoquera des fuites de potassium ionique et d'ATP et inhibant la croissance, la production d'une protéine immune serait à l'origine du phénomène de résistance (RICHOUX, 1998). Ce mécanisme est «énergie-indépendant» contrairement à celui de la nisine (MATHOT et al., 1996).

La nisine peut également provoquer une destruction de la cellule par activation des enzymes autolytiques, notant que les mécanismes de production restent jusqu'à maintenant inconnus, il s'agirait de chaînes de réactions enzymatiques qui aboutit à une production importante en fin de phase exponentielle. Une synthèse de précurseurs précéderait une étape de maturation de la bactériocine (RICHOUX, 1998).

#### V-Les bactériocines produites par les bactéries lactiques :

Au cours des dernières années, l'intérêt pour les bactériocines des bactéries lactiques s'est accru et de nombreuses molécules sont actuellement étudiées. Ces données font apparaître l'hétérogénéité de ce groupe. Cependant commencent à apparaître des regroupements et une classification de ces molécules en fonction de leurs déterminants génétiques et de leur spectre d'action, c'est sur cette base que nous essayerons de les présenter ici (MATHOT et al., 1996).

Malgré une connaissance en rapide évolution, la caractérisation des bactériocines des bactéries lactiques est encore loin d'être complète aussi nous nous limitons principalement aux molécules suffisamment connues. Certaines

bactériocines, mises en évidence il y'a une dizaine d'années, voire plus, telles que la diplococcine de Lc.lactis, subsp.cremoris ou les lactostrépcines de Lactococcus ne sont encore que bien peu connus au niveau de leur structure, leur sensibilité aux enzymes et mode d'action (**MATHOT et al., 1996**).

On a regroupé tous les données concernant la plupart des bactériocines produites par les bactéries lactiques dans le tableau 3.



**Tableau : Classification, spectre d'action, propriétés chimiques et physiques des bactériocines**

Bactéries lactiques bactériocines	Classe	Spectre et mode d'action	Nature chimique et PM	Thermotolérance et acidotolérance	Inactivation enzymatique	Références
<u>Lactis subsp. lactis</u> Nisine	Lantibiotique	Bactéries Gram (+) Spores de <u>Clostridium</u> et de <u>Bacillus</u> Bactéricide large	Protéine 3500	+ (115°C, pH2) - (pH neutre)	$\alpha$ .chymotrypsime nisinase	(MATHOT et al., 1996)
<u>L. lactis subsp. cremoris</u> Diplococcine	Peptide de faible poids moléculaire (non lantibiotique)	<u>L. sp</u> bactéricide étroit	Protéine 5300	Non purifié : (1h, 100°C, pH5) - (1h, 100°C, pH alcalin) purifiée : - (1min, 100°C)	Trypsine $\alpha$ -chymotrypsime pronase	(NOVEL. 1992)
<u>S Lactis lactostrepsine</u>	Lantibiotique	<u>L. sp Clostridium sp</u> <u>Lb helveticus</u> <u>Leuconostoc sp</u> Bactéricide étroit	Protéine	+ (100°C, 10min) - (pH neutre)	$\alpha$ -chymotrypsine trypsine, pronase phospholipase d	(KOSAK et al., 1978)

<u>Lb helveticus</u> Lactocine 27	Complexes Lipo-ou glico- protéique	<u>Lb. helveticus</u> <u>Lb. acidophilus</u> Bactériostatique étroit	Complexe lipo polysaccharid e et protéique > 200.000 (12.400 après purification)	+ (1h,100°C)	Trypsine Pronase	(MATHOT et al.,1996)
Lactococcine B	Peptide de faible Poids moléculaire	<u>Lb. leichmanii</u> <u>Lb. casei</u> <u>Lb. bulgaricus</u> , <u>Lb. helveticus</u> , Bactéricide étroit	Agrégat 100.000 (37.000 après purification)	Non purifié, (1h,100°C) purifié :+ (3min,100°C)	Proteinase K	(Ricoux, 1998)
<u>Lb plantarum</u> Plantaricine S	Complexes lipo- ou glico protéique	<u>Lb. sp.</u> , <u>L. sp.</u> , <u>Lc sp</u> <u>Pediococcus sp</u>	Protéine	+ (1h,100°C)	$\alpha$ hymotrypsine, ficine,pronase, proteinase k, trypsine, thermolysine, dextranase, $\alpha$ -amylase,lipase	(GIRAFFA et al.,1989)
<u>Lb acidophilus</u> Lactacine F	Peptide de faible poids moléculaire	<u>Lb. leichmanii</u> <u>Lb. casei</u> <u>Lb. bulgaricus</u> <u>Lb fermentum</u> Bactéricide large Bactérie Gram (-)	Protéine 5400	/	/	(NOVEL 1992)

<u>Lb. helveticus</u> Helveticine J	Peptide de haut poids moléculaire	<u>Lb. helveticus</u> , <u>Lb. bulgaricus</u> , Bactéricide étroit -	Agrégat Protéique >300,000 (37,000 après purification)	(30min, 10°C)	Trypsine pronase, ficine, prtéinase K pepsine, substilisine	(NOVEL 1992)
<u>Lb casei</u> Caseicine 80	Complexe lipo ou glyco protéique	<u>Lb Casei</u> Bactéricide étroit	Protéine 40000-42000	10min, 60°C, pH2	Trypsine, chymotrypsine pronase, protéinase K, pepsine	(RAMMEL SBERG ET RADLER 1990)
<u>Lb sake</u> SAKAcine A	Peptide de faible poids moléculaire (non lantibiotique)	<u>Lb sp</u> <u>Listeria monocytogenes</u>	Protéine	+(20min, 100°C)	Trypsine, pepsine	(MATHOT al., 1996)
<u>Pediococcus acidilacticii</u> Pediocine ACH	Peptide de faible poids moléculaire	Bactérie lactique <u>Clostridium sp</u> <u>St aureus</u> <u>Listeria monocytogenes</u> <u>Bacillus cereus</u> Bactéricide large	Peptide 2700	+(1h, 100°C pH 7,0) instable a pH 11	Trypsine	(PIARD ET DESMAZEAUD 1992)

Pediocine PA1	Idem	Bactérie lactique <u>Listeria</u> <u>monocytogenes</u> Bactéricide	/	+(10min,100°C)- (15min,121°C)	α-chymotrypsine pepsine,papaïne	(SEROT et <u>al.</u> ,1990)
<u>Pediococcus</u> <u>pentasacens</u> Pediocine A	Idem	Bactéries lactiques <u>Clostridium</u> sp <u>St aureus</u> , <u>Listeria</u> <u>monocytogenes</u> , <u>Bacillus cereus</u>	Protéine 36000	+(1h,100°C)	Pronase	(PIARD et DESMAZE AUD 1992)
<u>Lactis</u> subsp. <u>Lactis</u> Lacticine 481	Lantibiotique	<u>Lc.sp</u> <u>Lb.helveticus</u> <u>Lb.bulgaricus</u> <u>L.sp</u> <u>S thermophilus</u> <u>Clostridium</u> <u>tyrobuticum</u> Bactéricide étroit	Protéine 7000	+(1h,100°C)- pH(4,5,pH7)	α.chymotry- psine, pronase, ficine	(MATHOT et <u>al.</u> , 1996)

## **VI-Applications des bactériocines :**

Dispose d'une substance ou d'une bactérie capable de détruire la flore pathogène dans les produits alimentaires tels est l'objectif des travaux en cours dans de nombreux laboratoires (GATTEGNO, 1992).

