



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

**Département :** Microbiologie

قسم: ميكروبيولوجيا

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master**

**Domaine :** Sciences de la Nature et de la Vie

**Filière :** Sciences Biologiques

**Spécialité :** Microbiologie générale et biologie moléculaire des microorganismes

## **Intitulé:**

---

**ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE DE BACTERIES LACTIQUES  
ISOLÉES A PARTIR D'UN PRODUIT LAITIER FERMENTÉ :  
LE YAOURT BRASSÉ.**

---

**Présenté et soutenu par :**

- BOUDERSA Wided,
- NEKKA Randa

**Le : 14.06.2017**

**Jury d'évaluation :**

**Présidente du jury :** ABDELAZIZ W. (MA. Université des frères Mentouri Constantine)

**Rapporteur :** BOULTIFAT L. (MA. Université des frères Mentouri Constantine)

**Examinatrice :** MEZIANI M. (MA. Université des frères Mentouri Constantine)

*Année universitaire  
2016 - 2017*

## *Remerciements*

Au début et avant tout, nos remerciements et louanges à Dieu le tout puissant, de nous avoir donné le courage et la santé pour finaliser ce travail

Nous remercions notre promoteur Mme **BOULTIFAT.L** maître assistante à la faculté des sciences de la Nature et de la vie de l'université des Frères Mentouri Constantine, pour ses encouragements, ses conseils, sa disponibilité et surtout pour sa patience durant la correction de ce mémoire.

Nous tenons à remercier profondément Mlle **ABEDELAZIZ.W** maître assistante à l'université des Frères Mentouri Constantine, d'avoir accepté de présider notre jury.

Nous remercions également Mlle **MEZIANI.M** maître assistante à l'université des Frères Mentouri Constantine, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

## *Dédicace*

*Avant tous, Mes profonds remerciements s'adressent à ALLAH qui m'a aidé et donné le courage et la patience pour effectuer ce travail.*

*Je dédie ce modeste travail à :*

*Mes très chers parents qui ont été toujours à mes cotés, pour leur générosité leurs sacrifices et le courage qu'ils m'ont donné pour terminer mes études.*

*Grand merci  
Je vous aime beaucoup.*

*A toutes mes sœurs.*

*A tous mes collègues d'études surtout : Ramla, Bouchra, Meriem et Rokia (Allah la préserve).*

*A tous ceux que je porte dans mon coeur.*

*Wided*

## **Dédicace**

Je dédie ce modeste travail :

A mes très chers parents en témoignage de ma connaissance pour leur patience, leur sacrifice et leur soutien toute au long de mes études. Ma vie entière serait insuffisante pour vous exprimer ma profonde gratitude. Que

Dieu vous bénisse et vous protège.

Merci beaucoup Papa et Maman je vous aime beaucoup.

A ma sœur Asma mon âme sœur, merci pour ton soutien indéfectible.

A mes très chères amies : Wided et Ramela.

A tous mes collègues et mes camarades.

A tous ceux que je porte dans mon cœur.

**Randa**

# Table des matières

Introduction.....	01
-------------------	----

## I. Synthèse bibliographique

### Chapitre1 : Généralités sur les bactéries lactiques.

1. Historique et découvert des bactéries lactiques.....	03
2. Définition et caractères générales.....	03
3. Habitat et origine.....	04
4. Classification et critères de la classification.....	04
4.1. <i>Lactococcus et Streptococcus</i> .....	05
4.2. <i>Enterococcus et Vagococcus</i> .....	06
4.3. <i>Leuconostoc, Oenococcus et Weissella</i> .....	06
4.4. <i>Lactobacillus</i> .....	06
4.5. <i>Pediococcus, Tetragenococcus et Aerococcus</i> .....	07
4.6. <i>Carnobacterium</i> .....	07
4.7. <i>Bifidobacterium</i> .....	07
5. Métabolisme.....	09
5.1. Métabolisme des carbohydrates.....	09
5.1.1. La voie homofermentaire.....	09
5.1.2. La voie hétérofermentaire.....	09

5.1.3. Le métabolisme des bifides.....	11
5.2. La voie du citrate.....	11

**Chapitre2:Utilisation agro-alimentaire des bactéries lactiques.**

1. Définitions des produits laitiers fermentés.....	14
1.1. Le yaourt.....	14
1.1.1. Historique et définition du yaourt.....	14
1.1.2. Types de yaourt.....	15
2. Les levains ou ferments lactique dan l’industrie laitière.....	15
3. Critères de choix des ferments dans l’industrie laitière.....	16
4. Procédé de fabrication des ferments lactiques.....	16
5. Interaction entre les bactéries lactiques.....	18
5.1. Les interactions positives.....	19
5.2. Les interactions négatives.....	19
6. L’intérêt des bactéries lactiques du yaourt.....	19

**Chapitre3: L’activité antibactérienne des bactéries lactiques.**

1-Propriétés inhibitrice des bactéries lactiques.....	21
1.1. La compétition nutritionnelle et pour l’espace.....	21
1.2. La production des métabolites antimicrobiens.....	21

1.2.1. Les métabolites antimicrobiens non peptidiques .....	23
1.2.2. Les métabolites antimicrobiens peptidiques.....	24
Bactériocine.....	24
a. Classification des bactériocines.....	26
b. Les mécanismes d'action des bactériocines .....	28
c . Les propriétés des bactériocines pour une application alimentaire.....	28
d. Applications des bactériocines dans l'industrie alimentaire .....	28

## II. Matériel et Méthode.

1. Présentation du lieu de travail.....	31
2. Matériel.....	31
2.1. Matériel biologique.....	31
2.1.1. Le yaourt.....	31
2.1.2. Les souches pathogènes.....	31
3. Méthodes.....	32
3.1. Traitement des échantillons .....	32
3.1.1. Préparation de la solution mère .....	32
3.1.2. Préparation des dilutions décimales .....	32
3.2. Isolement et purification des bactéries lactiques.....	32
3.3. Identification des bactéries lactiques.....	32
3.3.1. Examen macroscopique.....	32

3.3.2. Examen microscopique.....	33
3.4. Les tests biochimiques.....	33
3.4.1. Croissance à différentes températures.....	33
3.4.2. Croissance sur milieu hyper salé.....	33
3.4.3. Recherche de la catalase.....	33
3.4.4. Recherche de l'oxydase.....	34
3.5. Test de la fermentation des sucres.....	34
3.5.1. Utilisation du Mannitol.....	34
3.5.2. Utilisation des sucres : Glucose, lactose, saccharose.....	35
3.6. Test de production d'acétoïne.....	35
3.7. Test de mise en évidence de l'arginine dihydrolase (ADH).....	35
3.8. Etude du pouvoir antimicrobien.....	36
3.9. Conservation des souches.....	36

### III. Résultat et discussion.

1. Résultats.....	38
1.1. Isolement des bactéries lactiques.....	38
1.2. Identification des souches lactiques.....	38
1.2.1. Caractères morphologiques.....	38
1.2.2. Caractères biochimiques.....	40
1.3. Activité antibactériennes des isolats lactiques.....	40

<b>2. Discussion.....</b>	<b>42</b>
<b>2.1. Identification des souches lactiques.....</b>	<b>42</b>
<b>2.2. Activité antibactérienne des isolats lactiques.....</b>	<b>42</b>
<b>VI. Conclusion et perspectives.....</b>	<b>44</b>
<b>Références bibliographique.....</b>	<b>45</b>

**Annexes.**

**Résumé**

**Summary**

**ملخص**

## *Liste des abréviations*

**%** : pourcentage

**ADH** : Arginine dihydrolase

**ADN** : Acide DésoxyriboNucléique

**ARN** : Acide Ribonucléique

**°C**: Degré Celsius

**CL** : Coques lactiques

**cm** : centimètre

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

**FAO/OMS**: Food and Agriculture Organization /Organisation Mondiale de la Santé

**GN** : gélose nutritive

**g** : gramme

**GRAS** : Generally recognized as safe

**h**: heure

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : l'eau oxygénée

**KDa** : kilo dalton

**LAB** : Bactéries lactiques

**BL** : Bacilles lactiques

**min**: minute

**ml**: millilitre

**mm**: millimètre

**Mpb** : Méga paire de base

**MRS** : Milieu de Man Rogosa Sharpe

**NaCl**: chlorure de sodium

**NAD** : nicotinamide-adénine-dinucléotide

**NADH** : Nicotinamide adénine dinucléotide d'hydrogène

**NaOH**: Hydroxyde de sodium (soude)

**OMS** : organisation mondiale de la santé

**pH**: potentiel Hydrogène

**ssp/ subsp** : sous-espèce

**T°**: Température

**VP** : VogesProskauer

**UFC/ml** : Unité formant colonie par millilitre

**Zi** : Zone d'inhibition

## *Liste des Figures*

<b>Figure 1.</b> La fermentation du lactose chez les bactéries lactiques : voies Homofermentaire et Hétérofermentaire.....	<b>8</b>
<b>Figure 2.</b> Dégradation des hexoses par la voie du fructose 6-phosphate phosphocétolase.....	<b>10</b>
<b>Figure 3.</b> Le métabolisme du citrate chez les bactéries lactiques .....	<b>12</b>
<b>Figure 4.</b> Séquence et structure de lantibiotiques de type A (Nisine), et d'un lantibiotique « two-peptides » (Lacticine 3147 A1 et A2).....	<b>25</b>
<b>Figure 5.</b> Aspect macroscopique des souches lactiques isolées sur milieu M17.....	<b>37</b>
<b>Figure 6.</b> Aspect microscopique des souches isolées sur milieu M17, après coloration de Gram (Grossissement x100).....	<b>37</b>
<b>Figure 7.</b> Aspect macroscopique des souches lactiques isolées sur milieu MRS.....	<b>37</b>
<b>Figure 8.</b> Aspect microscopique des souches lactiques isolées sur milieu MRS après coloration de Gram (Grossissement x100).....	<b>37</b>
<b>Figure 9.</b> Diamètres moyens (mm) des zones d'inhibitions (Zi), des isolats lactiques vis-à-vis des souches pathogènes. ....	<b>41</b>

## *Liste des Tableaux*

<b>Tableau 1.</b> Teneur moyenne du yaourt pour 100g de produit.....	<b>13</b>
<b>Tableau 2.</b> Métabolites antimicrobiens de faible masse molaire secrétés par les bactéries lactiques autres que les bactériocines.....	<b>22</b>
<b>Tableau 3.</b> Le code des souches isolées.....	<b>38</b>
<b>Tableau 4.</b> Caractères phénotypiques des souches lactique isolées.....	<b>39</b>
<b>Tableau 5.</b> Les diamètres des zones d'inhibitions des souches lactiques vis-à-vis des souches pathogènes.....	<b>41</b>

# Introduction

Le yaourt est un écosystème naturel défini comme un lait fermenté, issu de la transformation du lait par deux bactéries lactiques : *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*. Il est l'un des produits laitiers le plus consommable en raison de son importance nutritionnelle, il a été identifié pendant longtemps en tant que nourriture saine due à l'action bénéfique de ses bactéries vivantes (Kiemptore, 2013 ; Paci Kora, 2004).

Les bactéries lactiques constituent un vaste groupe dont la taxonomie est régulièrement remise à jour avec la progression des données moléculaires (Federighi, 2005). Elles regroupent un ensemble d'espèces hétérogènes dont le trait commun est la production d'acide lactique. Elles appartiennent à divers genres comme *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Vagococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus* et *Carnobacterium*.

Elles interviennent dans l'industrie laitière et dans la fermentation de nombreux autres produits alimentaires, en contribuant à la texture, à la saveur des aliments, à la production de composés aromatiques (Tabak et Bensoltan, 2011) et en assurant une bonne sécurité alimentaire. Cette sécurité est favorisée par la production d'acides organiques (acides lactiques et acétiques) qui font baisser le pH dans le milieu (Bekhouche et Boulahrouf, 2005), le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyl et les bactériocines limitant la croissance de certains germes pathogènes (Dortu et Thonart, 2009).

Les bactériocines, sont des substances protéiques produites puis excrétées à l'extérieur des cellules productrices, présentant une activité bactéricide ou bactériostatique à l'encontre d'un grand nombre de germes d'altérations. Leur spectre d'activité peut être plus ou moins large, quelque fois limité aux espèces proches phylogénétiquement des bactéries productrices. (Allouche, 2010). Ces substances naturelles pourraient être utilisées comme agent de conservation sous forme d'additif, soit d'inoculum bactérien producteur de bactériocines au cours du processus de fabrication, permettant ainsi de diminuer le nombre d'intoxications alimentaires et d'augmenter la durée de conservation et de commercialisation des aliments (Allouche, 2010).

Dans ce contexte, les objectifs assignés à notre travail consistent à réaliser:

- ✓ L'isolement, la purification et la caractérisation phénotypique des bactéries lactiques à partir d'un lait fermenté local, le yaourt du groupe « SOUMMAM » ;
- ✓ La mise en évidence de l'activité inhibitrice, des bactéries lactiques isolées à l'égard de certains germes d'altération, qui posent des problèmes majeurs dans l'industrie agro-alimentaire.

# Synthèse bibliographique

**Chapitre I:**  
Généralités sur  
les bactéries lactiques

## **1. Historique et découverte des bactéries lactiques**

Les bactéries lactiques sont de très anciens micro-organismes dont les ancêtres ont pu voir le jour il y a trois milliards d'années (avant les Cyanobactéries). Elles ont été utilisées pour la fermentation des aliments depuis plus de 4000 ans, sans pour autant comprendre la base scientifique de leur utilisation, mais tout en essayant de produire des aliments de meilleure conservation et de meilleure qualité (Sallofr, 1994 ; Drider et Prevost, 2009). Ce n'est qu'à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, époque des grandes découvertes de la microbiologie, que certaines chercheurs ont isolés un streptocoque (Hadeff, 2012).

## **2. Définition et caractères généraux**

Les bactéries lactiques constituent l'un des groupes incontournables de la microbiologie alimentaire (Drider et Prevost, 2009). Elles regroupent plusieurs genres dont le caractère commun est la production de l'acide lactique suite à la fermentation de glucides (Leonard, 2013) et présentent les caractéristiques suivantes :

- Bactéries à Gram positif, immobiles, asporulées, catalase et oxydase négatives, nitrate réductase négative, anaérobies ou aérotolesérantes (Mameche, 2008).
- Elles ont une forme sphérique, allongés ou des bâtonnets (Mameche, 2008).
- Elles sont exigeantes sur le plan nutritionnel, en ce qui concerne les vitamines (vitamine B), les acides aminés, les acides gras et les glucides (Mameche, 2008).
- Toutes les bactéries lactiques ont un métabolisme fermentaire qui repose dans sa grande partie sur l'utilisation des glucides, car en les utilisant elles peuvent produire soit de l'acide lactique exclusivement (homolactique stricte), ou de l'acide lactique et de l'acide acétique (hétérolactique facultatives), ou bien l'acide lactique, l'acide acétique, l'éthanol et le CO<sub>2</sub> (hétérolactique strictes) (Hassaine, 2013).
- Elles sont généralement mésophiles, certaines sont psychrotolérantes ou thermotolérantes (Baliarda, 2003).
- Elles se développent majoritairement à pH compris entre 4 et 4,5 et certaines sont même actives à pH = 9,6 ou 3,2 (Baliarda, 2003).
- Leur ADN présente un pourcentage de G+C compris entre 30 et 60% et une taille de génome comprise entre 1,8 et 3,3 Mpb (Makhloufi, 2012).
- Les bactéries lactiques utilisées dans l'alimentation sont considérées comme non pathogènes et se font attribuer le qualificatif anglo-saxon d'organismes GRAS

(Generally Regarded As Safe) (Adams et Marteau, 1995 ; Aguirre et Collins, 1993). Cependant, certaines espèces du genre *Streptococcus* et *Enterococcus* sont considérées comme des pathogènes opportunistes (Makhloufi, 2012).

