

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université Ibn Khaldoun–Tiaret**  
**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département des Sciences de la Nature et de la Vie**



**Mémoire de fin d'études**

**En vue de l'obtention du diplôme de Master académique**

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

**Filière : Sciences Biologiques**

**Spécialité : Microbiologie Appliquée**

**Présenté par :**

*AMEUR Ahlem*

*DELLA Rania*

*DJELIL Houria*

**Thème**

**Screening des bactéries lactiques productrices des bactériocines isolées à partir du  
Colostrum et caractérisation de leur activité antimicrobienne vis- à- vis des  
souches cliniques**

**Soutenu publiquement le : 12/07/2021**

**Jury Grade**

**Président: Dr. YEZLI W. MCA , faculté SNV , Université IBN khaldoun,Tiaret**

**Encadrant:Dr. LARADJ ZAZOU K.MAA, faculté SNV, Université IBN Khaldoun, Tiaret**

**Examineur: Dr. MEDJBER N.MCB, faculté SNV, Université IBN Khaldoun, Tiaret**

**Année universitaire 2020-2021**

## **Remerciement**

*On remercieur dieu tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce travail.*

*Au terme de ce travail, on tient à exprimer notre profonde gratitude notre cher professeur et encadrant Mme. LARADJ ZAZOU K. pour son suivi et son énorme soutient, on le remercieur pour la qualité de son encadrement, Sa rigueur et sa patience*

*Nos vif remerciements vont aux membres de jurys pour avoir accepter de juger notre présent travail :*

*Monsieur le professeur **YEZLI. W** de nous avoir honorés de présider le jury de la soutenance.*

*Madame professeur **MEDJBER N** d'avoir bien accepter d'examiner le contenu du présent travail.*

*Nos remerciements s'adressent à Mme. MOULAY.M et Mme.BENGUIAR R. pour leurs soutient et ses encouragements*

*Nos remerciements s'adressent également à tous nos professeurs pour leurs générosités et la grande patience durant tout notre parcours d'étude dont ils ont su faire preuve malgré leur charge académique et professionnelle.*

## *Dédicace*

*Je dédie ce travail à*

*Mon père Mr. AMEUR Abdelkader Tu es un pilier solide et  
incontournable pour ma personne et mon parcours, que Dieu te  
donne la santé et longue vie*

*Ma mère, Que ce travail soit pour toi le témoignage de mon  
infinie reconnaissance pour ton aide précieuse et toutes ces  
années de compréhension*

*A ma grand-mère*

*A mon beau père et ma belle mère*

*Mon cher mari Mr. BENALI Mounir Pour ton soutien et ta  
compréhension*

*Ma cher petite fille AcileRahaf qui a illuminé ma vie*

*A mes sœur Wacila, Habiba, Sabrina, Kartima, Soumia.*

*Mes cher frères Yacin ,Khalfallha, Aziz*

*Mes beaux frères*

***AmeurAhlem***

## *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail à celle qui m'a donné à la vie, qui 22 sacrifier pour mon bonheur et réussite, à ma mère....*

*A ma grand-mère qui a croyait toujours en moi et pour son énorme soutient.*

*A mon père qui a m'encouragé et à me protéger.*

*A mon mari qui m'a toujours soutenu et à ma petite princesse Aïcha ...*

*A mes adorables sœurs*

*A ma belle famille*

*A tous ce qui m'aiment*

***Dellaa Rania***

## *Dédicace*

*Avant tout je remercie Dieu le tout puissant de m'avoir donné la force, le courage, la santé, surtout la patience pour pouvoir produire ce modeste travail.*

*Un immense merci à mes très chers parents, tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous apporte.*

*Je tiens à adresser mes remerciements à Madame Zazou pour sa précieuse collaboration.*

*Un très grand merci à mes chères sœurs adorées : Souria Ikram Samia Nada el rayhane Riham .*

*À mes très belle chères frères : Abdelkader Wadah Moulay Abdel aziz siradj.*

*Je tiens à*

*Remercie mes amis et mes collègues.*

*Djelil Houria*

## **Résumé :**

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes naturellement présents dans colostrum et le lait, due à leurs propriétés de produire des substances antimicrobiennes, elles sont utilisées dans la fermentation et dans la bio préservation des aliments.