Comme la littérature scientifique et technique décrite au nombre considérable de travaux concernant les bactériocines, on peut se demander pourquoi il existe si peu d'applications développées dans l'alimentation humaine. En fait, pour que ces substances inhibitrices produites par les bactéries lactiques ou les souches sélectionnées qui les produisent, puissent avoir un réel développement tant qu'additifs industriels, elles devaient présenter les caractères suivants :

- Avoir un spectre d'activité étendu, en étant active à la fois sur les bactéries à Gram (+) et à Gram (-).
- Avoir une action bactéricide et pas seulement bactériostatique, il s'agit, dans les produits alimentaires, d'éliminer définitivement la contamination initiale, afin qu'aucun développement de bactéries nuisibles ne puisse reprendre dès que les conditions du pH favorable à ces germes réapparaissent.
- Présenter une bonne activité et une bonne stabilité dans les conditions technologiques régnant à tous les stades de la fabrication des produits, notamment dans toute la gamme de pH et des températures caractéristiques de ceux-ci.
- Ne pas perturber les cinétiques d'acidification des besoins acidifiants (ou avoir les mêmes potentialités pour les remplacer) et ne pas inhiber les autres levains éventuellement utilisés, notamment ceux conduisant à la production des arômes caractéristiques des produits finis.
- Présenter une bonne innocuité pour les consommateurs, notamment ne pas entraîner de réactions d'allergie, même par les produits de leur dégradation, et ne pas perturber les équilibres de la flore intestinale (DESMAZEAUD, 2001).

### **VI-1-Applications de la nisine :**

La nisine est employée comme agent de conservation dans l'industrie alimentaire c'est-à-dire tant qu'additif. Elle est utilisée pour la conservation de fromage fondu, de fromage à pâte cuite pressée et de lait stérilisé. Les conditions d'applications de la nisine sont liées à ses propriétés et à son spectre d'action. Le pH doit être inférieur à 7, l'effet exploitable concerne les bactéries

Gram positives, plus spécialement les Bacillaceae et les clostridies (BERTRAND et al., 1998).

Les raisons qui peuvent permettre l'utilisation de la nisine comme additif alimentaire sont les suivants :

- Elle est produite par un organisme normalement utilisé dans les fermentations alimentaires.
- La nisine résiduelle dans les aliments est digeste, elle est en effet sensible à l' $\alpha$ -chymotrypsine.
- Les études restent rares sur les possibilités d'acquisition de la résistance à la nisine par certains micro-organismes, résistance qui pourrait conjointement entraîner une résistance croisée à d'autres antibiotiques, toutefois aucune acquisition de résistance à la nisine n'a pu être mise en évidence chez les micro-organismes de la flore buccale d'animaux ou d'humains dont les aliments contenant un fort taux de nisine. JOHNSON et al. (1978) ont noté quant à eux une diminution de la flore cariogène buccal chez le singe sous l'action de la nisine (MATHOT et al., 1996).

#### **VI-2-Possibilités d'utilisation dans les produits laitiers :**

L'application de cette propriété de Lc.lactis de produire de la nisine a d'abord été envisagée pour l'inhibition de Clostridium.tyrobutyricum dans les fromages et divers travaux déjà anciens ont confirmés cette possibilité. Mais la sensibilité des souches nisogènes aux phages ou la sensibilité des ferments à la nisine rend problématique l'utilisation du procédé. Cependant LIPINSKA (1977), utilisant des souches productrices de nisine en combinaison avec des résistants à la nisine, a obtenu 90% de fromages de très bonne qualité, alors que parmi les témoins 59% des fromages étaient butyrique (VENEMA et al., 1990).

Le rôle de la nisine dans la protection des produits laitiers est renforcé par le fait qu'elle possède une solubilité maximale aux pH acides rencontrés dans ces produits. Elle est utilisable dans les fromages fondus. SOMERS et TAYLORS (1987) ont montré que la nisine était efficace dans la prévention de la formation de toxine de Clostridium.butylinum dans les fromages fondus possédant un taux d'humidité supérieur à 55% (PILET et al., 1998).

La nisine est également utilisée pour améliorer la conservation de produits laitiers contenant du chocolat, dans les yaourts pour éviter la forte acidification, pour inhiber le développement de souches de Bocillus et de Listeria.monocytogenes dans beaucoup de ces produits, les faibles pH

améliorent l'efficacité de la nisine. L'inhibition de Listeria monocytogenes dans les produits laitiers nécessite l'utilisation de très fortes concentrations de nisine, comprises entre 10.000 et 20.000 unités /ml (VENEMA et al., 1990).

D'autres travaux effectués sur l'action des bactériocines dans plusieurs pays, sont consacrés à l'élimination d'une bactérie Gram positif indésirable, Clostridium tyrobutyricum cette souche prolifère dans les ensilages, se trouve dans le lait, puis dans certains fromages. Sa présence provoque dans des pâtes pressées non cuites et surtout dans des pâtes cuites, un gonflement et une altération de la saveur (goût piquant) (THAULT et al., 1991).

### **VI-3-dans les produits carnés :**

Les études sont nombreuses sur l'utilisation de la nisine dans les produits carnés, pour inhiber la croissance de Clostridium butylinum et la production de ces toxines, elles ont montré que la nisine avait une faible capacité à inhiber la production de toxine (MATHOT et al., 1996).

Aussi la nisine a-t-elle été utilisée en tant qu'additif éventuel : utiliser en mélange avec d'autres conservateurs : sorbate nitrite...(MATHOT et al., 1996).

JAVIS et BURKE (1996) cité par MATHOT et al., (1996) ont utilisé de la nisine à 1600 U.I/g seule ou en combinaison avec 1000 ppm d'acide sorbique et 2,5 pour 100 de polyphosphate dans des saucisses fraîches anglaises, ils ont observé une meilleure conservation à 5°C que dans le cas où chacun des constituants était utilisé seul. Ces auteurs ont noté une augmentation de la phase de latence des principaux groupes de micro-organismes présents.

CASERIO et al, (1979) cité par MATHOT et al., (1996) ont montré que 200 U.I/g de nisine en combinaison avec 75 à 100 ppm de nitrate de sodium retardaient la germination de spores de Clostridium perfringens inoculées dans la viande.