### **3. Habitat et origine**

Les bactéries lactiques sont ubiquistes et on les trouve dans différentes niches écologiques (Mechai, 2009). Elles sont présentes à l'état libre dans l'environnement ou vivent en association avec un hôte, tel que l'Homme ou l'animal, dans un écosystème bactérien comme le tractus gastro-intestinal ou génital des mammifères (Makhloufi, 2012).

Par exemple, dans l'environnement, les bactéries lactiques sont souvent retrouvées dans le lait et ses dérivés (lait fermenté, fromages,...) (Makhloufi, 2012). Aussi, elles peuvent vivre en symbiose entre elles et avec un hôte. Le tractus gastro-intestinal des mammifères est colonisé par des bactéries lactiques telles que les genres *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, et *Weisseilla*. Par ailleurs, l'appareil génital chez la femme est principalement colonisé par des bactéries lactiques, telles que *Lactobacillus*, auxquelles il apporte des nutriments comme le glycogène. En acidifiant le milieu, ces bactéries apportent une protection contre des pathogènes responsables d'infections vaginales comme *Trichomonas vaginalis* pathogène responsable de la trichomonas vaginale (Bjorkroth et Holzapfel, 2006, Ruiz et al, 2009) et/ ou *Candida albicans* à l'origine de la vulvo-vaginite (Makhloufi, 2012).

### **4. Classification et critères de la classification**

Le groupe des bactéries lactiques a été défini par Orla-Jensen en 1919. Actuellement et suite à plusieurs révisions taxonomiques, ce groupe compte plusieurs genres qui appartiennent tous au phylum *Fermicute* (Leonard, 2013).

La taxonomie des bactéries lactiques repose sur l'approche classique ou bien l'identification phénotypique (morphologique, biochimique et physiologique). Cette identification a été élargie pour inclure des marqueurs chimiotaxonomiques (acides gras cellulaire), analyse des protéines totales de la cellule et autre composants cellulaires. Néanmoins, ces méthodes conventionnelles ont leurs limites, notamment dans le cas de variations du phénotype par la présence ou l'absence d'un plasmide codant pour des fonctions

métaboliques. Par conséquent, la classification moderne est basée sur les approches moléculaires, qui s'appuient sur des tests génotypiques telles que le séquençage de l'ARN16S, ribotypage et d'autres méthodes de typage basées sur l'ADN. Ces techniques moléculaires permettent une meilleure différenciation des microorganismes à différents niveaux (Hassaine, 2013).

Les bactéries lactiques sont classées dans le Phylum : *Fermicute*, la Classe : *Bacilli* et sont divisées en quatre familles (Madigan et Martinko, 2007) :

- *Lactobacillaceae*.
- *Enterococcaceae*.
- *Leuconostocaceae*.
- *Streptococcaceae*.

Ces familles regroupent les principaux genres de bactéries lactiques en fonction de leur parenté phylogénétique. Il s'agit des genres : *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Carnobacterium*, *Vagococcus*, *Aerococcus* et *Bifidobacterium* (bifidum considérés souvent comme de véritables bactéries lactiques, ils sont liés au phylum *Actinobacteria* (Federighi, 2005).

#### **4.1. *Lactococcus* et *Streptococcus***

Le genre *Lactococcus* (streptocoque du groupe N) représente les streptocoques dits « Lactiques » car ils sont associés à de nombreuses fermentations alimentaires et ne possèdent aucun caractère pathogène (Federighi, 2005).

Le genre *Streptococcus* est toujours vaste et sa classification est très mouvementée. Ce genre est généralement divisé en trois groupes : pyogène (la plus part des espèces sont pathogènes et hémolytiques), oral (tel que *St. salivarius*, *St. bovis*) et les autres streptocoques qui sont rencontrés dans les aliments tel que l'espèce *Streptococcus thermophilus* qui se différencie par son habitat (produit laitiers) et son caractère non pathogène (Federighi, 2005). Ces genres partagent les caractères suivants: anaérobies facultatifs, chimioorganotrophes, homofermentaire, catalase négative, leur température de croissance est située entre 25 et 45°C (Holt et al, 1994).

#### **4.2. *Enterococcus* et *Vagococcus***

Les entérocoques sont des coques homofermentaires, généralement différenciés par la fermentation de l'arabinose et le sorbitol, se développent à 10°C et 45°C, avec un optimum à 37°C, à pH= 4.2- 4.6 et aussi à pH 9.6 à 6.5% NaCl (Bergey's manual, 1994).

Certaines espèces des genres *Streptococcus* et *Lactococcus* isolées de poisson et d'eau douce, qui possèdent la propriété d'être mobiles sont classées dans le nouveau genre *Vagococcus* (Federighi, 2005).

#### **4.3. *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella***

Les bactéries du genre *Leuconostoc* sont des bactéries lactiques mésophiles et hétérofermentaires. Ce sont des cocci ovoïdes ou sphériques, à Gram positif, catalase négative et anaérobies facultatives (Savadogo et Traore, 2011).

Le genre *Weissella* est constitué de coccobacilles ou de coques ovoïdes, se présentant de manière isolés ou regroupés en deux ou en courte chaînes, non sporulés, immobiles, catalase négative (Mechai, 2009).

L'espèce *Leuconostoc oenos* a été renommée *Oenococcus oeni* et certains lactobacilles hétérofermentaires ont été regroupés avec *Leuconostoc paramesenteroides* dans le nouveau genre *Weissella* (Federighi, 2005).

#### **4.4. *Lactobacillus***

Les lactobacilles sont présents naturellement dans la nature et sont rarement pathogènes. Ce sont des cellules allongées, régulières en forme de bâtonnets ou coccobacilles isolés ou en chaînettes, de taille variable, asporogènes, immobiles ou mobiles grâce à des flagelles péritriches, microaérophiles ou anaérobies. Leurs exigences nutritionnelles sont complexes, leurs températures de croissance est de 2 à 53 °C, le pH optimal de croissance est compris entre 5,5 et 6,2. Leurs pourcentages en GC sont de 36 à 47% (Kouakou et Thonart ,2011; Guiraud, 2003). Leur mode de fermentation donne lieu à une classification répartie en trois groupes distincts:

- **Le groupe I:** regroupe les lactobacilles homofermentaires stricts qui ne fermentent que les hexoses produisant le lactate.

-**Le 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.

- **Le groupe III:** regroupe les lactobacilles hétérofermentaires stricts qui fermentent les hexoses en lactate, acétate (ou éthanol) et CO<sub>2</sub> (Kouakou et Thonart, 2011).

#### **4.5. *Pediococcus*, *Tetragenococcus* et *Aerococcus***

Les *Pediococcus* sont des germes microaérophiles, à besoins nutritifs complexes, de nombreuses espèces sont acidophiles et osmophiles, leur fermentation homolactique donne parfois de l'acide lactique racémique mais fréquemment la forme L prédomine. Ils sont des saprophytes et contaminent les produits végétaux. Ils sont parfois utilisés comme levains lactiques pour les charcuteries (Guiraud et Rosec, 2004).

Les genres *Tetragenococcus* et *Aerococcus* sont issus du genre *Pediococcus* dont ils forment des lignées phylogénétiques distinctes (Collins et al., 1990; Matamoros, 2008).

*Tetragenococcus* sont immobiles, sphériques ou ovoïdes avec un diamètre de 0.5-1.0 µm formant des tétrades, ou en paires, homofermentaires. Ils sont incapables d'hydrolyser l'arginine, leur température optimale de croissance se situe entre 25°C et 35°C et ne peuvent pas croître à 10°C et à 45°C (Benguella, 2015).

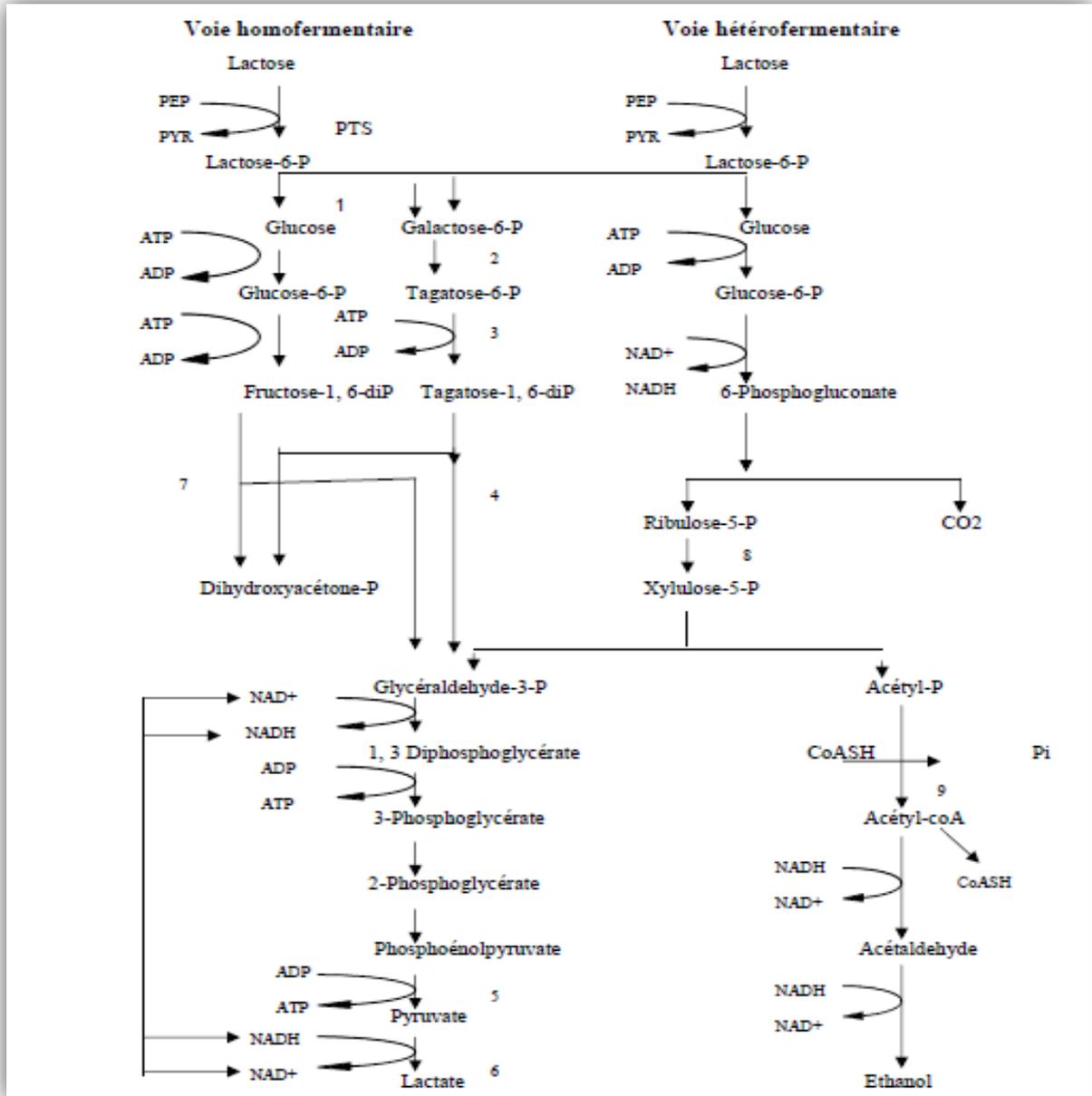
Le genre *Aerococcus* regroupe des espèces de forme ovoïde (1-2µm de diamètre), α-hémolytiques, non-gazogènes, arginine(-), pouvant croître à une concentration de 6.5% de NaCl (Benguella, 2015).

#### **4.6. *Carnobacterium***

Les *Carnobacterium* sont décrits comme des alcalophiles, catalase négative, oxydase négative, psychrophiles, anaérobies facultatives (Corrieu et Luquet, 2008).

#### **4.7. *Bifidobacterium***

Le genre *Bifidobacterium* est probablement le genre le plus étudié de la famille des *Bifidobacteriaceae*. Ce sont des bactéries Gram positives, anaérobies, hétérofermentaires,



**Figure 1 :** La fermentation du lactose chez les bactéries lactiques : voies Homofermentaire et Hétérofermentaire (Leveau et Bouix, 1993 ; Bekhouche, 2006).

1 : phospho-β-galactosidase ; 2 : tagatose-6-phosphate Isomérase ; 3 : tagatose-6-phosphate Kinase ; 4 : tagatose-1,6-diphosphate aldolase ; 5 : pyruvate Kinase ; 6 : lactate déshydrogénase ; 7 : fructose-1,6-diphosphate aldolase ; 8 : pentose-5-phosphate cétolase ; 9 : éthanol déshydrogénase.

immobiles, non-sporulantes en forme de bâtonnet. En raison de leurs capacités métaboliques, les bifidobactéries sont souvent incluses dans la famille des bactéries lactiques (LAB), même si elles sont phylogénétiquement distinctes avec une teneur en G+C allant de 42% à 67% (Savado et Traore, 2011).

## 5. Métabolisme

### 5.1. Métabolisme des carbohydrates

La fermentation est un processus produisant de l'énergie par oxydation de composés organiques (principalement des glucides). Toutes les bactéries lactiques ont un métabolisme fermentaire qui repose dans sa grande partie sur l'utilisation des glucides (lactose, glucose, fructose et saccharose). Selon leur métabolisme, les bactéries lactiques sont homofermentaires ou hétérofermentaires (Figure 1) (Leonard, 2010; Hassaine, 2013).

#### 5.1.1. La voie homofermentaire

La voie homofermentaire emprunte le glucose dans sa totalité (glucose-6 P) jusqu'au pyruvate. Elle est généralement associée aux bactéries des genres *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* et *Lactobacillus*. La glycolyse conduit, en condition optimale de croissance à la production de deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP (Drider et Prevost, 2009).