Dans cette étude, la recherche des souches de bactéries lactiques a été entreprise à partir du colostrum de chèvre et de vache.

Le screening primaire des bactéries lactiques à partir du colostrum de chèvre et de vache a permis d'obtenir 3 souches (Gram +, catalase -) qui ont été purifiées et conservées.

L'étude des caractéristiques phénotypiques, biochimique et physiologique (Type fermentation, croissance en présence NaCl 3,5%, croissance à pH 4,8 et pH 6,5, test de croissance à différentes températures 30°C, 37°C et 45°C) on permis une pré-identification de : *Lactococcus* sp., *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp.

La souche lactique isolée *Lactococcus* sp. a été testée pour son effet antibactérien contre une souche clinique *Entérocooccus faecalis* ATCC29212, l'interaction de notre souche lactique et *Entérocooccus faecalis* a donné des résultats positifs traduits par des zones d'inhibition de la croissance de la souche clinique.

**Mots clés** : Bactéries Lactiques, *Lactococcus* sp., *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp., inhibition

## **Abstract:**

Lactic acid bacteria are microorganisms naturally present in colostrum and milk, have the property of producing antimicrobial substances and they are used in fermentation and biopreservation of foods.

The research of lactic acid bacteria strains has been undertaken from goat and cow colostrum.

The isolation of lactic acid bacteria from goat and cow colostrum allowed us to obtain 3 strains (Gram +, catalase -) which were purified and preserved. The study of phenotypic, biochemical and physiological characteristics (fermentation type, growth in the presence of NaCl 3.5%, growth at pH 4.8 and pH 6.5, growth test at different temperatures 30°C, 37°C and 45°C) allowed a pre-identification of: *Lactococcus sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Streptococcus sp.*

*Lactococcus sp.* Was tested for its antibacterial effect against *Enterococcus faecalis* ATCC29212, the interaction of our lactic strain and *Enterococcus faecalis* gave positive results observed by zones of inhibition.

**Key words:** Lactic acid bacteria, *Lactococcus sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Streptococcus sp.*

Interaction.

## الملخص :

بكتريا حامض اللاكتيك هي كائنات دقيقة متواجدة طبيعيا في اللبأ و الحليب ، ولها خاصية إنتاج مواد مضادة للميكروبات فهي تستخدم في التخمير و حفظ الأغذية إن البحث عن سلالات بكتيرية منتجة للمواد المضادة للميكروبات قد تم على مستوى لبي الماعز و البقر .

عزل بكتيريا حمض اللاكتيك من لبي الماعز و البقر قد سمح لنا للحصول على 3 سلالات (موجبة الصبغ لغرام ، سالبة الكتلاز) التي تم تنقيتها و تخزينها

دراسة الخصائص المظهرية البيوكيميائية والفيزيولوجية ( نوع التخمر ، النمو في وسط يحتوي على كلوريد الصوديوم بتركيز 3,5% , النمو في وسط حامضي و معتدل ، و اختبارات نمو في درجات حرارة مختلفة 30, 37, 45 درجة مئوية)مكننا تقريبا من تحديد اختبار لاكتو كوكوس ل لاكتو بسيليسوسترا بتوكوكوس لتثنيها المضاد للبكتيريا ضد أونتيروكوكوس فيكالييس التفاعل بين سلالتنا واونتيروكوكوس فيكالييس اعطتنا نتائج ايجابية يمكن ملاحظتها عبر مناطق تشبيط.