Outre la nisine, d'autres bactériocines bénéficient actuellement d'un certain développement industriel : la pediocine produite par certaines souches de Pediococcus acidilacti, antagoniste de pathogènes alimentaires tels que St. aureus, Clostridium perfringens, Clostridium butylinum, Listeria monocytogenes, Bacillus cereus et même de bactéries Gram négatifs comme St. typhimurium et E. coli. L'addition de pediocine dans les saucisses emballées sous vide, stockées à 4°C et dans lesquelles on a inoculé Listeria monocytogenes permet de réduire

d'un facteur de 10 à 1000 le taux de cette bactérie pathogène (**DE VUYST et al., 1989**).

La sakacine produite par Lb.sake qui est active également contre Listeria.monocytogenes. dans un laboratoire allemand, on a ajouté dans de fines tranches de viande grillée, d'une part Lb.sake produisant une bactériocine et d'autre part des souches n'ayant pas cette propriété. Après deux jours de stockage à 8°C, le taux de Listeria était réduit d'un cycle logarithmique dans le premier lot par rapport au deuxième. Grâce à ce résultat, ce ferment Lb.sake est commercialisé aux professionnels de la charcuterie, salaison (**BERTRAND et al., 1998**).

La bactériocine produite par Corynebacterium.piscicola qui est isolée de la viande, cette bactériocine peu inhiber les Bacillus et Clostridium (**MATHOT et al., 1996**).

La bactériocine produite par L.gelidum où l'effet bactériostatique de cette bactériocine agit en particulier sur Listeria.monocytogenes et Enterococcus.feacalis (**BERTRAND et al., 1998**).

Reste que malgré tous ces résultats encourageants des limites existent à l'utilisation de ces bactériocines dans les produits carnés :

- L'existence de souches résistantes, à l'intérieur même d'une espèce, toutes les souches ne sont pas également sensibles.
- Les difficultés de diffusion à l'inhibiteur dans la viande.
- La possibilité d'inactivation par les protéases. Cependant, ces molécules présentent un intérêt en particulier pour l'élimination des contaminants bien précis tels que les clostridium ou les Listeria (**BELIARD et al., 1991**).

#### **VI-4-Dans les produits de la quatrième gamme :**

Certains composés comme les acides organiques (acide citrique, ascorbique...) ou des sulfites contrariant ou bloquant l'activité enzymatique, peut être utiliser pour traiter les légumes contre le brunissement. Mais aucun additif n'est encore autorisé en 4 ème gamme, à l'exception d'un additif éventuel qui consiste en souches de bactéries lactiques (sélectionnées en BRETAGNE) productrices de bacteriocines, protéines qui inhibent les souches voisines dont les fermentations font gonfler les sachets (**KERJEAN, 1998**).



**VI-5-Dans le domaine thérapeutique :**

REKHIF en 1990 rapporte, d'après le bulletin de la société française de microbiologie que l'ambicine est un nouvel agent antibactérien, efficace contre un large spectre de bactéries Gram (+) et Gram (-), ainsi que contre des bactéries résistantes aux antibiotiques. Utilisable en applications locales, l'ambicine serait préconisée notamment lors d'affections dermatologiques dans les cas d'infections à staphylocoques observées chez les brûlés ou encore dans les déodorants et les dentifrices. Les bactériocines ainsi proposées présentent deux intérêts majeurs : encore plus sélective que les antibiotiques dans leur action antibactérienne, elles sont, du fait de leur structure protéique, dégradées et rendues inactives par l'acidité gastrique et les enzymes intestinales.

**I-Matériels :**

Notre Travail a été réalisé au niveau du laboratoire de microbiologie du centre universitaire de Jijel : les appareils utilisés tout le long de notre travail sont :

- Agitateur magnétique (HEIDOLPH MR).
- Autoclave.
- Microscope optique.
- Bain mari (GERHARDT).
- Balance analytique (KERN).
- Etuve (MAMMER).
- Etuve pour stérilisation de la verrerie.
- PH mètre (BIOBLOCK).
- Réfrigérateur pour la conservation (ENIEM).

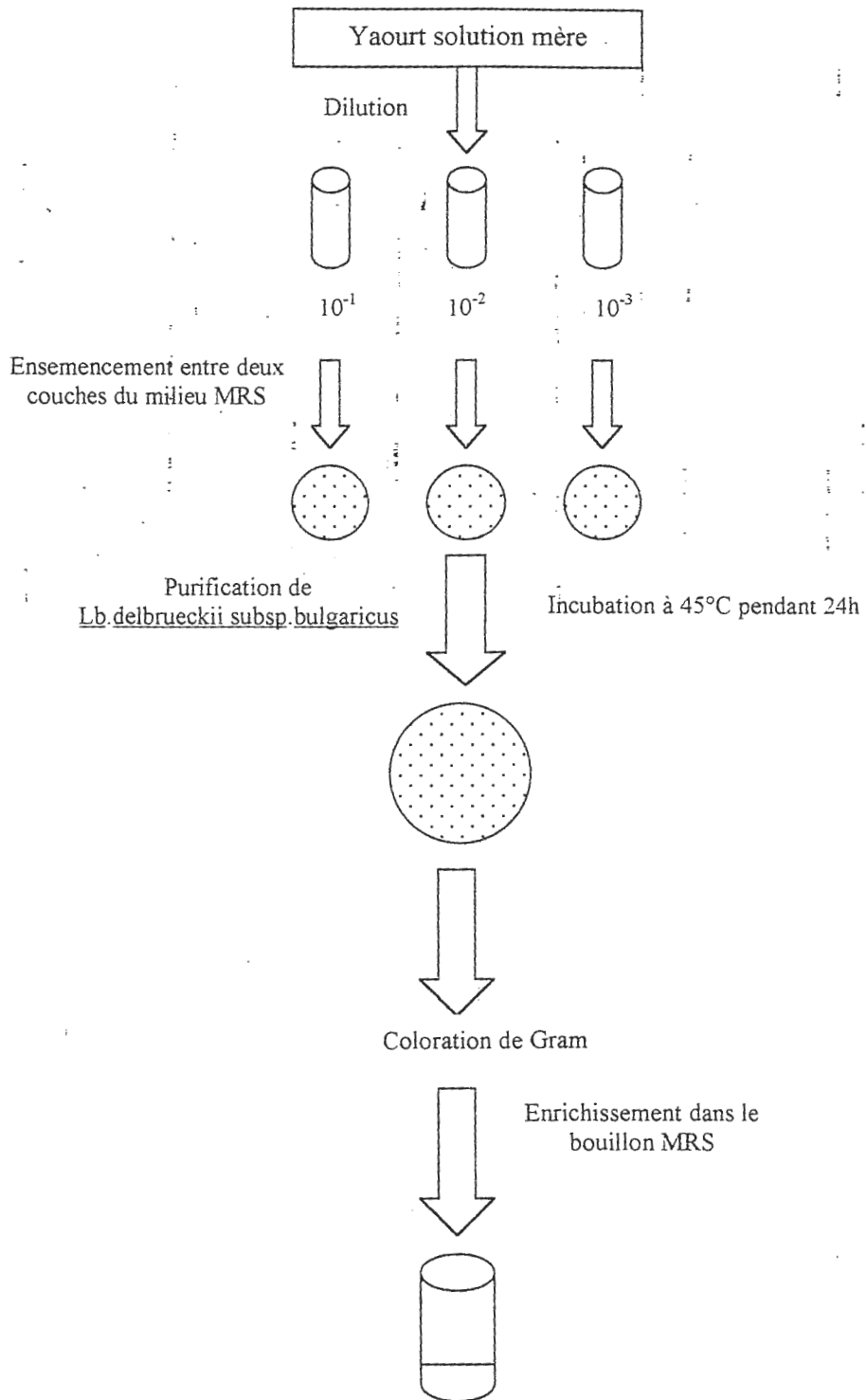
**II-Méthodes :****II-1-Echantillage et technique de prélèvement :**