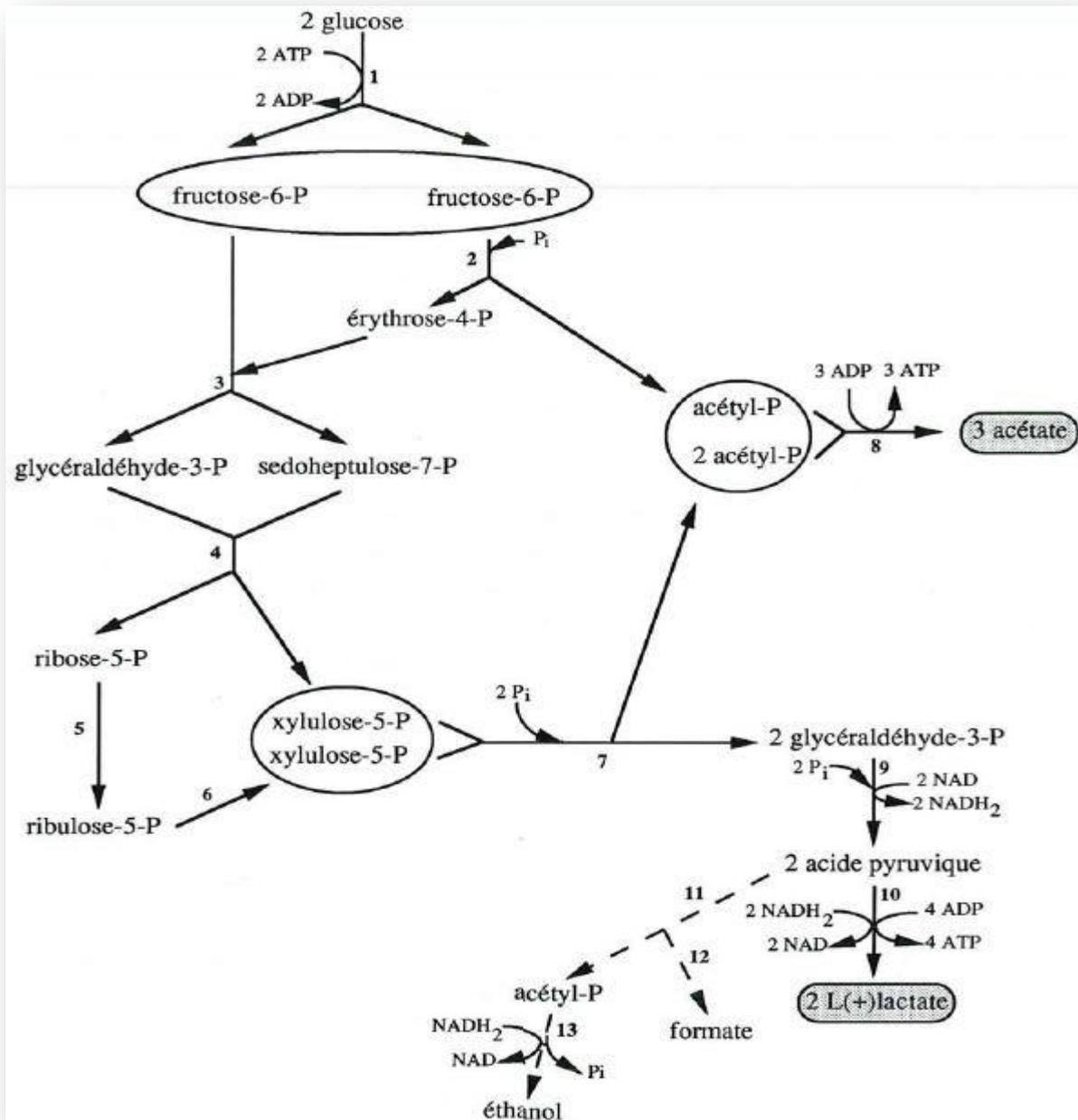


#### 5.1.2. La voie hétérofermentaire

Certaines bactéries lactiques des genres *Leuconostoc* et *Lactobacillus* sont dépourvues d'une enzyme le fructose-1.6biphosphate aldolase (FBA aldolase) et d'un système de transport phosphotransférerase (PTS). Donc ces bactéries fermentent le glucose en produisant le lactate, l'éthanol, le CO<sub>2</sub> et un ATP.



(Hétérofermentation) (Hadef, 2012; Drider et Prevost, 2009).



**Figure 2:** Dégradation des hexoses par la voie du fructose 6-phosphate phosphocétolase (Scardovi, 1965).

1 : hexokinase et glucose-6-phosphate isomérase; 2 : fructose-6-phosphate phosphocétolase ; 3 :transaldolase; 4 : transcétolase ; 5 : ribose-5-phosphate isomérase; 6: ribulose-5-phosphate 3-épimérase; 7 : xylulose-5-phosphate phosphocétolase; 8 : acétate kinase; 9 : enzymes de la voie homofermentaire; 10 : L(+) lactate déshydrogénase; 11 : enzyme phosphoroclastique ; 12: formate déshydrogénase ; 13 : alcool déshydrogénase.

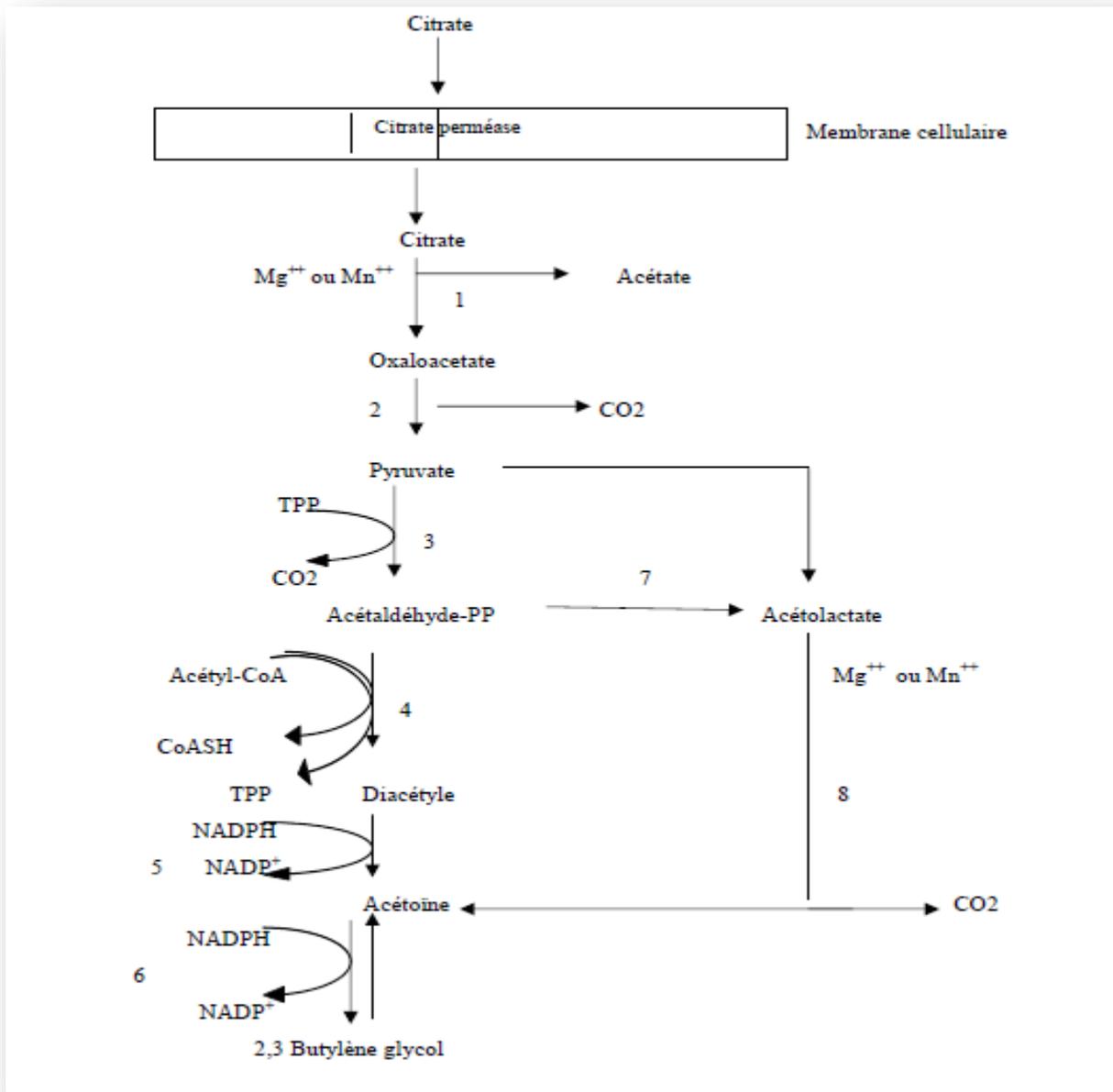
### 5.1.3. La voie des bifides

Les génomes des *Bifidobacterium* codent pour un large arsenal d'enzymes impliqués dans le catabolisme des sucres. Plus de 50 carbo-hydrolases ont été identifiés chez les bifidobactéries, ce qui confirme que ce genre est spécialisé dans le métabolisme des sucres (Van De Broek et al., 2008).

Les bifidobactéries sont des organismes saccharolytiques capables de fermenter le glucose, le galactose, et le fructose par une voie qui leur est spécifique. Elles utilisent la voie du fructose 6-phosphate phosphocétolase (F6PPK), ou encore appelée « shunt » du fructose 6-phosphate (Scardovi, 1965). La voie des pentoses phosphates complète le métabolisme des sucres pour produire de l'acétate et du lactate avec un ratio molaire 3/2. Cependant toutes les souches et espèces bifides ne sont pas égales devant la fermentation des glucides et alcools (Figure 2) (Scuotto, 2015).

### 5.2. Le métabolisme du citrate

Le citrate est un intermédiaire central du cycle des acides tricarboxyliques. Il joue un rôle important dans le métabolisme énergétique des cellules vivantes. Le citrate est également un précurseur de la synthèse des acides aminés (Dridier et Prevost, 2009). L'acide citrique est utilisé par de nombreuses espèces des genres *Streptococcus* (*Streptococcus thermophilus*), *Lactococcus* (*Lc. Lactis subsp. lactis biovar diacetylactis*), *Enterococcus* (*Ec. faecium*), *Pediococcus*, *Leuconostoc* (*Ln. lactis*, *Ln. cremoris*) et *Lactobacillus* (*Lb. plantarum*, *Lb. casei*). Cependant il ne peut être dégradé qu'en présence d'un substrat fermentescible et d'une source d'azote (Leveau et Bouix, 1993). Le citrate est transporté à l'intérieur des cellules par une citrate-perméase, où il est scindé en acétate (en majeure partie excrétés) et en oxaloacétate par le complexe enzymatique citrate lyase. L'oxaloacétate est ensuite converti en pyruvate et en CO<sub>2</sub> par une oxaloacétate décarboxylase. Des transformations successives du pyruvate aboutissent à la formation de composés aromatisants et le produit fini est le 2,3-butylen-glycol (2,3-butanediol) (Figure 3) (Bekhouche, 2006).



**Figure 3:** Le métabolisme du citrate chez les bactéries lactiques  
(Bekhouché, 2006).

TPP : thiamine pyrophosphate; 1 : citrate lyase (citritase); 2 : oxaloacétate décarboxylase; 3 : pyruvate décarboxylase; 4 : diacétyle synthétase; 5 : diacétyle réductase; 6 : acétoïne réductase; 7 : acétolactate synthétase; 8 : acétolactate décarboxylase.

## **Chapitre II:**

# Utilisation agro-alimentaire des bactéries lactiques

**Tableau 1:** Teneur moyenne du yaourt pour 100 g de produit (Kiemptor, 2013).

	Teneur moyenne pour 100 g de produit								
	Protides g	Lipides g	Glucides g	Calcium mg	Sodium mg	Potass. mg	Phosph. mg	Valeur énergétique kJoules / kCalories	
Yaourt nature	4,15	1,2	5,2	174	57	210	114	201	48
Yaourt au lait entier	3,8	3,5	5,3	171	56	206	112	284	68
Yaourt nature 0%	4,2	traces	5,4	164	55	180	100	163	39
Yaourt nature sucré	3,8	1,1	14,5	160	52	195	105	347	83
Yaourt aromatisé au lait entier	3,2 4,3	3,2 1,8	12 5,2	140 165	50 40	190 205	106 115	372 230	89 55
Yaourt brassé nature	3,75	1,65	14,5	140	50	190	110	368	88
Yaourt brassé aux fruits	3,1	2,7	16,5	140	45	180	100	431	103
Yaourt au lait entier aux fruits	3,6	traces	17,2	140	45	180	100	351	84
Yaourt maigre aux fruits									

## **1. Définition des produits laitiers fermentés**

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS) et l'organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) (Rome, 2011), Le lait fermenté est un produit laitier obtenu par la fermentation du lait avec ou sans modification de composition, par l'action des micro-organismes appropriés et résultant dans la réduction du pH avec ou sans coagulation (précipitation isoélectrique). Ces levains (micro-organismes) doivent être viables, actifs et abondants dans le produit à la date de durabilité minimale (Codex alimentarius, 2011).

Une large gamme de produits laitiers fermentés est commercialisée à travers le monde. Il existe un grand nombre de laits fermentés provenant de plusieurs pays et qui diffèrent par leur matière première, leur flore microbienne, leur technologie, leur texture, leur goût et leur durée de conservation (Leksir, 2012).

### **1.1. Le yaourt**

#### **1.1.1. Historique et définition**

Le yaourt est connu depuis l'antiquité, le premier nom turc apparu au VIII siècle, fut « yogurut » pour être change au XI siècle par le nom « yoghourt » utilisé actuellement (Corrieu et Luquet, 2008).

Le yaourt ou yoghourt est un produit fermenté d'origine animale à base de lait (Tableau 1), obtenu exclusivement par la coagulation du lait sous l'action de deux bactéries: *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* (Leksir, 2012).

Ces deux bactéries homofermentaire effectuent une fermentation du lactose en acide lactique, ce qui abaisse le pH du lait au pH isoélectrique (4,6) de la caséine, de façon à former un gel ou coagulum. Outre le goût acidulé qu'ils donnent au gel, ces ferments lactiques lui assurent une saveur caractéristique due à la production de composés aromatiques (Agrégation de Biochimie, 2003).

Ces bactéries doivent être vivantes dans le produit et leur nombre doit dépasser dix millions par gramme de yaourt à la date limite de conservation (Leksir, 2012).

### 1.1.2. Types de yaourt

Différentes sortes de yaourt sont trouvés sur le marché selon leurs teneurs en matière grasse, leur goût ou leur texture.

- Selon la teneur en matière grasse on distingue les yaourts maigres (moins de 1% de matière grasse), les yaourts naturels (1% de matière grasse), les yaourts au lait entier (3,5% de matière grasse).
- Selon leur goût il existe les yaourts nature (sans addition); les yaourts sucrés; les yaourts aux fruits, au miel, à la confiture (moins de 30% d'éléments ajoutés) et les yaourts aromatisés (aux arômes naturels ou de synthèse autorisés par la législation).
- Selon la texture on note les yaourts fermes (coagulés en pot), les yaourts brassés (coagulés en cuve et brassés pendant la mise en pot), les yaourts à boire (texture liquide (Kiemptore, 2013).

## 2. Les levains ou ferments lactiques dans l'industrie laitière

Les bactéries lactiques, utilisées comme ferments, contribuent au développement de la texture, de la flaveur et de l'arôme des produits laitiers fermentés par la production de composés aromatiques comme le diacétyl.

La production de ferments concentrés vise à obtenir des ferments ayant une activité élevée, une grande quantité de cellules viables et un équilibre entre les souches dans les ferments mixtes. Les bactéries lactiques produits comme ferments commerciaux sont des cultures pures ou un mélange appartenant aux genres: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium* (Prioult, 2007 ; Ghozlane, 2012).

Selon la Fédération International de Laiterie (FIL) et nombreux pays (la plus part des pays européens, le Maroc, le Brésil et le Mexique), la dénomination du « yoghourt » nécessite l'utilisation obligatoire de deux ferments : *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* et *St. thermophilus*. Cependant, de nombreux pays tels que les Etats – unis, la Belgique, la Suède, la Pologne, le Canada, le Japon et l'Afrique du sud, permettent l'utilisation facultative d'autres ferments que les deux cités précédemment, des bactéries à effet probiotique comme les lactobacilles acidophiles ou des bifidobactéries, ainsi que des bactéries ayant des propriétés technologiques particulières (Corrieu et Luquet, 2008).

### **3. Critères de choix des ferments**

Les critères de choix des ferments sont importants d'un point de vue marketing, puisque le ferment est à l'origine de la typicité des produits fermentés.