**الكلمات المفتاحية : *Lactococcus* sp., *Lactobacillus* sp., *Streptococcus***



**Table des matières :**

<b>Liste des figures</b>	
<b>Liste des tableaux</b>	
<b>Liste des abréviations</b>	
Introduction .....	1
Synthèse bibliographique	
I. Colostrum de vache et de chèvre : .....	4
<b>I.1. Colostrum.....</b>	<b>4</b>
I.1.1. Définition .....	4
I.1.2. Caractéristiques nutritionnelles de Colostrum .....	4
II. Bactéries lactiques .....	5
II.1. Définition et caractères généraux .....	5
II.2. Taxonomie : .....	6
II.3. Propriétés technologiques : .....	6
<b>II.4. Les substances antimicrobiennes : .....</b>	<b>8</b>
II.4.1. Les acides organiques : .....	8
II.4.2. Peroxyde d'hydrogène : .....	8
II.4.3. Dioxyde de carbone : .....	8
II.4.4. Diacétyl : .....	9
II.4.5. Reutéline : .....	9
<b>II.5. Les bactériocines : .....</b>	<b>9</b>
II.5.1 Classification des bactériocines : .....	10
<b>II.6. Mécanisme d'action : .....</b>	<b>10</b>
III. Matériel et Méthodes : .....	13
<b>1. Matériels utilisé .....</b>	<b>13</b>
<u>1.1.</u> Matérielle biologique : .....	13
<b>a.Colostrum de vache : .....</b>	<b>13</b>
<b>b. Colostrum de chèvre : .....</b>	<b>14</b>
1.2. Milieux de culture : .....	15
<u>1.2.</u> Produits chimiques et réactifs : .....	15
<u>1.3.</u> Appareillage et autres : .....	15

<b>2. Méthodes :</b> .....	<b>16</b>
2.1. Isolement et culture de la flore lactique :.....	16
2.2. Purification des isolats de bactéries lactiques :.....	18
2.3. Conservation des isolats : .....	18
2.4. Caractérisation morphologique :.....	19
2.5. Tests biochimiques et physiologiques : .....	20
<b>3-Identification biochimiques des isolats lactiques</b> .....	<b>21</b>
4. La détermination des profils de sensibilité aux antibiotiques : .....	22
<b>5. La détermination des profils de sensibilité aux antibiotiques des souches lactiques :</b> ..Erreur ! Signet non défini.	
<b>6. Revivification des souches lactiques :</b> .....	Erreur ! Signet non défini.
<b>7. Étude de l'activité antibactérienne des souches lactique :</b> .....	<b>23</b>
IV. Résultat : .....	27
<b>1. Isolement :</b> .....	<b>27</b>
<b>2. Caractérisation morphologique :</b> .....	<b>27</b>
a. Aspect macroscopique :.....	27
b. Aspect microscopique : .....	29
c. Test catalase : .....	30
<b>3. Test biochimique et physiologique</b> .....	<b>30</b>
a. Croissance a différente température : .....	30
<b>4.Résultat d'Identification biochimiques des isolats lactiques :</b> .....	<b>33</b>
<b>5. Étude de l'activité antimicrobienne des souches lactiques :</b> .....	<b>33</b>
V. Discussion :.....	34
Conclusion: .....	38
Références bibliographies:.....	40
Annexe :Compositionde milieu de culture ettampon .....	46