Nos essais ont porté sur 4 échantillons de yaourt :

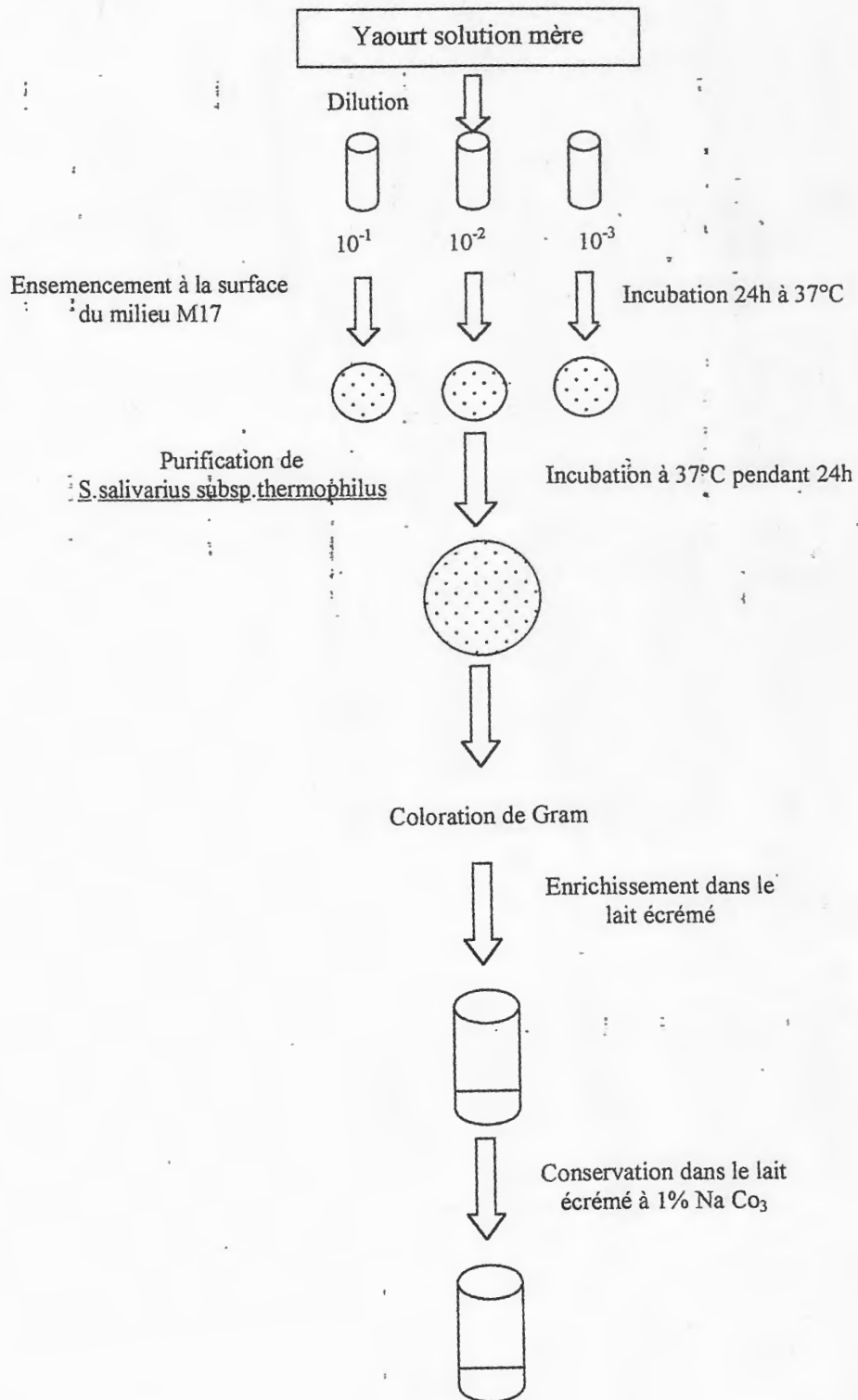
- Deux boîtes de yaourt djurdjura achetées du marché successivement le (05/06/2001) et le (12/06/2001).
- Une boîte de yaourt trèfle achetée du marché le (05/06/2001).
- Une boîte de yaourt préparé dans notre laboratoire par un levain lyophilisé référencié comme suit : yc-x<sub>11</sub>  
yo-Flex  
size : 504.Lot N°2162803

**II-2-Méthodologie d'isolement :**

Une fois au laboratoire les échantillons du yaourt sont mis au réfrigérateur avant de subir les différentes étapes de l'analyse (figure N°2 et 3).



**Figure N°2 : Méthode d'isolement et de purification de *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus***



**Figure N°3 : Méthode d'isolement et de purification de *S. salivarius subsp. thermophilus***

### **II-3-Milieus de cultures**

Les deux milieux de cultures utilisées au cours de l'isolement et la purification des souches, dont la composition se trouve dans la partie annexe sont :

- Milieu M 17 (TERZAGHI ET SANDINE, 1975) : milieu d'isolement des streptocoques lactiques.
- Milieu MRS (DE MAN, ROGOSA ET SHARPE, 1960) : milieu d'isolement des lactobacilles.

### **II-4-Technique d'isolement d'enrichissement de purification et de conversation :**

Les boîtes de Pétri, contenant les deux milieux de cultures M17 et MRS préalablement coulées et séchées, sontensemencées à partir des dilutions préparées et placées à l'étuve à 37°C (pour les streptocoques) et 45°C (pour les lactobacilles). Les boîtes sont lues après 24h d'incubation. Pour chaque échantillon de lait, l'observation des colonies est réalisée simultanément pour toutes les dilutions. Les colonies présentant la morphologie et la pigmentation proches de cellules de S.salivarius subsp.thermophilus et Lb.delbrueckii subsp.bulgaricus sont prélevées et repiquées une fois puis les souches de streptocoques sont enrichies dans le lait écrémé, et celles de lactobacilles dans le bouillon MRS.