- a. L'aptitude technologique** : les caractéristiques des ferments en terme de pouvoir acidifiant ou aromatisant, la protéolyse et la production d'exopolysaccharides (Corrieu et Luquet, 2008; Branger et *al.*, 2007).
- b. L'industrialisation du ferment** : la capacité du ferment à résister aux différents traitements lors de sa fabrication, comme la congélation ou la lyophilisation (Branger et *al.*, 2007).

### **4. Procédé de fabrication des ferments lactiques**

La production industrielle des ferments lactiques est généralement réalisée en cultures pures, discontinues ou continues, avec ou sans recyclage des cellules, à température et pH régulés et en anaérobiose. La conservation des ferments s'effectue à basse température, respectivement -45°C pour les ferments congelés et +4°C pour les bactéries lyophilisées. Les bactéries sont ensuite utilisées en mélange, après décongélation ou réhydratation, pour la fabrication des produits fermentés. L'objectif visé par le producteur de ferments est d'obtenir des ferments lactiques concentrés d'une haute qualité, c'est-à-dire comportant un grand nombre de bactéries viables et présentant une activité métabolique la plus élevée possible (Corrieu et Luquet, 2008).

Traditionnellement, les ferments lactiques étaient fabriqués dans l'usine dans laquelle ils étaient ensuite utilisés. Ils étaient conservés sur milieux solides, ou liquides, soit à +4 °C, soit sous forme congelée. Avant leur utilisation, ils étaient propagés sur un milieu nutritif, en plusieurs prés cultures successives, pour atteindre le volume nécessaire à l'ensemencement des cuves de fabrication (Corrieu et Luquet, 2008).

Actuellement, ces prés cultures subsistent chez certains producteurs notamment en fromagerie, malgré des inconvénients liés à leur lourdeur de mise en œuvre, leur répétabilité incertaine et les difficultés de maintien de l'hygiène au sein de l'unité de production (sensibilité aux infections phagiques) (Corrieu et Luquet, 2008).

La production industrielle des ferments lactiques concentrés se déroule selon les étapes suivantes :

- **Préparation du milieu de culture**

La préparation du milieu fait intervenir en premier lieu un choix raisonné des matières premières, en fonction des besoins des micro-organismes, du coût des constituants et du savoir-faire du producteur (Corrieu et Luquet, 2008).

- **Traitement thermique**

Le milieu de culture constitué doit être traité thermiquement afin de le débarrasser des micro-organismes contaminants, puis refroidi à la température de fermentation. Son pH est ajusté à la valeur optimale pour la bactérie à cultiver (Corrieu et Luquet, 2008).

- **Inoculation ou Ensemencement**

L'inoculum est constitué soit d'une préculture préalablement incubée, soit de bactéries congelées ou lyophilisées qui sont ajoutées directement dans le fermenteur. Quand les bactéries lactiques sont isolées pour être développées comme ferments, elles doivent démontrer une aptitude à être produites à grande échelle, pour résister au processus de lyophilisation et pour maintenir leur activité fonctionnelle (Edward et *al*, 2010 ; Schwab et *al*, 2007). La majorité des productions de ferments est effectuée en cultures pures (Corrieu et Luquet, 2008).

- **Fermentation**

La fermentation est généralement conduite en discontinu, dans des conditions contrôlées de température et de pH et sous une faible agitation. Une anaérobiose partielle ou totale peut être maintenue (Corrieu et Luquet, 2008).

- **Concentration et récolte**

Une étape de récolte et de concentration suit la phase de propagation des bactéries. Elle permet d'éliminer la majeure partie de l'eau contenue dans les milieux de culture et d'aboutir à une concentration cellulaire élevée. Elle est réalisée par centrifugation ou filtration tangentielle (Corrieu et Luquet, 2008).

- **Conditionnement**

La concentration des cellules est suivie de l'addition de molécules de protection, dont le rôle est d'aider les cellules à survivre et à se maintenir dans un état physiologique actif, à l'issue des étapes de stabilisation et de stockage ultérieures (Corrieu et Luquet, 2008).

- **Stabilisation**

La stabilisation des bactéries concentrées protégées est réalisée soit par congélation, soit par lyophilisation. Les conditions de réalisation de ces opérations sont définies de façon à limiter les dommages cellulaires qu'elles entraînent (Corrieu et Luquet, 2008).

- **Conditionnement final**

Le conditionnement final des concentrés bactériens intervient soit avant, soit après l'étape de stabilisation, en fonction des conditions dans lesquelles, celle-ci est réalisée. Il peut être précédé d'une étape de mélange de plusieurs souches (Corrieu et Luquet, 2008).

- **Stockage**

Le stockage des ferments concentrés stabilisés est réalisé à température contrôlée, pendant une durée au moins égale à trois mois, selon les spécifications du producteur (Corrieu et Luquet, 2008; Leksir, 2012).

## **5. Interaction entre les bactéries lactiques**

Dans la pratique industrielle, les levains de bactéries lactiques ne sont jamais constitués d'une seule souche pure, mais de mélanges de souches. Dans ces conditions, des interactions métaboliques se manifestent (Djidel, 2007; Ghozlane, 2012). L'ensemble de ces interactions gouverne la structure des communautés microbiennes et leurs activités. On les classe en deux catégories: les interactions positives qui se caractérisent par la stimulation d'un ou de plusieurs micro-organismes et les interactions négatives qui correspondent à une inhibition de la croissance et de l'activité métabolique (Hadef, 2012).

### **5.1. Interactions positives**

Quand on parle d'interactions positives, on différencie le commensalisme où l'un des partenaires est stimulé par la production d'une substance essentielle ou par la destruction d'un facteur inhibiteur, du mutualisme où, dans ce cas, l'interaction est bénéfique aux deux partenaires (Hadeif, 2012).

Les yaourts (ou yoghourts) sont fabriqués à l'aide de lait pasteuriséensemencé par deux bactéries thermophiles : *Lactobacillus bulgaricus*, agent d'acidification, de tenue et d'arôme, et *Streptococcus thermophilus*, ferment d'arôme. Il existe une synergie entre ces deux souches qui fabriquent des composés utiles pour l'autre: peptides par la première, et acide formique pour la seconde. L'arôme du yaourt est dû à l'acetalaldehyde formé à partir de thréonine par l'aldolase de *Lb.bulgaricus*. D'autres bactéries lactiques peuvent être ajoutées comme agents probiotiques, sans intervenir nécessairement dans le procédé (*Lactobacillus acidophilus*, *L.casei*, *Bifidobacterium*) (Guiraud, 2012).

### **5.2. Interactions négatives**

Il existe divers mécanismes d'inhibition des micro-organismes entre eux. Si l'inhibition intervient par la production de substances inhibitrices et si un seul des deux micro-organismes est inhibé par l'autre, il convient de parler d'amensalisme. En revanche, si les mécanismes d'inhibition sont réciproques, il s'agit alors d'un phénomène de compétition. Cette compétition peut s'exercer vis-à vis de l'espace disponible (inhibition de contact) et/ou de la disponibilité en substrats. L'antagonisme désigne une lutte réciproque des deux populations par la production de molécules inhibitrices, généralement spécifiques (Hadeif, 2012).

## **6. Intérêt des bactéries lactiques du yaourt**

Le yaourt contient des ferments lactiques à l'origine d'effets santé: Lorsqu'il est consommé, le yaourt contient un minimum de 10 millions de ferments par gramme de produit. Les études scientifiques ont montré que ces ferments confèrent au yaourt des effets sur la santé : à ce titre, ils font partie des ferments appelés « probiotiques». La consommation régulière de yaourt est ainsi reconnue pour améliorer la digestion et l'absorption du lactose. D'autres études récentes suggèrent des bénéfices sur l'amélioration des diarrhées des enfants ainsi que sur la stimulation du système immunitaire de certaines personnes immunodéprimées, tout particulièrement les personnes âgées (Syndifrais, 2011).

Les ferments à l'origine d'effets santé font maintenant, l'objet de nombreux travaux de recherches, fondamentales ou appliquées, en vue de développer de nouveaux produits apportant de nouveaux bénéfices. C'est ainsi, par exemple, que sont apparus des laits fermentés au « bifidus »,ensemencés par des bifidobactéries (genre *Bifidobacterium*). (Syndifrais, 2011).

**Chapitre III :**  
Activité antibactérienne  
des bactéries lactiques

## 1. Les propriétés inhibitrices des bactéries lactiques

L'homme utilise depuis longtemps, consciemment ou non, les propriétés antibactériennes des bactéries lactiques. Ces propriétés se sont avérées être intéressantes pour la conservation des aliments dans lesquels cette flore se développe. Les bactéries lactiques inhibent le développement de certains micro-organismes grâce à la synthèse de molécules antibactériennes telles que des acides organiques, notamment l'acide lactique, du peroxyde d'hydrogène et des bactériocines (Jasniwski, 2008); ou par la compétition nutritionnelle et pour l'espace (Leonard, 2013).

Il est intéressant de noter que ces phénomènes d'inhibition causés par les bactéries lactiques peuvent également s'exercer contre de nombreux organismes étrangers à savoir les staphylocoques, les clostridies, les streptocoques non lactiques et les bactéries coliformes (Julliard et *al.*, 1987).

### 1.1. La compétition nutritionnelle et pour l'espace

Lorsque plusieurs souches sont mises en culture dans un même milieu, elles entrent nécessairement en compétition, si elles utilisent le même substrat. C'est ce qui se passe avec les bactéries lactiques utilisant le lactose (Julliard et *al.*, 1987).

Du fait de leurs importantes exigences nutritionnelles, les bactéries lactiques envahissent complètement le milieu. Elles limitent alors la multiplication des autres colonisateurs (Castellano et *al.*, 2008). De plus, les cellules d'une même espèce possèdent des systèmes de communication (Gram et *al.*, 2002). Lorsqu'une certaine densité cellulaire est atteinte (système de «Quorum Sensing»), des signaux sont envoyés d'une cellule à l'autre pour réguler l'expression de certains gènes et orienter le métabolisme (Leonard, 2013).

### 1.2. La production de métabolites antimicrobiens

L'activité antagoniste des bactéries lactiques est due à la synthèse de métabolites tels: les acides organiques, le Peroxyde d'hydrogène, Le dioxyde de carbone et les bactériocines (Tableau 2) (Belarbi, 2011).

**Tableau 2 :** Métabolites antimicrobiens de faible masse molaire secrétés par les bactéries lactiques autres que les bactériocines (Leonard, 2013).

Composés antimicrobiens	Souches productrices	Spectre antimicrobien
Acide lactique	Toutes les bactéries lactiques	Levures Bactéries à Gram +/-
Acide acétique	Bactéries lactiques hétérofermentaires	Levures Bactéries à Gram +/-
Diacétyle	<i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i>	Levures Bactéries à Gram +/-
Peroxyde d'hydrogène	Toutes les bactéries lactiques	Levures Bactéries à Gram +/-
Dioxyde de carbone	Bactéries lactiques hétérofermentaires	La plupart des groupes taxonomiques de microorganismes

### 1.2.1. Les métabolites antimicrobiens non peptidiques

#### • Les acides organiques

Les acides organiques sont produits par les bactéries lactiques lors du processus de fermentation. Les principaux acides produits sont: l'acide lactique, l'acide acétique et propionique. Ces derniers permettent d'inhiber la croissance des levures et d'autres bactéries qui ne peuvent se développer à pH acide (Mami, 2013).

L'effet inhibiteur de ces acides organiques est principalement provoqué par les molécules non dissociées qui diffusent à travers les couches lipidiques des membranes des microorganismes provoquant ainsi un abaissement du pH dans le cytoplasme qui a pour conséquence la déstabilisation des cellules (Mami, 2013). Par contre, les bactéries lactiques possèdent un système de Tolérance à l'Acide (TA) (Acid Tolerance Response) qui leur permet de survivre et de continuer à faire fonctionner leur métabolisme (Van de Guchte et *al*, 2002).

Certaines bactéries lactiques hétérofermentaires dites propioniques sont capables de convertir le lactate en propionate et acétate accompagné d'une production de CO<sub>2</sub>. Même si cette production d'acide propionique est à l'état de traces, l'effet inhibiteur a été démontré surtout contre la croissance des champignons et moisissures (Leonard, 2013).

#### • Le peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) présente un effet antimicrobien qui peut être expliqué par la production de radicaux libres tels que le groupement superoxyde (O<sub>2</sub>•) et le groupement hydroxyle (OH•) capables d'endommager l'ADN bactérien. En outre, le pouvoir inhibiteur du peroxyde d'hydrogène pourrait être dû à des réactions d'oxydation des groupes sulfhydryles provoquant une modification de la conformation des protéines et donc la perte de fonction des enzymes. De plus, il peut engendrer la peroxydation des lipides membranaires, augmentant ainsi la perméabilité de la membrane du microorganisme cible (Leonard, 2013).

La production et l'accumulation du peroxyde d'hydrogène crée un environnement toxique pour les cellules non équipées de système de protection capable de dégrader ce composé, son accumulation est inhibitrice vis-à-vis des souches qui génèrent du peroxyde mais aussi vis-à-vis d'autres microorganismes (De Roissart et Luquet, 1994) <http://www.batna-biologie.com/t792-les-bactéries-lactiques>.

- **Le dioxyde de carbone**

Le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) est principalement formé pendant la fermentation des hexoses suivant la voie hétérofermentaire. Le pouvoir antimicrobien du dioxyde de carbone produit par les bactéries lactiques, s'explique par la création d'une atmosphère anaérobie qui inhibe la croissance de certains microorganismes aérobies tels que la flore d'altération psychrophiles à Gram négatif. De plus, l'accumulation du dioxyde de carbone dans la membrane lipidique de la cellule cible pourrait modifier sa perméabilité (Leonard, 2013).

- **Le diacétyl**

Le diacétyl (C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>) est un composé aromatique produit par les bactéries lactiques (LAB) par fermentation du citrate. Cette molécule est caractérisée par une large activité antimicrobienne (Lanciotti et *al.*, 2003). La production de diacétyl par les différentes souches de LAB dépend du milieu, du pH et de la température d'incubation.