## Liste des figures

N° de figure	Titre	Page
<b>Figure 1</b>	Arbre phylogénique des bactéries lactiques avec les genres <i>Aerococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Listeria</i> et <i>Staphylococcus</i> (Axelsson, 2004)	<b>06</b>
<b>Figure 2</b>	Échantillonnage de colostrums de vache	<b>14</b>
<b>Figure 3</b>	Les dilutions décimales à partir d'une solution mère (colostrum)	<b>17</b>
<b>Figure 4</b>	Boîtes de Pétri dans la jarre d'anaérobiose	<b>18</b>
<b>Figure 5</b>	Souches lactiques conservé à courte durée	<b>19</b>
<b>Figure 6</b>	Souches lactiques conservé à long terme	<b>20</b>
<b>Figure7</b>	Aspect des colonies des souches Lactique isolées sur milieu MRS solide 1	<b>28</b>
<b>Figure8</b>	Aspect macroscopique après purification des colonies des souches Lactique isolées sur milieu MRS solide	<b>29</b>
<b>Figure9</b>	Observation microscopique des souches isolées à partir du colostrum de vache et chèvre après coloration de Gram (G×100}	<b>30</b>
<b>Figure10</b>	Résultat de la résistance des isolations aux pH4 et pH6	<b>32</b>
<b>Figure 11</b>	Résultat de la résistance des souches aux milieux hypersalé 3,5%	<b>32</b>
<b>Figure 12 -13</b>	Photos illustrations du test de recherche de type fermentaire des bactéries lactiques (milieu de culture MRS glucosé et muni d'une cloche de durham)	<b>33</b>
<b>Figure 14</b>	Inhibition obtenue par méthode de Fleming (1975) par souche <i>Lactococcus</i> contre <i>Entéroccoccusfaecalis</i> ATCC29212	<b>34</b>

## Liste des tableaux

<b>N° de tableaux</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>Tableaux 1</b>	Classification des bactériocines (Papagianni, 2003)	<b>10</b>
<b>Tableaux 2</b>	Illustration des critères morphologique et microscopique des bactéries lactiques isolées du colostrum	<b>30</b>
<b>Tableaux 3</b>	Présentation des caractères physiologique des souches Lactique isolées	<b>31</b>

## Liste d'abréviation :

**S1 ,2, 3** : Souche 1,2 ,3

**M.o** : microorganismes

**Lb** : Lactobacillus

**Lc** : Lactococcus

**BL** : Bactérie Lactiques

**MRS** : Man-Rogosa-Sharp

**Sp** : espèce non précise

**Spp** : sous espèce

**ATCC** : American Type Culture Collection

**D.O** : Densité optique

**UFC** : Unité formant colonie

**ADH** : Arginine dihydrolase

**ONPG** : Ortho-nitrophényl- $\beta$ -galactoside

# *INTRODUCTION*

L'utilisation des antibiotiques contre les diverses pathologies et intoxication alimentaires à conduit à l'émergence du phénomène d'antibiorésistance menaçant la santé publique.

Pour faire face à ce problème, les études récentes se sont orientées vers la recherche de substances naturelles comme les bactériocines produites par les bactéries lactiques qui ont la propriété de réduire considérablement la présence des microorganismes indésirables et nuisibles.

Le colostrum contient de nombreux types de constituants bio-fonctionnels, notamment des facteurs de croissance, des composés antimicrobiens et des composants immunisés, ainsi que des nutriments tels que la caséine, le lactose, les lipides, les vitamines et les minéraux (**Nakamura et al., 2003**).

Les bactéries lactiques forment un groupe de bactéries bénéfiques pour l'homme. Elles sont utilisées depuis des millénaires dans la production de nombreux aliments. Par leurs différentes propriétés technologiques, elles contribuent à la texture, ainsi qu'à la saveur des aliments, notamment par la production de composés aromatiques, elles améliorent la conservation de l'aliment par l'abaissement du pH et la production de plusieurs métabolites ayant un effet antimicrobien (**Piard&Desmazeaud, 1991; Dortu&Thonart, 2009; Moraes et al., 2010.**) (2)

Les bactériocines sont des peptides produites par des genres bactériens possédant des activités antimicrobiennes spécifiques contre les bactéries des espèces apparentées, sans être létales à la souche productrice (**Bayoubet al ,2006**). Actuellement, elles sont utilisées pour le bio-contrôle de divers agents responsables de toxi-infectieux alimentaire : les *Staphylococcus aureus*, listériose monocytogène , *Escherichia coli* , *Salmonella spp* , *clostridium botulinum* ( **Hampikyan et al ., 2009 ; Gao et al., 2008** )

Dans ce contexte, ce travail de mémoire avait pour objectif :