Les deux milieux d'enrichissement sont examinés après 24h d'incubation à 37°C pour les streptocoques et à 45°C pour les lactobacilles.

### **II-5-Les micro-organismes :**

#### **II-5-1-Les souches cibles :**

Les six souches pures de germes utilisées sont des bactéries provenant du laboratoire de microbiologie de l'environnement et du laboratoire d'hygiène de la wilaya de Jijel, elles sont représentées dans le tableau N°4 :

**Tableau 4 : les souches cibles, milieux et sources**

Germes cibles	Milieux	Sources
<u>St aureus1</u>	GN	Labo.d'hygiène de Jijel
<u>St aureus2</u>	CHAPMAN	Labo.microbiologie université de Constantine
<u>E.coli</u>	GN	Idem
<u>Proteus</u>	GN	Idem
<u>Bacillus</u>	GN	Idem
<u>Pseudomonas</u>	GN	Idem

**II-5-2-Les souches à tester :**

Les souches à tester ont été isolées de 4 boîtes de yaourts : 2 boîtes de yaourts de Djurdjura, 1 boîte de yaourt Trèfle et d'un yaourt préparé au laboratoire à partir d'un levain lyophilisé référencié comme suit :

yc-X<sub>11</sub>

yo-Flex

size : 504.Lot N°2162803

Les souches de streptocoques ont été conservées dans le lait écrémé 0.1% Na CO<sub>3</sub> et celles de lactobacilles dans un milieu MRS, le nombre de souches à tester est de 4 dont 3 streptocoques et 1 lactobacille , repiquées respectivement sur milieux M17 et MRS inclinés.

**II-6-Mise en évidence de l'activité antibactérienne :**

Mettre en évidence l'effet inhibiteur des bactéries lactiques par action d'une bactériocine, nécessite de travailler dans des conditions expérimentales éliminant l'influence des acides organiques notamment l'acide lactique et le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (**BELIARD et THAULT, 1989**).

Pour cet effet nous avons jugé nécessaire d'utiliser deux méthodes différentes : la méthode des puits et la méthode des disques, tout en éliminant l'effet de l'acidité et celui du peroxyde d'hydrogène.

## **II-6-1-Conduites des cultures :**

### **a) Les souches ciblent :**

A partir d'une culture pure en milieu solide conservée à +4°C, les différentes souches sont repiquées en bouillon nutritif. L'incubation est réalisée à 30° pendant 18 heures.

### **b) Les souches à tester :**

A partir des cultures conservées, les souches à tester ont subi des repiquages dans le milieu MRS pour les lactobacilles et le bouillon gélosé tamponné (BGT) pour les streptocoques.

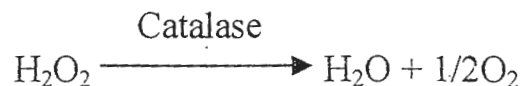
## **II-6-2-Elimination des effets de l'acidité et du peroxyde d'hydrogènes :**

### **a) Elimination de l'effet de l'acidité :**

L'effet de l'acidité résultant de la production de l'acide lactique par les souches à tester est éliminée par ajustement du pH par Na OH 1N jusqu'à un pH de 6.5-7.

### **b) Elimination de l'effet du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) :**

L'effet du peroxyde d'hydrogène est éliminé par la catalase. Cette enzyme permet la dégradation de l'eau oxygénée qui résulte de l'oxydation par l'oxygène de l'air, des hydrogènes transportés par la voie oxydative directe. La



réaction de la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de la catalase est la suivante :

Réalisée par ajout d'une solution fraîche d'eau oxygéné à 10 volumes et se traduisant par un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulles (GUIRAND et GALZY, 1980).

## **II-7-Méthode des puits :**

Les milieux gélosés appropriés à la croissance des souches cibles, milieu CHAPMAN pour les deux souches de St.aureus et la gélose nutritive pour : Pseudomonas, Proteus, Bacillus et E.coli sont coulés en boîte de Pétri (90mm de diamètre) etensemencé avec les souches citées ci-dessous.

Des puits de quelques millimètres sont effectués sur milieu solidifié à l'aide d'une pipette Pasteur avec le côté large. Entre temps, les cultures des cellules à tester sont centrifugées (20 minutes à 4000 tr / mn). On ajoute au surnageant

obtenu de la catalase, et on ajuste son pH à 6.5-7 avec Na OH 1N, et nous remplissant les puits avec quelques gouttes du surnageant.

Dans le but de faciliter la diffusion radiale de la solution antibactérienne, nous réalisons une pré-incubation à +4°C au réfrigérateur pendant 30 minutes.

Ensuite les boîtes sont incubées à 37°C pendant 18 heures et observation de la zone d'inhibition autour des puits.

### **II-8-Méthode des disques :**

Comme pour la méthode des puits les milieux gélosés coulés, séchés et ensemencés avec les souches cibles.

- Les disques sont faits avec du papier Wattman environ 6 mm de diamètre dans des conditions stériles.
- Le pH du surnageant obtenu après une centrifugation (4000 tr / mn pendant 20 minutes) est ajusté à 6.5-7 avec Na OH 1N ajout de la catalase.
- Les disques préparés sont inhibés dans les surnageant et déposés dans les boîtes ensemencées avec les souches cibles (6 disques).

Pour faciliter la diffusion radiale de la solution antibactérienne, une pré-incubation est réalisée à 4°C au réfrigérateur pendant 30 minutes.

Ensuite, les boîtes sont incubées à 37°C pendant 18 heures. L'observation des zones d'incubation se fait autour des disques.



## **I-Résultats d'isolement :**

Au cours de l'isolement trois souches de S.salivarius subsp.thermophilus ont été isolées. Les colonies observées sur le milieu M17 sont rondes, lenticulaires, à contour régulier, de coloration blanche crème de petite ou moyenne taille.

Les colonies isolées sur milieu MRS sont généralement à contour régulier de coloration blanche crème, parfois transparentes de taille moyenne voir même de très petite taille.

### **I-1-Examen microscopique :**

L'examen microscopique (coloration de Gram (voir annexe)) des cocci à révéler la disposition cellulaire des différentes souches. Cette disposition est présentée en cocci isolés, en diplocoques et en chaînettes plus au moins longues ou formant des amas de cellules en paires ou en chaînettes. Les cellules se présentent sous forme sphérique ou ovoïde, de diamètre variable.

L'observation microscopique des lactobacilles a révélé la présence des cellules en forme de bâtonnets de taille variable selon les souches, des cellules isolées en paires et en chaînettes plus au moins longues.

## **II-Résultats du criblage :**

### **II-1-Méthode des puits :**

D'après les résultats du criblage des trois streptocoques (tableau N°5) nous remarquons que seul la souche S.salivarius subsp.thermophilus1 a une action inhibitrice sur St.aureus, alors qu'elle n'a pas d'effet sur les cinq germes cibles restants.