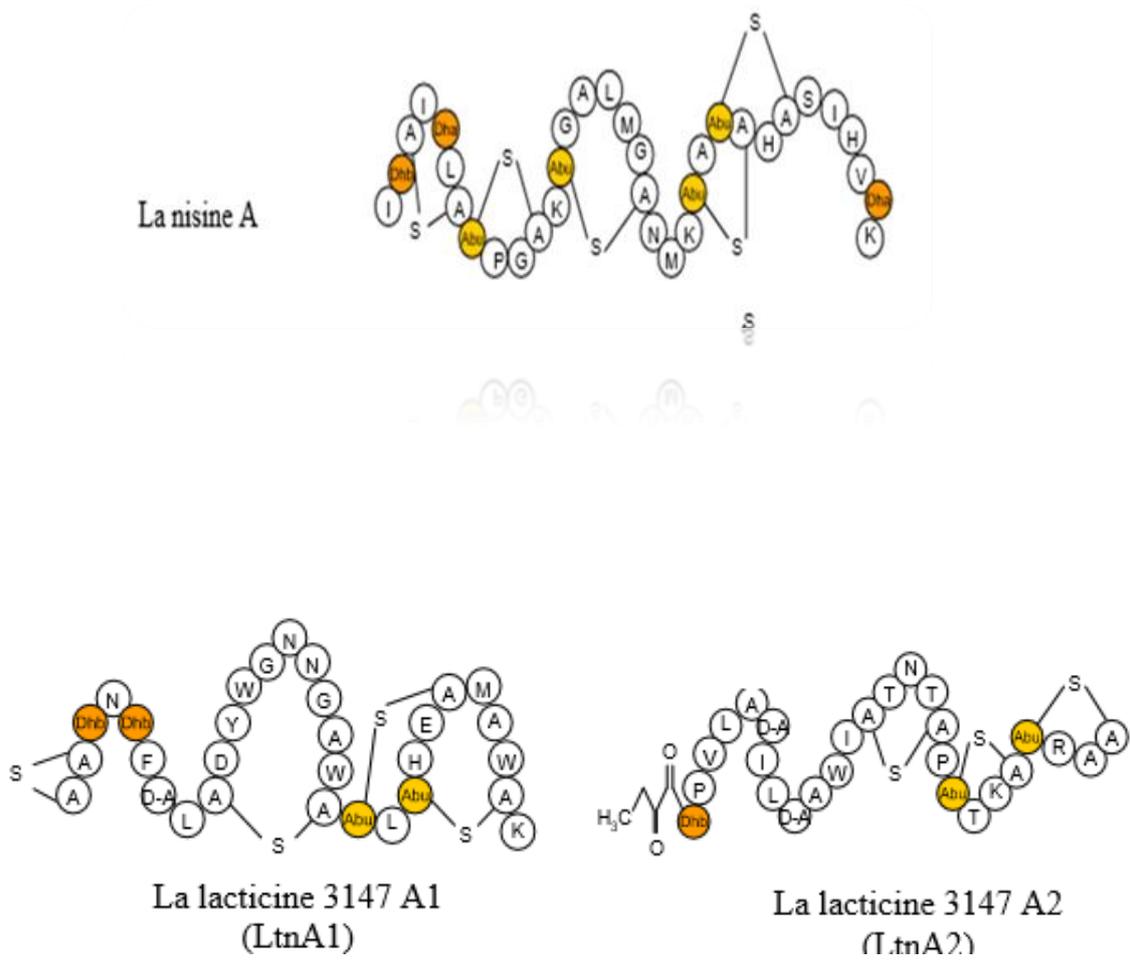
Le mécanisme d'action du diacétyl n'est pas encore connu précisément, néanmoins il est possible qu'il interagisse avec les résidus arginine des enzymes fonctionnelles (Leonard, 2013).

### 1.2.2. Les métabolites antimicrobiens peptidiques

- **Les bactériocines**

Différentes définitions des bactériocines ont été données au cours du temps. Cependant, la définition qui reste la plus largement acceptée est celle proposée par Klaenhammer (1988) qui considère les bactériocines comme des protéines, ou complexes de protéines, avec une activité bactéricide contre des espèces proches de la souche productrice (Dortu et Thonart, 2009), ou bien sont des peptides antimicrobiens, dont l'activité peut être bactéricide (entraînant la mort cellulaire) ou bactériostatique (entraînant un ralentissement de la croissance). Les bactéries productrices sont protégées de l'action de leurs propres bactériocines par un ou plusieurs protéines d'immunité (Dridier et Prevost, 2009).

Les bactériocines sont synthétisées par voie ribosomique généralement par les bactéries à Gram positif appartenant au groupe des bactéries lactiques. Elles peuvent subir ou non des modifications post-traductionnelles avant d'être excrétées dans le milieu extracellulaire (Jack et *al.*, 1995 ; Jasniwski, 2008).



**Figure 4** : Séquence et structure de lantibiotiques de type A (Nisine), B (Mersacidine) et d'un lantibiotique « two-peptides » (Lacticine 3147 A1 et A2) (Makhloufi, 2011).

Les bactéries lactiques sont capables de synthétiser des bactériocines actives non seulement contre d'autres bactéries lactiques, mais également contre d'autres bactéries Gram<sup>+</sup>, et selon certains, contre certaines bactéries Gram<sup>-</sup>, parmi lesquelles on rencontre des entérobactéries et des germes pathogènes (Raimbault, 1995).

#### a. Classification des bactériocines

La classification actuelle est fondée sur la taille et le fait que les bactériocines font l'objet ou non de modifications post-traductionnelles (classification proposée par Klaenhammer en 1993, et révisée à la suite du 1er symposium mondial sur les bactériocines de bactéries lactiques, tenu en avril 1995 à Banff, Canada) (Cenatiempo et *al.*, 1996). Elles sont réparties en quatre classes comme suit:

##### ➤ Classe I : Les lantibiotiques

Les lantibiotiques pour "lanthionine containing antibiotics" sont des peptides de taille inférieure à 5 kDa, stables à la chaleur et qui contiennent des acides aminés inhabituels soufrés formés post-traductionnellement. Il s'agit de la lanthionine, la  $\beta$ -méthyle lanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine. Ils peuvent être divisés en deux types (Dortu et Thonart, 2009).

- **La classe Ia** : Elle comprend des peptides cationiques hydrophobes allongés contenant jusqu'à 34 acides aminés comme la nisine A (Figure 4) (Dortu et Thonart 2009).
- **La classe Ib** : Elle comprend les peptides globulaires chargés négativement ou sans charge nette et contenant jusqu'à 19 acides aminés (McAuliffe et *al.*, 2001 ; Twomey et *al.*, 2002).

Certains lantibiotiques sont par ailleurs constitués de deux peptides agissant ensemble pour avoir une activité comme la lacticine 3147(A1 et A2) (Figure 4) (Dortu et Thonart, 2009).

##### ➤ Classe II

Les bactériocines de classe II sont des peptides de taille inférieure à 10 kDa, stables à la chaleur et ne contenant pas d'acides aminés modifiés. Cette classe est divisée en trois sous-classes (Dortu et Thonart, 2009).

- **Sous-classe IIa ou « pediocin-like »**

Les bactériocines de la sous-classe IIa contiennent entre 27 et 48 acides aminés et ont toutes une partie N-terminale hydrophobe contenant la séquence consensus YGNGV ainsi qu'un pont disulfure et une partie C-terminale moins conservée, hydrophobe ou amphiphile qui détermine la spécificité d'action (Fimland et al., 2000 ; Richard et al., 2006). Elles ont toutes une activité contre *Listeria monocytogenes* (Dortu et Thonart, 2009).

- **Sous-classe IIb**

La sous-classe IIb comprend les bactériocines ayant besoin de deux peptides pour avoir une activité. Ainsi 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 (Dortu et Thonart, 2009).

L'activité antimicrobienne de cette classe est dépendante des deux composants protéiques. Ainsi l'action d'un seul peptide n'a pas d'effet sur la cellule cible comme pour la lactocine G $\alpha$ /G $\beta$  ou un effet relatif qui est multiplié quand les deux peptides sont associés comme pour l'Enterocine L50A/L50B (Dridre et Prevost, 2009).

- **Sous classe IIc : les bactériocines circulaires**

Les bactériocines de la sous classe IIc comprennent les bactériocines activées par les thiols, comme la lactococcine B. Cependant, la réduction d'un groupement thiol ne semble pas indispensable à son activité antibactérienne (Venema et al, 1996). Deux exemples ont été décrits, l'acidocine B (Leer et al., 1995) et la divergicine A (Worobo et al, 1995). (Luquet et Corrieu, 2008).

- **Classe III : Les protéines à hauts poids moléculaires**

Cette classe regroupe des protéines de taille supérieure à 30 kDa et thermosensible. La structure de ces bactériocines diffère complètement des autres bactériocines produites par les bactéries lactiques. Cette classe ne contient que quatre bactériocines : l'helveticine J produite par *Lactobacillus helveticus*, l'enterolysine A produite par *Enterococcus faecium*, la zoocine A produite par *Spreptococcuszooepidemicus* et la millericine B produite par *Streptococcus milleri* (Dortu et Thonart, 2009).

La millericine B et l'enterolysine A ont un spectre d'action relativement large par contre la zoocine A présente un spectre d'action étroit (Dridre et Prevost, 2009).

- **Classe IV : les bactériocines complexes**

Les bactériocines de classe IV sont définies comme des protéines associées à une composante non protéique, lipidique et/ou oligosaccharidique nécessaire à leur activité biologique (Luquet et Corrieu, 2008).

Cette dernière classe n'étant pas clairement caractérisée, de nombreux auteurs ont préféré l'écarter de la classification considérant la classe IV comme inappropriée (Makhloufi, 2011).

### **b. Mécanisme d'action des bactériocines**

Les bactériocines présentent des modes d'actions similaires dont le siège d'activité est la membrane cellulaire. Leur action se manifeste par adsorption sur la surface cellulaire suivie d'un effet létal. En effet, un pore se forme dans la membrane de la cellule cible, occasionnant une perméabilité de celle-ci et donc une dissipation de la force proton motrice, entraînant la mort cellulaire (Kouakou et Thonart, 2010).

Les bactériocines peuvent avoir un effet bactériostatique ou bactéricide au cours duquel les bactéries meurent tout en gardant leur intégrité physique (pas de lyse cellulaire) et un effet bactériolytique qui conduit à une dissolution de la cellule bactérienne (Makhloufi, 2011).

### **c. Propriétés des bactériocines pour une application alimentaire**

Les bactériocines présentent des propriétés qui leur permettent une application dans le domaine agroalimentaire. Elles sont habituellement reconnues comme sûres, sensibles aux protéases digestives et ne sont pas toxiques pour les cellules eucaryotes (Wijaya *et al.*, 2006). Elles ont une grande tolérance aux variations de pH et aux traitements thermiques. Leur spectre antimicrobien peut être large ou étroit, elles peuvent donc cibler sélectivement des bactéries pathogènes ou altérantes sans inhiber les bactéries indispensables et ont un mode d'action bactéricide (Galvez *et al.*, 2007). Les bactériocines doivent cependant être considérées comme un moyen de préservation complémentaire à ceux déjà existant (Dortu, et Thonart, 2009).

### **d. Applications des bactériocines dans l'industrie alimentaire**

La bioconservation consiste en une augmentation de la durée de vie et une amélioration de la sécurité sanitaire des produits alimentaires en utilisant des microorganismes et/ou leurs métabolites (Ross *et al.*, 2002). C'est grâce aux propriétés antimicrobiennes des métabolites qu'elles synthétisent (éthanol, peroxyde d'hydrogène,

diacétyle, composés antifongiques, acides phényl-lactiques, antibiotiques et bactériocines), que les bactéries lactiques sont reconnues comme de bons agents de conservation des produits alimentaires (Taale et *al.*, 2016).

Les bactériocines des bactéries lactiques sont actives contre des bactéries Gram+, phylogénétiquement proches des souches productrices. Elles ont une action anti-*Listeria* qui les rend intéressantes pour la protection alimentaire (Luquet et Corrieu, 2008).

L'ajout de bactériocine à un aliment peut s'envisager selon plusieurs stratégies. D'une part l'ajout de la bactériocine pure, partiellement purifiée ou comme constituant d'un produit préalablement fermenté par une bactérie productrice de bactériocine. Elle est donc considérée comme additif alimentaire. (Luquet et Corrieu, 2008).

Aujourd'hui la Nisine est la seule bactériocine ayant reçu l'agrément de nombreux pays pour son utilisation en préservation alimentaire. Ainsi, dans l'union européenne, la Nisine est désignée par le code **E234** et considérée comme agent de conservation. (Luquet et Corrieu, 2008). Elle a été évaluée comme sans danger pour l'Homme par l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (ONUAA) et l'Organisation Mondiale pour la Santé publique (OMS) en 1969 ainsi que par les autorités sanitaires Européennes en 1983. La nisine est commercialisée sous une forme semi-purifiée à l'état lyophilisé sous le nom de **Nisaplin™ (Danisco, France)** et de **Chrisin™ (Christen Hansen, Danemark)** (Makhloufi, 2012).

La nisine est souvent utilisée pour le contrôle de la prolifération de pathogènes tels que *Clostridium botulinum*, *Clostridium tyrobutyricum* et *Listeria monocytogenes* dans les produits laitiers (Davies et Delves-Broughton, 1999). Elle est également utilisée dans d'autres produits alimentaires pasteurisés comme les crèmes glacées, les desserts sucrés à base de lait, les laits aromatisés et de jaune d'œufs (Thomas et *al.*, 2000).

D'autres bactériocines ont, depuis, été commercialisés sous la forme d'un concentré obtenu après fermentation par la souche productrice et atomisation d'un substrat alimentaire (lait, lactosérum par exemple). Cette préparation contient, outre la bactériocine, d'autres métabolites tels que l'acide lactique (Dortu et Thonart, 2009). Parmi ces produits, la pédiocine PA-1/ AcH, une bactériocine de classe IIa commercialisée sous le nom d'**ALTA™ 2341 (Kerry Bioscience, Carrigaline, Co. Cork, Ireland)**. Elle est utilisée pour prévenir la

contamination des fromages blancs, les crèmes fromagères et les produits carnés par *Li. monocytogenes*.

Une autre préparation commerciale, **Microgard™(Danisco,France)** renferme des propiocines produites par *Propionibacterium freudenreichii spp shermanii* (Weber et Broich, 1986). Elle est préparée à partir de lait écrémé (**Microgard™, Danisc100**) ou de dextrose (**Microgard™200**) fermentés et souvent utilisée comme additif alimentaire dans les fromages blancs et yaourts (Leonard, 2013).

Un autre moyen d'appliquer les bactériocines consiste en l'utilisation des bactéries productrices de bactériocines, qui 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, sans modification de ces propriétés organoleptiques (Leonard, 2013).

La bactériocine peut également être incorporée dans l'emballage alimentaire. Une libération de la molécule se fera par la suite au contact de l'aliment. Ces emballages antimicrobiens dits «actifs», autorisés en Europe depuis 2004 ne peuvent contenir que les additifs alimentaires autorisés dans la formulation des aliments. De ce fait, la Nisine est la seule bactériocine autorisée dans les emballages actifs (Leonard, 2013).

Matériel  
et  
Méthodes

## **1. Présentation du lieu de travail**

Notre travail pratique a été réalisé au niveau des laboratoires de microbiologie d'immunologie et de zoologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie, de l'Université des frères Mentouri –Constantine.

Les objectifs assignés à ce présent travail s'articulent autour des points suivants :

- ✓ L'isolement et l'identification des bactéries lactiques à partir d'un produit laitier le yaourt brassé du groupe « SOUMMAM »;
- ✓ L'étude du pouvoir antagoniste de ces bactéries lactiques vis à vis de certaines bactéries pathogènes.

## **2. Matériel**

### **2.1. Matériel biologique**

Pour la réalisation de la partie expérimentale, on s'est servi du matériel biologique suivant:

#### **2.1.1. Le yaourt**

Le yaourt brassé de la laiterie « SOUMMAM » a été choisi comme un produit terroir pour l'isolement des bactéries lactiques.

Les échantillons de yaourt à analyser sont conservés au maximum 24 heures à +4°C avant d'être analysés.

#### **2.1.2. Les souches test**

Les souches test utilisées dans cette étude sont les suivantes :

- Escherichia coli* ATCC 8739
- Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- Bacillus cereus*.

Ces trois souches sont purifiées et conservées sur gélose nutritive inclinée à +4°C et à l'obscurité. Avant leur utilisation dans les tests d'inhibition, elles sont activées par transfert sur bouillon nutritif et incubées 16 à 18 heures à 37 °C.

### **3. Méthodes**

#### **3.1. Traitement des échantillons**

##### **3.1.1. Préparation de la solution mère**

Pour la préparation de la solution mère, 1g d'échantillon est placé dans un tube contenant 9ml d'eau physiologique stérile. Le mélange est ensuite agité au vortex (Begloul, 2011).

##### **3.1.2 Préparation des dilutions décimales**

La dilution est un processus qui consiste à réduire la concentration d'une substance dans une solution. Dans ce but, des dilutions décimales sont ensuite réalisées en cascade jusqu'à la dilution  $10^{-3}$  (Begloul, 2011).