- Screening des bactéries lactiques du colostrum des mammifères (vache, chèvre)
- La mise en évidence de l'activité antagoniste des souches de bactéries lactiques vis-à-vis de certaines souches pathogènes.
- Optimisation des paramètres de croissance des souches des bactéries lactiques isolées à partir du colostrum

*Partie I*  
*Synthèse Bibliographique*

## I. Colostrum de vache et de chèvre

### I.1. Colostrum

#### I.1.1. Définition

Le colostrum est le premier aliment naturel du nouveau-né. Fournisseur de nutriments essentiels tels qu'acides aminés, acides gras, vitamines et minéraux, le colostrum apporte également d'importantes molécules bioactives essentielles à des fonctions spécifiques. Parmi ces molécules, les principales sont des promoteurs de croissance, des facteurs immuno modulateurs ainsi que des facteurs antimicrobiens qui protègent le nouveau-né contre les infections et les agressions de son environnement **(Boudry *et al.*, 2009)**.

#### I.1.2. Caractéristiques nutritionnelles de Colostrum

Les avantages nutritionnels du colostrum ont été largement documentés **(Houser *et al.*, 2008)**. Le colostrum de la vache contient des taux plus élevés de vitamines, notamment de 222666D-carotène, vitamines A, E, D et B; il contient également plus de minéraux (sels de fer, de magnésium et de sodium) et moins de matières grasses et de glucides que le lait normal. Il se caractérise avant tout par une teneur élevée en protéines totales (15,4-15,7%), composée en majorité  $\alpha$ -lactalbumin ( $\alpha$ -La),  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -Lg) et notamment d'IgG1, d'IgG2, d'IgM et d'IgA, de peptides (lactoferrine, transferrine), hormones (insuline, prolactine, d'hormones thyroïdiennes, cortisol) et de facteurs de croissance **(Bernabucci *et al.*, 2013)**.

#### I.1.3. Substances antimicrobiennes du Colostrum bovin

La lactoperoxydase, la lactoferrine et le lysozyme sont les facteurs antibactériens les plus décrits du colostrum bovin. La lactoperoxydase est une enzyme naturelle qui catalyse l'oxydation des thiocyanates en présence de peroxyde d'hydrogène induisant la production de composés actifs à large activité antibactérienne. La lactoferrine, en captant le fer libre, exerce une action bactériostatique sur les bactéries dans l'intestin. Finalement, le lysozyme est une enzyme ayant pour substrat la couche de peptidoglycane de la paroi des cellules bactériennes entraînant la lyse de celles-ci **(Boudry *et al.*, 2009)**.



## II. Bactéries lactiques

### II.1. Définition et caractères généraux

Les bactéries lactiques sont des cellules vivantes(unicellulaire), procaryotes, Gram-positives, hétérotrophes et chimio-organotrophes. Elles sont le plus souvent immobiles, non sporulées, catalase négative, oxydase négative, anaérobies facultatives, micro aérophile, Ces bactéries peuvent avoir des formes de bâtonnet ou de coque (**Savado et Traore, 2011**).

Les bactéries lactiques ont en commun la capacité de fermenter les sucres en acide lactique. Certaines sont dites homo-fermentaires car elles produisent très majoritairement de l'acide lactique alors que d'autres sont dites hétéro-fermentaires et produisent de l'acide lactique en même temps que d'autres composés (acétate et éthanol En général) (**Drouault et Corthier,2001**).

Les bactéries lactiques colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, la viande, les végétaux et les céréales et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale (**Dortu et Thonart, 2009**).