Pour les deux autres streptocoques, c'est-à-dire S.salivarius subsp.thermophilus2 et S.salivarius subsp.thermophilus3, nous avons remarqué qu'elles n'ont pas d'effet sur les six germes cibles : St.aureus1, St.aureus2, Bacillus, Pseudomonas, Proteus, E.coli.

Pour le seul lactobacille qu'on a pu tester nous avons remarqué qu'il n'exerce aucun effet contre les six germes cibles.

**Tableau N°5 : Résultats du criblage des streptocoques et lactobacille par la méthode des puits**

Souches à tester / souches cibles	<u>S.salivarius</u> subsp. thermophilus1	<u>S.salivarius</u> subsp. thermophilus2	<u>S.salivarius</u> subsp. thermophilus3	<u>Lb.delbrueckii</u> subsp. bulgaricus
<u>St.aureus1</u>	+	-	-	-
<u>St.aureus2</u>	-	-	-	-
<u>E.coli</u>	-	-	-	-
<u>Pseudomonas</u>	-	-	-	-
<u>Proteus</u>	-	-	-	-
<u>Bacillus</u>	-	-	-	-

- : Résultat négatif, pas de zone d'inhibition.

+ : Résultat positif avec un diamètre de la zone d'inhibition d'environ 2 mm.

## **II-2-Méthode des disques :**

D'après les résultats du criblage des 3 streptocoques (tableau N°6), nous remarquons que les 3 souches de S.salivarius subsp.thermophilus testées ont une action inhibitrice sur : E.coli, Proteus, Pseudomonas.

- La souche S.salivarius subsp.thermophilus1 inhibe St.aureus1, mais elle n'a pas d'effet sur St.aureus2.
- Les 3 souches de streptocoques testées n'ont aucun effet sur les germes Bacillus et St.aureus2.

Pour la lactobacille testé, nous remarquons qu'aucun germe des 6 germes cibles n'a été inhibé par Lb.delbrueckii subsp.bulgaricus.

**Tableau 6 : Résultats du criblage des streptocoques et lactobacille par la méthode des disques :**

Souches à tester / souches cibles	<u>S.salivarius</u> subsp. thermophilus1	<u>S.salivarius</u> subsp. thermophilus2	<u>S.salivarius</u> subsp. thermophilus3	<u>Lb.delbrueckii</u> subsp. bulgaricus
<u>S.aureus1</u>	+	-	-	-
<u>S.aureus2</u>	-	-	-	-
<u>E.coli</u>	+	+	+	-
<u>Pseudomonas</u>	+	+	+	-
<u>Proteus</u>	+	+	+	-
<u>Bacillus</u>	-	-	-	-

- : Résultat négatif, pas de zone d'inhibition.

+ : Résultat positif avec un diamètre moyen de la zone d'inhibition d'environ 10 mm.

### **III-Discussion :**

Le levain utilisé dans la fabrication des yaourts commerciaux est composé de deux souches bien définies : S.salvarius.subsp.thermophilus et Lb.delbrueckii subsp.bulgaricus (Larpent, 1996). Dans le but de sélectionner des souches lactiques des yaourts commerciaux, productrices d'agents antibactériens responsables du phénomène d'antibiose non lié à l'acidifier, ni au peroxyde d'hydrogène, nous avons utilisé deux méthodes : Méthodes des puits et méthodes des disques. L'addition de la catalase et l'ajustement du pH nous a permis de minimiser l'effet de peroxyde d'hydrogène et celui de l'acidité. Ces deux méthodes ont été adoptées nos moyens, très limités, et quelques modifications ont été apportées pour améliorer les techniques.

D'après les résultats de criblage des 3 souches de S.salvarius.subsp.thermophilus et la souche de Lb.delbrueckii.subsp.bulgaricus par la méthode des puits (Tableau N°5), nous constatons que seule la souche isolée du yaourt de la firme Djurdjura achetée le 05-06-2001 exerce une action inhibitrice sur St.aureus1. Les autres souches n'ont pas d'effet contre la totalité des souches cibles.

Selon les résultats du criblage par la méthode des disques (Tableau N°6), nous remarquons que les 3 streptocoques inhibent les germes appartenant au genre Escherichia, Pseudomonas et proteus.

La remarque importante que nous soulignons est que les deux méthodes ne donnent pas les mêmes résultats, en effet les trois streptocoques inhibent E.coli, Pseudomonas et Proteus en utilisant la méthode des disques, par contre elles n'exerce aucun effet vis-à-vis des souches cibles pour la méthode des puits. Avec cette méthode (méthode des puits), nous avons remarqué qu'en réalité, la plupart, des résultats ont été indéterminés suite au développement des souches à tester dans les puits. Cela est dû à une mauvaise séparation des cellules du surnageant, ces résultats se rapprochent de ceux obtenus par MEDJMEDJ et MUSHIMIYIMAVA (1993) qui ont montré que sur 56 souches de bactéries lactiques soumises au criblage, la méthode des puits n'a pas donné des résultats significatifs à cause de la croissance des souches cibles dans les puits.

Enfin la littérature mentionne, la production de bactériocine par les deux genres Streptococcus et Lactobacillus.

**\*Les streptocoques :**

Selon la synthèse des résultats de plusieurs travaux citée par **PIARD et DESMAZEAUD (1992)**, aucun auteur ne mentionne la production de bactériocine par S. salivarius subsp. thermophilus, par contre dans notre cas les 3 souches semblent être Bac<sup>+</sup> contre certaines espèces cela se rassemble avec les résultats de MEDJMEDJ et MUSHIMIYIMANA.

**\*Les lactobacilles :**

D'après nos résultats la seule souche de Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus est supposée non productrice de bactériocine, ceci peut être appuyé par les résultats cités par **PIARD et DESMAZEAUD (1992)**. Ces auteurs rapportent que cette espèce est incapable de produire des substances antibactériennes.

## Conclusion

Le but de ce travail est de sélectionner des souches de bactéries lactiques (levains des yaourts), productrices de bactériocines.

L'objectif assigné à été réalisé par l'isolement de deux souches de S. selivarius subsp. thermophilus et une souche de Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus pour le criblage, nous avons utilisé deux méthodes : méthode des puits et méthode des disques. L'addition de la catalase et l'ajustement du pH (6.5-7) nous a permis de minimiser l'effet de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et celui de l'acidité.

Les résultats du criblage pour la méthode des puits montre que, seul la souche isolée du yaourt Djurdjura acheté le 05/06/2001 exerce une action inhibitrice vis-à-vis St. aureus. En effet le criblage par la méthode des puits donne des résultats indéterminés, cela est du probablement à une mauvaise séparation des cellules du surnageant.

Les résultats du criblage par la méthode des disques montre que, les 3 streptocoques inhibent les germes appartenant à Escherichia, Pseudomonas et Proteus. La seule souche de Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus soumise au criblage n'exerce aucune action inhibitrice vis-à-vis des souches cibles.