#### **3.2. Isolement et purification des bactéries lactiques**

L'isolement des bactéries lactiques est effectué par étalement de 0,1ml des différentes dilutions ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ) sur milieux gélosés sélectifs Man Rogosa et Sharpe (MRS) (Annexe1) (M.Z.K BactChim) et M17(Annexe1) (M.Z.K BactChim), préalablement coulés et solidifiés sur boîtes de Pétri. L'incubation est réalisée à 37°C pendant 72 heures en anaérobiose sur milieu MRS (jarre d'anaérobiose) et en aérobie pour le milieu M17 pendant 48heures et à l'obscurité.

La purification est réalisée par des repiquages successifs sur géloses MRS et M17 jusqu'à l'obtention de colonies présentant les mêmes caractéristiques (souches pures).

#### **3.3. Identification des bactéries lactiques**

L'identification des bactéries lactiques est établie en se basant sur l'étude de leurs caractères morphologiques (examens macroscopique et microscopique) et divers caractères biochimiques: catalase, température de croissance, production de gaz carbonique, fermentation de divers sucres...etc.

##### **3.3.1. Examen macroscopique**

L'examen macroscopique permet de décrire l'aspect des colonies obtenues sur milieux gélosés (MRS et M17) en tenant compte des critères suivants : la taille, la forme, la

consistance, le contour, la viscosité et la couleur des colonies (Guiraud, 2003).

### **3.3.2. Examen microscopique**

Les colonies obtenues sur milieux gélosés MRS et M17 sont soumises à une coloration de Gram, à fin de déterminer la forme des cellules (coques et bacilles), leur arrangement et leur Gram (Guiraud, 2003).

## **3.4. Tests biochimiques**

### **3.4.1. Croissance à différentes températures**

Ce test permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries thermophiles. Des boîtes de Pétri contenant les milieux MRS et M17 sont inoculées et incubées aux deux températures: 10°C et 45°C pendant 3 à 5 jours (Bekhouche et Boulahrouf, 2005).

### **3.4.2. Croissance sur milieu hyper salé**

#### **• Principe**

La croissance à différentes concentrations de chlorure de sodium (NaCl) joue un rôle important dans l'identification des bactéries (Badis et *al.*, 2005).

#### **• Technique**

Les colonies à tester sontensemencées sur des bouillons hyper salés à 2%, 4% et 6.5% (Annexe2) d' NaCl et sont incubées à 37°C pendant 24heures.

#### **• Résultat**

La croissance, aux différentes concentrations, se traduit par un trouble.

### **3.4.3. Recherche de la catalase**

#### **• Principe**

La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène, produit toxique du métabolisme aérobie de nombreuses bactéries, en H<sub>2</sub>O et ½ O<sub>2</sub> (Ahmed et Irene, 2007)

#### **• Technique**

La présence de l'enzyme catalase est mise en évidence par le dépôt d'une colonie prélevée à partir des milieux MRS et M17 dans une goutte d'eau oxygénée.

- **Résultat**

Le dégagement de gaz se traduit par la formation des bulles d'air sous l'action de l'enzyme à tester.

#### **3.4.4. Recherche de l'oxydase**

- **Principe**

Ce test permet de mettre en évidence une enzyme : la phénylène diamine oxydase des bactéries. Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : le N diméthyl paraphénylène diamine (Guillaume, 2004).

- **Technique**

A partir de leur culture en bouillon (MRS et M17) on dépose une goutte sur le disque.

- **Résulta**

Le changement de couleur indique le résultat positif, si le disque prend une couleur violette l'oxydase est positive, si le disque reste incolore l'oxydase est négative.

### **3.5. Test de la fermentation des sucres**

#### **3.5.1. Utilisation du Mannitol**

- **Principe**

Ce test, réalisé sur milieu mannitol mobilité, permet de rechercher la fermentation du mannitol et de vérifier la mobilité du germe. Le mannitol est un produit de réduction du mannose. La dégradation en anaérobiose du mannitol conduit à la formation du fructose dont l'attaque conduit elle-même à la formation d'acides à chaînes courtes (Guillaume.2004).

- **Technique**

A l'aide d'une anse de platine, le milieu mannitol-mobilité(Annexe2) estensemencé par piqure centrale et incubé à 37°C pendant 24heures.

- **Résultat**

Le milieu vire au jaune s'il y a une fermentation du mannitol accompagné d'une diffusion de la culture au tour de la piqure (bactérie mannitol +, mobile), dans le cas contraire aucun changement de couleur et une absence de culture au niveau de la piqure (bactérie mannitol -, immobile).

### **3.5.2. Utilisation des sucres : Glucose, lactose, saccharose.**

- **Principe**

Ce test réalisé sur milieu TSI (Tripl Sugar Iron) permet de mettre en évidence, d'une part la fermentation des 3 sucres : lactose, saccharose et glucose avec ou sans production de gaz et d'autre part, la production d'hydrogène sulfureux (H<sub>2</sub>S) (Anonyme, 2013).

- **Technique**

L'ensemencement se fait par une piqure centrale du culot de la gélose TSI(Annexe2) inclinée, et par des stries serrées sur la pente. L'incubation se fait à la température adéquate au développement du germe recherché.

- **Résultat**

Un changement de couleur vers le jaune au niveau de la pente et le culot traduit la fermentation des 3 sucres, le noircissement indique la production d'H<sub>2</sub>S. Des fissures dans la gélose ainsi qu'un décollement du culot indiquent la production du gaz CO<sub>2</sub>.

### **3.6. Test de production d'acétoïne**

- **Principe**

Le milieu Clark et Lubs(Annexe2), qui contient l'acide pyruvique, permet d'étudier les produits de fermentation du glucose ; la différenciation entre la formation d'acide formique et d'acide acétique (Bekhouche et Boulahrouf, 2005).

- **Technique**

L'acétoïne est mis en évidence par la réaction de Voges Proskauer (VP) par l'ajout de 10gouttes du réactif VP1 ( $\alpha$ -naphtol) et même volume du réactif VP2 (hydroxyde de potassium).

- **Résultat**

La formation d'un anneau rouge à la surface du milieu indique la production d'acétoïne le test est VP+, l'absence d'anneau rouge dans le milieu signifie que le test est VP-.

### **3.7. Test de mise en évidence de l'arginine dihydrolase (ADH)**

- **Principe**

L'arginine dihydrolase est une enzyme clé pour la caractérisation des bactéries lactiques (Guillaume; 2004).

- **Technique**

Le bouillon Moeller à l'arginine(Annexe2) estensemencé par les colonies à tester et couvert par une couche d'huile de vaseline pour favoriser les conditions d'anaérobiose. L'incubation est réalisée à la température optimale de la croissance du germe recherché pendant 24heures.

- **Résultat**

Un changement de la couleur du milieu, du violet vers le jaune, révèle l'absence de l'enzyme (ADH -). Le milieu présentant une couleur violette indique la présence de l'arginine dihydrolase (ADH+).

### **3.8. Etude de l'activité antibactérienne**

Les sept (7) souches de bactéries lactiques isolées sont testées pour leur pouvoir antibactérien suivant la méthode de diffusion par des disques, décrite par Hamadan & Mikolajcik (1974); Apella, Gonzalez, Nader de Macias, Romero & Oliver (1992). (Tadesse et *al.*, 2004). Elle consiste à déposer des disques vierges imprégnés des souches lactiques en bouillon, à la surface des boites de Petri préalablement inoculées par les souches cibles. Les boites ainsi préparées sont incubées à 37°C pendant 24 heures.

L'inhibition se manifeste par la présence de zones claires autour d'un trouble formé par la croissance des souches cibles.

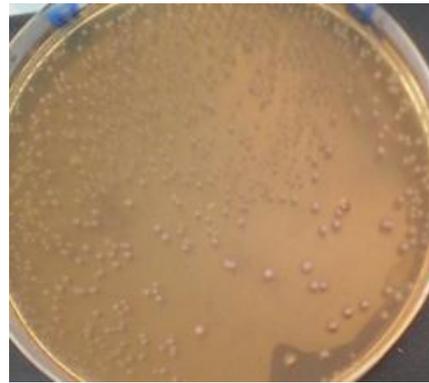
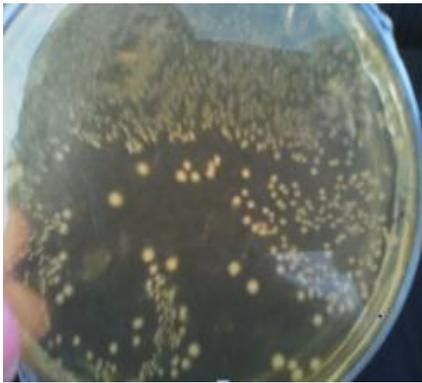
Le diamètre de la zone d'inhibition est calculé à partir des bordures de la zone comprenant le diamètre du disque (6mm). L'inhibition est considérée positive lorsque le diamètre de la zone est supérieur à 1mm selon Schillinger et Lucke, 1989 (Allouche et *al.*, 2010).

### **3.9. Conservation des souches**

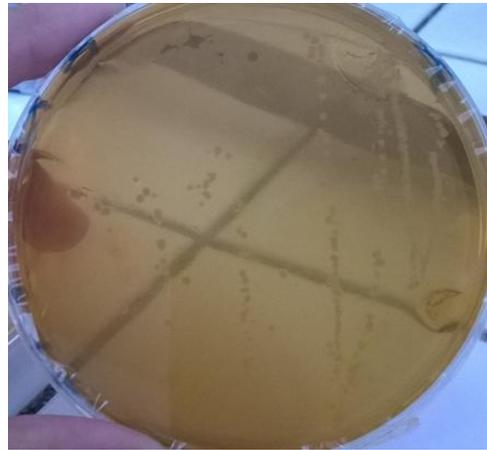
La conservation à court terme des souches pures est effectuée sur géloses MRS et M17 inclinées (Badis et *al.*, 2005). Après croissance à la température optimale, les cultures sont maintenues à +4°C. Le renouvellement des souches se fait par repiquage tous les 15 jours.



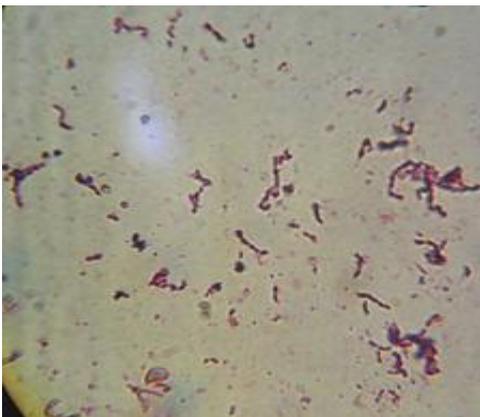
Résultats  
et  
Discussion



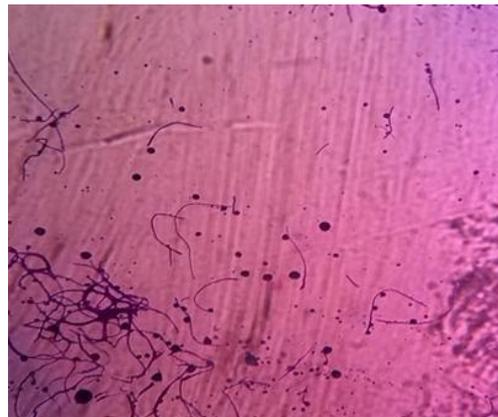
**Figure 5 :** Aspect macroscopique des souches lactiques isolées sur milieu M17.



**Figure 6:** Aspect macroscopique des souches lactiques isolées sur milieu MRS.



**Figure 7:** Aspect microscopique des souches isolées sur milieu M17, après coloration de Gram (Grossissement x100).



**Figure 8:** Aspect microscopique des souches lactiques isolées sur milieu MRS après coloration de Gram (Grossissement x100).

## **I. Résultats**

### **I.1. Isolement des bactéries lactiques**

Un total de sept (7) souches de bactéries lactiques ont été isolés à partir du yaourt brassé sur milieux sélectifs. Des cultures sur M17 ont permis d'avoir 4 isolats, 3 autres ont été obtenus sur milieu MRS. Ils sont désignés par un code constitué de deux lettres et d'un chiffre (Tableau 3).

**Tableau 3 :** Les codes des souches lactique isolées.

<b>Milieux d'isolement</b>	<b>Code des souches isolées</b>
MRS	-BL1 -BL2 -BL3
M17	-CL1 -CL2 -CL3 -CL4

### **I.2. Identification des souches lactiques**

Les sept (7) isolats ont été identifiés en se basant sur leurs caractères morphologiques et biochimiques. Les résultats sont résumés dans le **tableau 4**

#### **I.2.1. Caractères morphologiques**

Les colonies apparues sur milieu M17, ont une couleur blanche crème à jaune, de forme circulaire ou lenticulaire avec un contour régulier ou irrégulier dont le diamètre est compris entre 0.5 à 2mm (Fig.5). L'observation microscopique d'un frottis fixé et coloré a montré que les cellules sont des coques à Gram positif, disposées en paire ou en chaînette (Fig.7).

L'observation macroscopique des colonies obtenues sur gélose MRS à montré quelles sont de couleur blanchâtres, rondes à contour régulier avec un diamètre variant entre 2 à 5mm. (Fig. 6). L'examen microscopique à révélé que les souches sont des bacilles longs à Gram positif, isolés ou disposés en chaîne. (Fig.8).

**Tableau 4:** Caractères phénotypiques des souches lactique isolées.

<b>Souche</b> <b>Test</b>	<b>BL1</b>	<b>BL2</b>	<b>BL3</b>	<b>CL1</b>	<b>CL2</b>	<b>CL3</b>	<b>CL4</b>
<b>Forme cellulaire</b>	Bacille	Bacille	Bacille	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci
<b>Gram</b>	+	+	+	+	+	+	+
<b>Catalase</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>Oxydase</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>Croissance à 10°C</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>Croissance à 45°C</b>	+	+	+	+	+	+	+
<b>Tolérance à l'NaCl 2%</b>	+	-	+	+	+	+	+
<b>Tolérance à l'NaCl 4%</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>Tolérance à l'NaCl 6.5%</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>Fermentation du lactose</b>	+	+	+	+	+	+	+
<b>Fermentation de saccharose</b>	+	+	+	+	+	+	+
<b>Fermentation de glucose</b>	+	+	+	+	+	+	+
<b>Fermentation de mannitol</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>Mobilité</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>Production de CO2</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>Production d'acétoïne(VP)</b>	+	+	+	+	+	+	+
<b>ADH</b>	+	-	+	-	+	-	-
<b>Genre</b>	<i>Lactobacillus</i>			<i>Streptococcus</i>			

- : test négatif ; +: test positif

### **I.2.2. Caractères biochimiques**

Les tests biochimiques des sept isolats obtenus montrent qu'ils sont tous des bactéries à Gram positif, immobiles, catalase négative et oxydases négative (Tableau 06).

Les coques lactiques représentées par les souches CL1, CL2, CL3, CL4, se sont montrés homofermentaires capables de fermenter le saccharose, le lactose et le glucose avec production d'acétoïne. Ils sont capables de se développer à 45°C mais pas sur milieu à 6.5% en NaCl.

Il apparaît également que les trois souches de bacilles lactiques, notées : BL1, BL2 et BL3, utilisent la voie homofermentaire, au cours de l'utilisation du glucose sans production de CO<sub>2</sub>. Elles ont montrés leur aptitude à croître à 45°C et sur milieu hyper salé à 2% mais pas à 10°C et sur milieux à 4 et 6.5% en NaCl. Elles se caractérisent également par une production d'acétoïne à partir du glucose. Les souches BL1 et BL3 sont pourvues de l'enzyme arginine dihydrolase, contrairement à l'espèce BL2 qui en est dépourvue (ADH-).