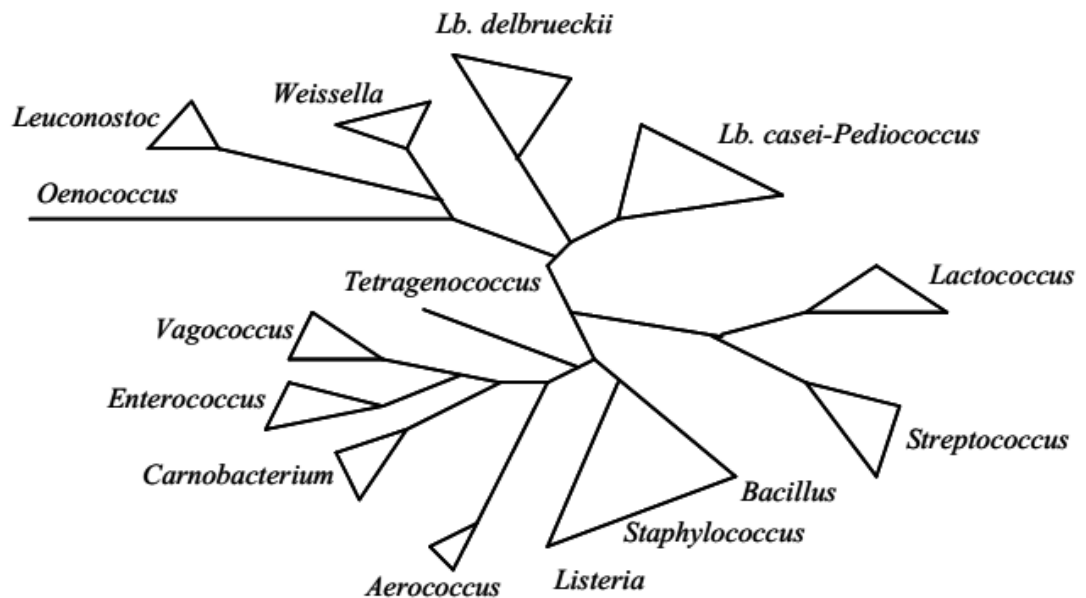
Elles contribuent à la texture, à la saveur des aliments et à la production de composés aromatiques (**Tailliez, 2001**). Mais aussi contribuent à l'amélioration de la durée de vie des aliments et la sécurité en produisant plusieurs métabolites antibactériens (**Belgacemetal., 2008**).

Les bactéries lactiques utilisées dans l'alimentation sont considérées comme non pathogènes et se voient attribuer le qualificatif anglo-saxon d'organismes GRAS (**Generally Regarded As Safe**)

## II.2. Taxonomie

La classification phénotypique des bactéries lactiques est fondée sur la morphologie, la croissance à différentes températures, le mode de fermentation des sucres, la capacité de croissance à différentes concentrations de sel, la tolérance aux pH acides et alcalins.

La configuration de l'acide lactique, l'hydrolyse de l'arginine et la formation d'acétoïne. Par ailleurs, une classification selon la composition de la paroi cellulaire (de Ambrosini et al., 1996) incluant la nature des acides gras qui la composent, a été proposée (Gilarová et al., 1994 ; König & Fröhlich, 2009).



**Figure 1.** Arbre phylogénique des bactéries lactiques avec les genres *Aerococcus*, *Bacillus*, *Listeria* et *Staphylococcus* (Axelsson, 2004).

## II.3. Propriétés technologiques

### a. Capacité acidifiante

Le taux de développement acide est un facteur critique dans les fermentations du lait. Une acidification rapide de la matière première empêche la croissance de microorganismes

indésirables (De Vuyst, 2000). La réduction du pH et la production d'acides organiques (lactate, acétate) sont les principales actions inhibitrices des bactéries lactiques. Peu de bactéries sont capables de se développer à des valeurs de pH atteintes par l'action de bactéries lactiques (**Mayra-Makinen et Bigret, 2004**).

#### **b. Capacité texturant**

Certaines souches de bactéries lactiques ont la capacité de synthétiser des exopolysaccharides (EPS) qui jouent un rôle important dans la texture et la rhéologie des produits transformés. La présence de ces souches productrices d'EPS dans les produits fermentés présente un intérêt technologique important pour les différentes industries La fermentation, notamment laitière. Elles permettent ainsi d'améliorer la texture (**Ricciardi&Clement , 2000**), de diminuer la synérèse et d'augmenter la viscosité et l'onctuosité du produit. Les EPS ont la capacité de retenir les molécules d'eau et de diminuer la séparation du lactosérum et des caséines coagulées du lait. Leur présence dans les yaourts améliore leur homogénéité(**Desmazeaud, 1990**).