Par manque de moyens, nous n'avons pas pu déterminer d'autres critères fondamentaux des bactériocines afin de pouvoir confirmer le caractère bactériocinogène de ces souches.

Ce travail nécessite d'être complété par d'autres travaux visant à mettre en évidence des mécanismes d'inhibition ou mode d'action.

Pour cela, quelques perspectives sont à proposer :

- Confirmer les résultats et élargir la gamme des germes cibles en insistant surtout sur les germes responsables des accidents de fabrication, d'altération des produits ainsi que les germes pathogènes.
- Optimiser la production et la purification de bactériocines.
- Essai d'application des bactériocines pour contrôler des contaminants dans les aliments.

## Références bibliographiques

- 1-ACCOLAS J.P., HEMME D., DESMAZEAUD M.J., VASSAL L., BOUILLANCE C., VEAUX M., 1980 : Les levains lactiques thermophiles : Propriétés et comportement en technologie laitière. *Lait*, LX, 487-524.
- 2-BELIARD E., THAULT D., BOURGEOIS C., 1998 : Propriétés antibactériennes des bactéries lactiques « In-Microbiologie alimentaires BOURGEOIS C.M., LARPENT J.P. Ed. Technique et documentation Lavoisier. Paris, 250.
- 3-BELIARD E., THAULT D., BOURGEOIS C., 1991 : Propriétés inhibitrices des bactéries lactiques application à la conservation des produits carnés. Actes du colloque lactique 91. Centre de publications de l'université de Caen. 205-212.
- 4-DEROISSART H.B., 1986 : Les bactéries lactiques. In-lait et produits laitiers par LUQUET F. M. Ed. Technique et documentation Lavoisier, Paris, T3, 343-407.
- 5-DESMAZEAUD M., 1983 : Comment les bactéries lactiques se comportent-elles dans le lait? *Tech. Laitière*, 976, 11-18.
- 6-GATTEGNO I., 1992 : Salaison : l'enjeu des flores pathogènes *R.I. A* 474, 24-25.
- 7-GIRAFFA G., BOSSI M.G., FORNASARI E., 1989 : Bacteriocin production by Lactobacillus delbrueckii subsp.lactis strains. *Microbiologie-Aliments-Nutrition*, 7, 139-143.
- 8- GIRAFFA G., CARMINATI D., 1991 : Bactériocine ed alteri metaboliti inibitori specifici prodotti dai batteri lattici. *L'industria de latte*, xxvii, n 3-4 fasc.2, 21-44.
- 9-GUIRAUD J.P., 1998 : Microbiologie alimentaire. Ed. DUNOD , Paris, 652.

- 10- GUIRAUD J., GALZY P., 1980 :Analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Ed. De l'usine nouvelle., Paris, 239.
- 11-JACOB F., LWOFF A., SIMNOVITCH A., WOLLMAN E., 1953 : Définition de quelques termes relatifs à la lysogénie. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 84 , 222-224.
- 12-JOERGER C., KLANHAMMER T.R., 1986 : Caractérisation and purification of helveticin and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by Lactobacillus helveticus 481. J.Bacteriol.(167) 2, 439-446.
- 13-JUILLARD V., SPINLER M.J., DESMAZEAUD M.J., BOQUIN C.Y., 1987 : Phénomènes de coopération et d'inhibition entre les bactéries lactiques utilisées en industrie laitière. Lait, (67) 2, 149-172.
- 14-KOZAK W., BARDOWSKI J., BOBRAZANSKI W.T., 1978 : Bactériocines substances antibiotiques produites par les streptocoques lactiques.Congr.Int.Lait, Paris, F, 541-542.
- 15-LARPENT J.P, 1996 : Les bactéries lactiques.In. Microbiologie alimentaire (Aliments fermentés et fermentations alimentaires) par BOURGEOIS C.M., LARPENT J.P. T 2.Ed.2, 5-30.
- 16-LARPENT J.P., 1997 :Microbiologie alimentaire : Techniques de laboratoire.Ed.Technique et documentation.Lavoisier, Paris, p 1073.
- 17-LECLERC H., 1995 : la bactérie et le monde bactérien.In.Microbiologie générale par LELCLERC H., GAILLARD J.L., SIMONET M., Ed.DOIN.
- 18-LEVEAU J.Y, BOUIX M., 1980 : Technique d'analyse et de contrôle dans les industries Agro-Alimentaires.In-Analyse microbiologique, 3.La flore lactique par BOURGEOIS C.M., LEVEAU J.Y.Ed.technique et documentation LAVOISIER APRIA. Paris, 331.



- 19-MATHOT E., BELIARD E., THAULT D., 1996. Propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques. In. Microbiologie alimentaire (aliments fermentés et fermentations alimentaires) par BOURGEOIS C.M., LARPENT J.P., T 2. Ed. 2, 433-447.
- 20-NOVEL G., 1992. Les bactéries lactiques. In. Microbiologie industrielle, (les micro-organismes d'intérêt industriel) par LEVEAU I.Y., BOUÏX M., Ed. Technique et documentation, Lavoisier, 171-191.
- 21-PIARD J.C., DELMORE F., GIRAFFA G., COMMISSAIRE J., DESMAZEAUD M., 1990 : Evidence for a bacteriocin produced by Lactococcus lactis CNRZ 481. J. Neth Milk Dairy, 44, 143-158.
- 22-PIARD J.C., DESMAZEAUD M., 1992 : Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. Bacteriocins and others antimicrobial substances. Lait 72, 113-142.
- 23-PILET M.F., MAGRAS C., FEDERIGHI M., 1998 : Bactéries lactiques. In. Manuel de bactériologie alimentaire par SUTRA L., FEDERIGHI M., JOUVE J.L. Ed. polytechnica., Paris , 236-259.
- 24-REKHIF N., 1990 : Sélection de bactéries lactiques productrices de laboratoires. Diplôme d'étude approfondies, ENSAIA. Institut Polytechnique Lorraine, Nancy, FRANCE, 45.
- 25-SEROT T., DOUSSET X., ZUCCA J., TORCATIS N., 1990 : Mise en évidence et purification partielle de substances antibactériennes produites par Leuconostoc mesenteroides et Lactobacillus plantarum isolés de grains de kefir, 8, 177-184.
- 26-TAGG J.R., DAJANI A.S., WANNAMAKER L.W., 1976 : Bactériocines of Gram-positive bacteria. Bacteriol. review. 40., 722-756.
- 27-VENEMA G., POOLMAN B., WOUTERS J.T.M., 1990 : Fefs microbiology reviews, (87) 1+ 2, 84.

**Internet :**

28-BERTRAND, NICOLAS, LACROIX, CHRISTOPHE, 1998. Congrès ACFAS (Communication présentée au congrès).

<http://www.members.AOL.com / Lmorcroth /CV/ quant.htm>.

29-DESMAZEAUD, '2001 : les bactéries lactiques dans l'alimentation (Utilisation et innocuité). Agriculture, 5-96.