### **I.3. Activité antibactérienne des isolats lactiques**

L'évaluation du pouvoir antagoniste des isolats lactiques a été étudié vis-à-vis trois souches cibles, indicatrices d'altération, à savoir *Escherichia coli* (ATCC8739) *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) et *Bacillus cereus*.

L'inhibition se traduit par la formation de zones claires, autour des souches ensemencées par touche. Les diamètres des zones d'inhibitions (Zi) et leurs moyennes sont représentées dans le tableau (5) et la figure (9).

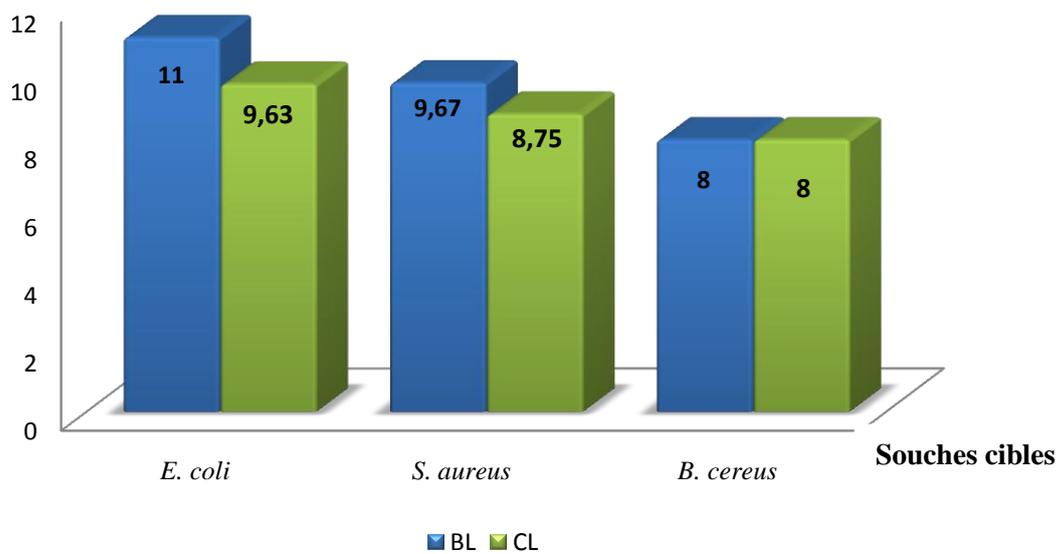
Sur la base des résultats obtenus, il s'avère que tous les isolats possèdent une activité antibactérienne contre *E. coli*, avec des diamètres d'inhibition variant de 08mm pour BL1 et CL2 à 13 mm pour le BL3. Le même résultat est noté pour les sept isolats qui ont exprimés une activité antibactérienne vis-à-vis *S. aureus*, dont l'inhibition la plus élevée est de 11mm enregistrée avec le BL3. Cependant une absence d'inhibition est remarquée avec la souche lactique CL3 vis-à-vis *B.cereus*, cette dernière s'est montrée sensible à l'action du reste des souches lactiques avec un intervalle de 08 à 12mm.

Il faut signaler également que la plus forte activité antibactérienne est observée chez le BL3 contre *E. coli* (13mm).

**Tableau 5 :** Les diamètres des zones d'inhibitions des souches lactiques vis-à-vis des souches pathogènes.

Souches lactiques \ Souches cibles	BL1	BL2	BL3	CL1	CL2	CL3	CL4
<i>E. coli</i>	08	12	13	12.5	08	09	09
<i>S.aureus</i>	09	09	11	10	10	08	07
<i>B.cereus</i>	08	08	08	10	10	00	12

**Diamètre de la zone**



**Figure 9:** Diamètres moyens (mm) des zones d'inhibitions (Zi), des isolats lactiques vis-à-vis des souches pathogènes.

## **II. Discussion**

### **II.1 Identification des souches lactiques**

Afin de vérifier l'activité antagoniste des bactéries lactiques, vis-à-vis certaines bactéries pathogènes, nous avons isolé et identifié des souches à partir d'un lait fermenté type yaourt.

Les résultats de l'identification, selon des critères morphologiques et biochimiques, obtenus ont permis d'avoir une collection de sept souches représentées par deux principaux genres *Lactobacillus* et *Streptococcus*. Nos résultats se rapprochent de ceux cités par plusieurs études menées dans le même contexte que le notre et réalisées sur des produits laitiers tels que les laits crus, les fromages et les yaourts (Badis et al., 2005 ; Bekhouche et Boulahrouf, 2005).

Les résultats de l'identification phénotypique des coques isolés sur milieu M17 et des bacilles sur milieu MRS appartenant probablement au genre *Streptococcus* et *Lactobacillus* respectivement sont similaire à ceux rapportés par E. Hajj Semaan et al ; Guiraud, 2013 ; et par Mechai, 2009 et Bergey's manual, 1994.

L'identification, réalisée par Bekhouche en 2005, de soixante six (66) souches à partir de 18 échantillons de lait cru de vache appartenant à six stations d'élevage de la région de Constantine a permis d'isoler les genres : *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, et *Lactobacillus*. Une autre étude faite par Badis et al. (2004) réalisée sur du lait de chèvre a permis de classer 725 isolats lactiques dans les genres suivants : *Lactobacillus* (31,6%), *Lactococcus* (28,4%), *Leuconostoc* (22,2%), *Streptococcus* (13,7%) et *Pediococcus* (4,1%). Trois genres (*Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Leuconostoc*) ont été identifiés dans le travail portant sur le l'ben et le j'ben marocains en se basant sur des critères morphologiques et biochimiques (Lairini et al., 2014).

### **II.2. Activité antibactérienne des isolats lactiques**

L'étude du pouvoir antagoniste a révélé que les bacilles lactiques (BL) présentent l'activité inhibitrice la plus forte. Elle est dirigée contre *E. coli* avec une moyenne de 11 mm, une activité toutefois supérieure à celle observée contre *S. aureus* (9.67mm) et *B. cereus* (8mm). Ces résultats sont différents de ceux obtenus par Allouche et al, 2010 qui constate que

les lactobacilles sont plus actifs contre les souches Gram positives notamment *S. aureus* et *B. subtilis* avec des zones de 12 et 22mm contre 0 et 19mm pour les souches Gram négatives représentées par *E. coli* 54127 et *E. coli* 105331. Cependant, nos résultats sont conformes aux résultats de Mameche (2008) qui a constaté que les lactobacilles ont une activité inhibitrice sur les bactéries à Gram négatif nettement supérieure à celle observée contre les pathogènes à Gram positif. (Zi)

Les coques lactiques (CL) possèdent également une activité inhibitrice variant de 08 à 12.5mm vis à vis *E. coli* avec une moyenne de 9.63 mm, et une activité caractérisée par une zone de 07 à 10 mm contre *S. aureus* dont la moyenne est de 8.75mm. et une activité contre *B. cereus* avec une (Zi) entre 0 et 12 mm, avec 8Mm de moyenne, sauf pour la souche Cl3 qui n'a pas un effet inhibitrice contre cette dernière.

Ces résultats corroborent parfaitement avec les résultats obtenus par Belarbi (2011) qui constate que les coques lactiques, principalement les genres *Lactococcus*, *Leuconostoc* et *Streptococcus*, ont une activité antagoniste élevée vis-à-vis *E. coli* (de 0 à 24mm) contre *S. aureus* (0 à 16mm).

Mameche (2008) remarque aussi que les coques lactiques ont une activité inhibitrice sur les bactéries à Gram négatif élevée (25mm) comparativement à celle obtenue à l'égard des Gram positives (23mm).

Cette activité antibactérienne des souches lactiques est probablement due à la production de plusieurs agents antibactériens. L'acide lactique par son pouvoir acidifiant du milieu inhibe plusieurs types de bactéries. A cela s'ajoute aussi l'effet du diacétyle connu également par son pouvoir d'inhibition. L' $H_2O_2$  libéré par les souches lactiques inhibe les bactéries qui ne possèdent pas des défenses contre le stress oxydatif. Plusieurs études ont montré l'activité inhibitrice des bactéries lactiques vis-à-vis des bactéries pathogènes suite à la libération de substances de nature protéique, les bactériocines (Tabak. A et Bensoltane. A. 2011 ; Labioui. H et *al.*, 2005; Hajj Semaan. E et *al.*, 2010 ; Mami et *al.*, 2010).



# Conclusion

Depuis l'antiquité, les bactéries lactiques ont été utilisées pour la fabrication et la conservation d'aliments. La découverte de leur action sur le lait fut probablement accidentelle mais leur utilisation fut perpétuée sous forme de ferments et elle est en développement continu en raison des substances naturelles produites par ces bactéries, reconnues d'usage alimentaire, dirigées contre des germes pathogènes (Mami, 2013).

Sur cette base le but principal de cette étude est de mettre en évidence l'activité antagoniste des bactéries lactiques, isolées à partir d'un produit laitier fermenté vis-à-vis certaines bactéries d'altération.

Les cultures sur géloses sélectives ont permis d'isoler (7) souches, notées BL1, BL2, BL3 pour les bacilles lactiques et CL1, CL2, CL3, CL4 pour les coques lactiques, obtenues respectivement sur milieux MRS et M17.

Ces dernières ont fait l'objet d'une étude de leurs différents caractères phénotypiques aboutissant à leur affiliation probable aux genres : *Lactobacillus* et *Streptococcus*. Ces résultats corroborent parfaitement avec ceux menés par certaines études qui montrent la dominance de la flore appartenant à ces deux genres dans le yaourt (Yang et al, 2012)

Il est à noter que l'identification phénotypique basée sur les caractères morphologiques et biochimiques est très limitée. Cependant, l'application des techniques moléculaires reste sans doute le moyen le plus sûr pour une réelle affiliation des souches à leurs vrais taxons.

L'étude de l'activité antibactérienne des souches lactiques isolées, a montré qu'elles sont toutes dotées un pouvoir inhibiteur dirigé contre *E. coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 et *Bacillus cereus*, à l'exception de la souche CL3 qui n'avait aucun effet sur *Bacillus cereus*.

La plus forte activité bactéricide a été observée avec la souche BL3 vis-à-vis *E. coli*. Cette activité est probablement due à la synthèse de substances inhibitrices tels que les acides organiques principalement l'acide lactique, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl et à l'excrétion de bactériocines, connues par leur pouvoir bactéricide ou bactériostatique contre de nombreuses bactéries pathogènes (Allouche, 2010).

En perspectives il serait intéressant d'envisager :

- ✓ L'utilisation des techniques d'identification moléculaires (ARN16s) pour une meilleure description de la biodiversité microbienne du yaourt.
- ✓ Criblage et sélection des souches lactiques à fort pouvoir acidifiant.
- ✓ Mise en évidence de l'activité inhibitrice de ces bactéries par :

- L'étude de la nature des substances inhibitrices sécréter par les souches lactiques sélectionnées ;

- L'extraction et la purification des bactériocines ;

- La détermination des propriétés physicochimiques des bactériocines purifiée.

- Production de bactériocines dans des bioréacteurs pour une exploitation dans le domaine agroalimentaire

# Références bibliographiques

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

**Anonyme. (2013).** (en ligne). Disponible sur : <http://www.quelab.com>.

**Badis A., Laouabdia-Sellami N., Guetarni D., Kihal M., Ouzrout R. (2005).** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales "arabia et kabyle". *Sciences & Technologie C* (23) :30-37.

**Baliarda A. (2003).** Evaluation de la réponse au stress chez les bactéries lactiques appartenant aux genres *Pediococcus* et *Tetragenococcus* approche physiologique et génétique, thèse doctorat, sciences des aliments et nutrition, Université Bordeaux, France, p18.

**Bekhouche F. (2006).** Bactéries lactiques du lait cru de vache et Microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes : 1. Isolement et Identification biochimique. 2. Evaluation et Optimisation de la production d'enzyme polygalacturonase, Thèse : Génie alimentaire, Institut de la nutrition de l'alimentation et des technologies agro-alimentaires, Université Mentouri, Constantine, Algérie, p29, 31.

**Bekhouche F., Boulahrouf A. (2005).** Etudes quantitative et qualitative des bactéries lactiques de lait cru produits par des vaches locales appartenant à six stations d'élevage de Constantine. *Sciences & Technologie C* (23) :38-45.

**Belarbi F. (2011).** Isolement et sélection des souches de bactéries lactiques productrices des métabolites antibactériennes, Magistère : Microbiologie alimentaire et industrielle, Faculté des sciences, université d'Oran.

**Benguella N. (2015).** Recherche de bactériocines produites par les bactéries lactiques isolées du lait de chamelle, Mémoire de Master : Technologie des Industrie Agro-alimentaires, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers, Algérie, p17.

**Branger A., Richer M-M., Roustel S. (2007).** Microbiochimie et alimentation, Edition educagri. Dijon, France, p 184, 187.

**Cenatiempo Y ., Berjeaud JM ., Biet F et al. (1996).** Bactériocines de bactéries lactiques: données récentes sur leur structure, leur mode d'action et leurs déterminants génétiques, *Elsevier/INRA, Lait* (1996) 76,169-177 169.

**Codex alimentarius. (2011).** Lait et produits laitiers, Organisation Mondiale De La Santé, Organisation Des Nations Unies Pour L'Alimentation et L'Agriculture, Deuxième édition, p 06.

**Corrieu G ., Luquet F.M. (2008).** Bactéries lactiques et probiotiques, édition Tec. Et Doc. Lavoisier, Paris France, p9, 10, 25, 51.

**Drider Dj ., Prevost H. (2009).** Bactéries lactiques : Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles, édition ECONOMICA, France, p1, 35, 36, 51, 53, 99

**Dortu C ., Thonart P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques: caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires (2009). Bacteriocins From Lactic Acid Bacteria: Interest For Food Products Biopreservation. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 13(1), 143-154.

**Federighi M. (2005).** Bactériologie Alimentaire, Edition ECONMICA, 2eme édition, p 28.

**Ghozlane Dj. (2012).** Isolement et caractérisation des bactéries lactiques productrices d'arômes (diacétyle), magister : Science Alimentaire, Ecole national supérieure d'agronomie El-Harrach, Algérie, p 30.

**Guillaume P.Y.(2004).**La microbiologie : les tests enzymatiques, antibiotiques et immunologiques, (en ligne).Lyon, France. Disponible sur :

[http://www2.ac-lyon.fr/enseigne/biotech/microbio/tests\\_microbiologie2.htm](http://www2.ac-lyon.fr/enseigne/biotech/microbio/tests_microbiologie2.htm).

**Guiraud JP. (2012).** Microbiologie Alimentaire, édition DUNOD, Paris, France, p 92-139-140-141.

**Guiraud JP ., Rosec M. (2004).** Pratique des normes en microbiologie alimentaire, édition AFNOR, France, p 93, 129.

**Hadef S. (2012).**Evaluation des aptitudes technologiques et probiotiques des bactéries lactiques locales Magister : Microbiologie Appliquée, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et d'Université Kasdi Merbah-Ouargla, Algérie, p 11.

**Hassaine O. (2013).**Caractéristiques d'intérêts technologiques de souches de bactéries lactiques isolées de lait camelin du sud algérien, thèse : Microbiologie appliquée, Université d'Oran, Algérie, p 06-07, 11.

**Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley., Williams S.T. (1994).**Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, édition Williams & Wilkins, 9ème édition, Baltimore, USA, p528-532, 566-573.

**INRA. (2003).** Agrégation de Biochimie - Génie Biologique, France.

**Jasniewski J. (2008).** Etude des mécanismes d'action de bactériocines de la sous-classe Iia, Thèse :Procédés Biotechnologiques et Alimentaires, Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires, Institut National Polytechnique de Lorraine, France,p 155.

**Juillard V., Spinnler H.E., Desmazeaud J., Boquien C.V. (1987).**Phénomènes de coopération et d'inhibition entre les bactéries lactiques utilisées en industrie laitière. Lait, 67(2) : 149-172.

**Kiemptore I. H. A. (2013).** Evolution de la qualité d'un yaourt industriel produit localement et commercialisé sur le marché d'Ouagadougou, Master, Produit d'origine animale, Ecole inter-états des sciences et médecine vétérinaires, Université de Dakar, p 04.

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

**Labioui H., Laaroussi E.M., El yachioui M., Ouhssine M. (2005).**Sélection de souche des bactéries lactiques antibactérienne, *Bull. Soc Pharm, Bordeaux*, France. N°144 237-250.

**Lairini S., Beqqali N., Bouslamti R., Belkhou R., Zerouk F. (2014).** Isolement des bactéries lactiques à partir des produits laitiers traditionnels Marocains et formulation d'un lait fermenté proche du Kéfir, *Afrique science*, N° 10(4) (2014) 267-277.

**Leksir Ch. (2012).** Caractérisation et contrôle de la qualité de ferments lactiques utilisés dans l'industrie laitière algérienne, Magister : Sciences Alimentaires, Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-alimentaires, Université Mentouri de Constantine, p 05,07, 20-23.

**Léonard L. (2013).** Evaluation du potentiel bioprotecteur de bactéries lactiques confinées dans une matrice polymérique, Thèse : Sciences de l'Alimentation, Université de Bourgogne, France, p8-10, 13-15, 17-18.

**Madigan M., Martinko J. (2007).** Biologie des microorganismes, édition Pearson Education, France, 11<sup>e</sup> édition, p1019.

**Makhloufi K.M. (2011).** Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza, Thèse : Microbiologie .Biochimie, Ecole doctorale iViv, Université Pierre et Marie Curie, France, p 05-07, 18 , 20, 79.

**Mameche-Doumandji A. (2008).** Purification et caractérisation de bactériocine produite par des bactéries lactiques autochtones isolées, thèse : sciences alimentaires, institut national agronomique, Algérie, p 14.

**Mami A. (2013).** Recherche des bactéries lactiques productrices de bactériocines à large spectre d'action vis-à-vis des germes impliqués dans les toxi-infections alimentaires en Algérie, Thèse : Microbiologie appliquée, université d'Oran, Algérie, p25.

**Mami A., Kihal M., Hamedi A.R ., Henni J.E ., Kerfouf A. (2010).** Antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* isolated from algerian raw goat's milk against *Staphylococcus aureus*, *les technologies de laboratoire*, 2010, volume 5, N° 21.

**Matamoros S. (2008).** Caractérisation de bactéries lactiques psychrotrophes en vue de leur utilisation dans la biopréservation des aliments. Étude physiologique et moléculaire des mécanismes d'adaptation au froid, Thèse : Biotechnologies agroalimentaires, sciences de l'aliment, Faculté des sciences et techniques, Université de Nantes, France, p 189.

**Mechai A. (2009).** Isolement, caractérisation et purification de bactériocines produites par des bactéries lactiques autochtones: études physiologiques et biochimiques, Thèse : Faculté des sciences, Université Badji-Mokhtar- Annaba, Algérie, p 05, 12, 13, 92-95.

**Oucherif Kh ., Sellema M. (2015).** Etude des substances antimicrobiennes (type bactériocine) des bactéries lactiques isolées à partir d'un produit laitier fermenté traditionnel (J'ben), Master : Microbiologie Appliquée, Science de la Nature et de la Vie, Université Kasdi Merbah, Ouargla, Algérie, p 112.

**Paci Kora E. (2004).** Interactions physicochimiques et sensorielles dans le yaourt brassé aromatisé : quels impacts respectifs sur la perception de la texture et de la flaveur, thèse : science des aliments, institut national agronomique, Paris, France, p17.

**Raimbault M. (1995).** Importance des bactéries lactiques dans les fermentations du manioc, Transformation Alimentaire du Manioc. T. Agbor Egbe, A. Brauman, D. Griffon, S. Trèche (éd) O 1995, éditions ORSTOM.

**Savadogo A., Traore AS. (2011).** La flore microbienne et les propriétés fonctionnelles des yaourts et laits fermentés, *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 5(5): 2057-2075.

**Scuotto A. (2016).** Contribution à l'étude des agrégats bifides : sélection, caractérisation, mécanisme et prévention du diabète de type 1, Médecine humaine et pathologie, Université du la droit et de la santé, Lille II, France, p30-31.

**SYNDIFRAIS. (2011).** Tout savoir sur le yaourt, p 20-22, (en ligne). Disponible sur : [www.syndifrais.org](http://www.syndifrais.org)

**Tabak S., Bensoltane A. (2012).** L'activité antagoniste des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* et *Lactobacillus bulgaricus*) vis à vis de la souche *Helicobacter pylori* responsable des maladies gastroduodénales, *Nature & Technologie* 6 :71-79. 123.

**Tadesse G., Ephraim E., Ashenafi M. (2004).** Assessment of the antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Borde and Shamita, traditional Ethiopian fermented beverages, on some food borne pathogens and effect of growth medium on the inhibitory activity, *Internet Journal of Food Safety* V (5) 13-20.

**Yang E., Fan L., Jiang Y., Doucette C., Fillmore S. (2012).** Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts, *Express* 2012, 2:48 (en ligne). Disponible sur : <http://www.amb-express.com/content/2/1/48>.

# Annexes

## Annexes

### Annexe 1 : Composition des milieux d'isolement

#### - Milieu MRS (Bouillon et gélose)

Peptone.....	10g
Extrait de viande.....	8g
Extrait de levure.....	4g
Acétate de sodium.....	5g
Phosphate bipotassique.....	2g
Citrate d'ammonium.....	2 g
Sulfate de magnésium, 7H <sub>2</sub> O.....	2 g
Sulfate de manganèse, 4H <sub>2</sub> O.....	0.05 g
Glucose.....	20 g
Tween 80.....	1ml
Agar (dans le cas de la gélose).....	15 g
Eau distillée.....	1000 ml

pH 6,8

Autoclavage 20 min à 120 °C

#### - Milieu M17 (Bouillon et gélose)

Tryptone.....	2,5 g
Peptone pepsique de viande .....	2,5 g
Peptone papaïnique de soja .....	5 g
Extrait autolytique de levure.....	2,5 g
Extrait de viande .....	5 g
Lactose .....	5 g
Glycérophosphate de sodium .....	19 g
Sulfate de magnésium .....	0,25 g
Acide ascorbique .....	0,5g
Agar agar bactériologique (dans le cas de la gélose).....	15g

Eau distillée.....1000ml

pH 7,1

Autoclavage 20 min à 120 °C

## **Annexe 2 : Composition des milieux utilisés pour l'identification biochimique**

### **- Milieu Mannitol-mobilité**

Peptone tripsique de viande.....10 g/l

Mannitol..... 7.5 g/l

Nitrate de potassium..... 1 g/l

Rouge de phénol..... 0.04 g/l

Agar .....4 g

Eau distillée .....1000 ml

pH7.6

Autoclavage à 120°C pendant 20 mn

### **- Milieu T.S.I (tripl sugar iron )**

Peptone..... 20 g

Agar..... 12 g

Lactose.....10 g

Saccharose .....10 g

NaCl.....5 g

Extrait de viande.....3 g

Extrait de levure..... 3 g

Glucose.....1 g

Citrate ferrique.....	0.3 g
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	0.3 g
Rouge de phénol.....	0.025 g

pH 7.4

Autoclavage à 120°C pendant 20mn.

- **Bouillon hypersalé (Leveau et al ; 1991)**

Glucose .....	5 g
Extrait de viande.....	5 g
Peptone .....	15 g
NaCl .....	40 / 65 g
Eau distillée .....	1000ml

Autoclavage à 120°C pendant 20 mn.

- **Milieu Clark et Lubs**

Peptone .....	7 g
Phosphate dipotassique .....	5 g
Glucose .....	5 g
Eau distillée .....	1000 ml

pH 7

Autoclavage 20 mn à 120°C.

- **Milieu de Moëller à l'arginine**

Peptone .....	5 g
Extrait de viande.....	5 g
Glucose .....	0.5 g
Pyridoxal .....	5 mg
Pourpre de bromocresol .....	0.1 g
Rouge de crésol .....	5 mg
Arginine .....	10 g
Eau distillée .....	1000 ml

pH 6.8

Autoclavage à 120°C pendant 15 à 20 mn

**Annexe 3 : Colorants de la coloration de Gram**

- **Fushine**

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

- **Lugol**

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

- **Violet de gentiane**

Violet de gentiane.....	1g
Ethanol a 90%.....	10ml
Phénol.....	2g
Eau distillée.....	100ml

## Résumé

Cette étude a été inspirée des problèmes rencontrés dans l'industrie laitière et illustre l'importance antibactérienne des bactéries lactiques vis-à-vis des germes d'altération.

Sept (7) souches notées : BL1, BL2, BL3 pour les bacilles lactiques et CL1, CL2, CL3, CL4 pour les coques lactiques, ont été isolées à partir du yaourt brassé du groupe « SOUMMAM » commercialisé en Algérie, sur milieux sélectifs MRS et M17. L'identification basée sur des caractères morphologiques et biochimiques a permis de rattacher les isolats aux genres suivants: *Lactobacillus* (BL1, BL2, BL3) et *Streptococcus* (CL1, CL2, CL3, CL4).

Les résultats de l'activité antibactérienne indiquent que les souches lactiques isolées ont toutes un effet inhibiteur contre les germes pathogènes testés à savoir *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Bacillus cereus* et *Escherichia coli* (ATCC 8739), excepté pour la souche CL3 qui n'avait pas d'effet sur *Bacillus cereus*.

La souche BL3 appartenant au genre *Lactobacillus* a été caractérisée par la plus forte activité bactéricide notamment contre *Escherichia coli*. Cette activité est probablement due à la synthèse de substances inhibitrices par les souches lactiques telles que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyle et les bactériocines, connues par leur pouvoir antagoniste contre de nombreuses bactéries pathogènes.

**Mots clés:** Bactéries lactiques, Yaourt, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, Activité antibactérienne, Germes pathogènes.

## Summary

This study was inspired by the problems encountered in the dairy industry and illustrates the antibacterial importance of lactic acid bacteria to weathering organisms.

Seven (7) strains: BL1, BL2, BL3 for lactic bacilli and CL1, CL2, CL3, CL4 for lactic shells were isolated from the stirred yoghurt of the group "Soumam", marketed in Algeria, on selective media MRS and M17. Identification based on morphological and biochemical characteristics allowed the isolates to be attached to the following genera: *Lactobacillus* (BL1, BL2, BL3) and *Streptococcus* (CL1, CL2, CL3, CL4).

The results of the antibacterial activity indicated that the isolated lactic strains all had an inhibitory effect against the pathogenic organisms tested, namely *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Bacillus cereus* and *Escherichia coli* (ATCC 8739), except for the CL3 strain, had no effect on *Bacillus cereus*. This activity is probably due to the synthesis of inhibiting substances by lactic strains such as organic acids, hydrogen peroxide, carbon dioxide, diacetyl and bacteriocins, which play an important role in the bioconservation of food.

**Key words:** Lactic acid bacteria, yoghurt, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, antibacterial activity, pathogenic germs.

## ملخص

استلهمت هذه الدراسة من المشاكل التي تواجهها صناعة الألبان و التي توضح أهمية بكتيريا حمض اللاكتيك المضادة للميكروبات المسببة للتلف.

قمنا بعزل سبع (7) سلالات : BL1, BL2, BL3 من العصيات اللبنية و CL1, CL2, CL3, CL4 من المكورات اللبنية , وتحديدًا من الياغورت المسوق في الجزائر "SOUMMAM" على وسط انتقائي MRS و M17. التحديد على أساس الخصائص المورفولوجية والبيوكيميائية يسمح بالتوجه نحو الأنواع: العصيات اللبنية (BL1, BL2, BL3) والمكورات اللبنية (CL1, CL2, CL3, CL4).

وتشير نتائج النشاط المضاد للبكتيريا أن السلالات اللبنية المعزولة كلها لها تأثير كابح ضد الكائنات المسببة للأمراض المجربة : المكورات العنقودية الذهبية (ATCC 6538) ، العصيات الشمعية، الاشريشيا القولونية (ATCC 8739), باستثناء السلالة CL3 التي لم يكن لها تأثير على العصيات الشمعية.

السلالة BL3 التي تنتمي إلى نوع العصيات اللبنية تتميز بأعلى نشاط مضاد للجراثيم خاصة ضد الاشريشيا القولونية. ومن المرجح أن هذا النشاط يرجع للمواد المثبطة التي تفرزها السلالات اللبنية في البيئة مثل الأحماض العضوية، بيروكسيد الهيدروجين، ثنائي الأسيتيل وbactériocines، المعروفة بنشاطها المضاد للعديد من البكتيريا المسببة للأمراض .

**كلمات البحث:** بكتيريا حمض اللاكتيك، ياغورت ، المكورات اللبنية، العصيات اللبنية، النشاط المضاد للبكتيريا ، الجراثيم المسببة للإمراض.

**Etude de l'activité antibactérienne de bactéries lactiques  
isolées à partir d'un produit laitier fermenté :  
le yaourt brassé.**

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie générale.

**Résumé**

Cette étude a été inspirée des problèmes rencontrés dans l'industrie laitière et illustre l'importance antibactérienne des bactéries lactiques vis-à-vis des germes d'altération.

Sept (7) souches notées : BL1, BL2, BL3 pour les bacilles lactiques et CL1, CL2, CL3, CL4 pour les coques lactiques, ont été isolées à partir du yaourt brassé du groupe « SOUMMAM » commercialisé en Algérie, sur milieux sélectifs MRS et M17. L'identification basée sur des caractères morphologiques et biochimiques a permis de rattacher les isolats aux genres suivants: *Lactobacillus* (BL1, BL2, BL3) et *Streptococcus* (CL1, CL2, CL3, CL4).

Les résultats de l'activité antibactérienne indiquent que les souches lactiques isolées ont toutes un effet inhibiteur contre les germes pathogènes testés à savoir *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Bacillus cereus* et *Escherichia coli* (ATCC 8739), excepté pour la souche CL3 qui n'avait pas d'effet sur *Bacillus cereus*.

La souche BL3 appartenant au genre *Lactobacillus* a été caractérisée par la plus forte activité bactéricide notamment contre *Escherichia coli*. Cette activité est probablement due à la synthèse de substances inhibitrices par les souches lactiques telles que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyle et les bactériocines, connues par leur pouvoir antagoniste contre de nombreuses bactéries pathogènes.

**Mots clés:** Bactéries lactiques, Yaourt, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, Activité antibactérienne, Germes pathogènes.

**Laboratoire de recherche :** .....

Jury d'évaluation :

**Présidente du jury :** ABDEALZIZ W. (MA - UFM Constantine),

**Rapporteur :** BOULTIFAT L. (MA - UFM Constantine),

**Examineur :** MEZIANI M. (MA- UFM Constantine).