<http://www.aupelf.fr / revues / agir / 5.96 / dos.htm>.

30-DE VUYST L., DE PORTER G., VADAMME E.J., 1989 : Nutritional and metabolic regulation of the nisin fermentation process. Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent, 54, 4b, 1501-1506.

<http://www.cbb.developpement.com / 00/ 20 / 2053.htm>.

31-KERJEAN J.R., 1998 : Inhibition de la fermentation butyrique par des lactobacilles mésophiles Parlons technologies, III, publication ITG, 9-11. Lait / 20-91.

<http://www.inra.fr / CRIAA / flair-flow / fiches / 1999 / 301.htm>.

32-RICHOUX R., 1998 : Bactériocine, une synthèse. Lait / 33-92.

<http://www.cbb.developpement.com /00/16/1657.htm>.

## Annexes

**-BGT (Bouillon Glucosé Tamponé) (LAPENT, 1997)**

Peptone.....	20g
Extrait de viande.....	0.2g
Chlorure de sodium.....	2.5g
Dihydrogénophosphate de potassium.....	0.7g
Hydrogénophosphate dipotassique.....	8.3g
Glucose.....	04g
pH 7.6 - 7.8	

**-Bouillon Nutritif (Guiraud, 1998)**

Peptone.....	10g
Extrait de viande.....	50g
Chlorure de sodium (Facultatif selon la formule).....	5g
pH 7.2	
autoclave 20 mn à 120C°	

**-CHAPMAN (Guiraud, 1998)**

Extrait de viande.....	1g
Peptone.....	10g
Chlorure de sodium.....	5g
Mannitol.....	10g
Rouge de phénol.....	25g
Gelose.....	15g
pH 7.4	

**-M17 (Guiraud, 1998)**

Peptone de soja.....	5g
Peptone de viande.....	2.5g
Peptone de caseine.....	2.5g
Extrait de levure.....	2.5g
Extrait de viande.....	5g
Lactose.....	5g
Acide ascorbique.....	0.5g
Glycérophosphate de sodium.....	0.5g
Sulfate de magnésium.....	19g
Agar-Agar.....	0.25g
pH 7.1 - 7.2	
Autoclave 20 mn à 120C°	

**-Gélose Nutritive (LARPENT, 1997)**

Peptone.....	10g
Extrait de viande.....	5g
Chlorure de sodium.....	5g
Gélose.....	15g
pH 7.2	

**-MRS (GUIRAUD, 1998)**

Peptone.....	10g
Extrait de viande.....	10g
Extrait de levure.....	5g
Glucose.....	20g
Tween 80 (polysorbate 80).....	1ml
Phosphate dipotassique.....	2g
Acétate de sodium.....	5g
Citrate d'ammonium.....	2g
Sulfate de magnésium.....	200mg
Sulfate de manganèse.....	50mg
pH 6.5	

Autoclave 15 mn à 120°C pour MRS gélose on ajoute 12g d'agar-agar

**Coloration de Gram (LARPENT, 1997)**

-Quelques gouttes de violet de gentiane sont déposées sur le frottis fixé pendant 1 mn. Le frottis est alors recouvert de lugol après on lave.

La lame est ensuite décolorée à l'alcool absolu goutte à goutte en l'inclinant au-dessus de levier jusqu'à ce que l'alcool ajouté n'ait plus d'action décolorante.

Après lavage à l'eau du robinet le frottis est re-coloré à la fuschine pendant 1 mn puis lavé à l'eau, séché et examiné à l'immersion.

Noms et prénoms :

Rechak Lydia

Haine Warda

Encadré par :

HAMAMES Nour-Eddine

**Titre : Contribution à l'étude de la production des bactériocines par quelques souches de bactéries lactiques isolées des yaourts.**

Nature du diplôme : D.E.S

**Résumé :**

Le but de notre travail est d'étudier la possibilité de la production de bactériocines par les deux souches utilisées comme levain dans la fermentation des yaourts.

Trois souches de S.salivarius subsp.thermophilus et une souche de Lb.delbrueckii subsp.bulgaricus ont été isolées de quatre boites de yaourt.

L'inhibition vis-à-vis des souches cibles a été étudiée par deux méthodes :

**Méthode de puits :** seul une souche de S.salivarius subsp.thermophilus isolée d'un yaourt Djurdjura acheté le (05-06-2001) inhibe St.aureus1.

**Méthode des disques :** les trois souches de S.salivarius subsp.thermophilus inhibent les espèces appartenant aux germes Proteus, Pseudomonas et Escherichia, alors que le de Lb.delbrueckii subsp.bulgaricus n'exerce aucun effet inhibiteur vis-à-vis des souches cibles.

La différence entre les résultats obtenus par les deux méthodes s'explique probablement par une mauvaise séparation des cellules du surnageant.

**المخلص :**

الهدف من عملنا هو دراسة إمكانية إنتاج القاتلات البكتيرية من طرف السلالات المستعملة كمخمر في إنتاج الياؤورت.

ثلاث سلالات من S.salivarius subsp.thermophilus و سلالة من Lb.delbrueckii subsp. bulgaricus قد عزلت من أربعة علب من الياؤورت.

إن التضييق اتجاه السلالات الهدف قد درس بطريقتين :

طريقة الحفر: واحدة فقط من سلالة S.salivarius subsp.thermophilus عزلت من ياؤورت جرجرة المشتراة في 2001/06/05 تضبط St.aureus1.

طريقة الأقراص: الثلاث سلالات من S.salivarius subsp.thermophilus تضبط الأنواع التابعة للأجناس Proteus, Pseudomonas و Escherichia بينما سلالة Lb.delbrueckii subsp.bulgaricus لا تمارس أي تأثير تضييقي اتجاه أي سلالة هدف.

إن الفرق بين النتائج المتحصل عليها بالطريقتين يحتمل تفسيره بسوء فصل للخلايا من الطافي.

**Summary :**

The aim from our work is to study the possibility of bacteriocins production by two strains used as the leaven in yaourts fermentation.

Tree strains of S.salivarius subsp.thermophilus and one strain of Lb.delbrueckii subsp.bulgaricus have been isolated from the forth yaourt-can.

Inhibition towards strains target was studied by two methods :

**-Pits methods :** only one strains of S.salivarius subsp.thermophilus isolated from Djurdjura yaourt bought (05/06/2001) inhibited St.aureus1.

**-Disks methods :** the three strains of S.salivarius subsp.thermophilus inhibited species belonging to Proteus, Pseudomonas and Escherichia germs. Whereas the Lb.delbrueckii subsp.bulgaricus strains have any inhibitory effect toward target strains.

The difference between the result obtains by the two methods can be explained by the bad separation of float cells.

**Mots clés :** Bactéries lactiques – bactériocines – S.salivarius subsp.thermophilus – Lb.delbrueckii subsp.bulgaricus - yaourt .