#### **c. Capacité aromatisant**

Les bactéries lactiques contribuent à l'arôme et à la saveur des produits fermentés. Ils acidifient les aliments, donnant un goût acidulé d'acide lactique (**Leroy et De Vuyst, 2004**). Le système protéolytique a également une importance industrielle car, en plus de permettre la croissance, les peptides, les acides aminés et leurs dérivés sont également connus pour contribuer à la formation de la texture et de la saveur des produits laitiers fermentés (**Savijokietal., 2006**).

#### **d. Effet sur la santé (caractère probiotique)**

Parmi les nombreuses définitions formulées au cours des dernières décennies, on peut retenir celle qui présente les probiotiques comme des microorganismes vivants, qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent un effet potentiellement bénéfique sur la santé de l'hôte (**FAO/OMS, 2001**). Beaucoup de travaux ont mis en évidence les bienfaits des

probiotiques sur la santé humaine (**Gibson *et al.*, 1998 ; Amaraa&Shiblb, 2015 ; Bultosa, 2016; Zuppaet *al.*, 2016**).

#### **II.4. Les substances antimicrobiennes**

Les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyl et les bactériocines (**Dortu et Thonart, 2009**).

##### **II.4.1. Les acides organiques**

En général, la production d'acides organiques permet une acidification du milieu qui peut limiter la croissance de certaines bactéries entre autres les bactéries indésirables. Des expositions prolongées dans un milieu acide peuvent entraîner la mort de plusieurs Bactéries, y compris les ferments lactiques (**Champagne *et al.*, 1992**).

##### **II.4.2. Peroxyde d'hydrogène**

La production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par les bactéries lactiques peut empêcher la croissance d'agents pathogènes d'origine alimentaire et peut également être bénéfique pour la conservation des aliments. Il a été démontré que les bactéries lactiques qui produisent du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inhibent la croissance des microorganismes psychotrophes et pathogènes aux températures de réfrigération (**Reis *et al.*, 2012**).

##### **II.4.3. Dioxyde de carbone**

Le dioxyde de carbone est formé pendant la fermentation hétérolactique et crée un environnement anaérobie qui inhibe les microorganismes aérobies. L'accumulation de dioxyde de carbone dans la bicouche lipidique peut causer un dysfonctionnement de la perméabilité (**Ammoret *al.*, 2006**).

#### II.4.4. Diacétyl

Le diacétyl est un produit du métabolisme du citrate qui est responsable de l'arôme « beure » des produits laitiers. Le diacétyl a des propriétés antimicrobiennes qui sont dirigées contre les levures, les bactéries Gram-négatif et les bactéries Gram-positif non lactiques, ces dernières y sont néanmoins moins sensibles (El Zineyet *al.*, 1998).

#### II.4.5. Reutéline

La reuterine ou (3-hydroxypropionaldehyde) est une substance antimicrobienne qui est produite comme métabolite intermédiaire pendant la fermentation anaérobique du glycérol par certaines espèces de *Lactobacillus*. (Neset *al.*, 2011).

### II.5. Les bactériocines

Toutes les bactériocines produites par des bactéries lactiques décrites jusqu'à présent ont une activité dirigée contre les bactéries Gram positif. Aucune bactériocine produite par des bactéries lactiques avec une activité contre des bactéries Gram négatives n'a été décrite, la membrane externe des bactéries Gram négatives ne permettant pas aux bactériocines d'atteindre la membrane interne, siège de leur activité (Dortu et Thonart, 2009).

À la suite de leurs travaux sur les colicines (bactériocines de bactéries Gram négatif) Tagget *al.*, (1976) citent les critères requis pour qu'une substance chimique soit dénommée bactériocine :

- La présence d'une partie biologiquement active de nature protéique.
- Un spectre d'activité inhibitrice étroit et centré sur les espèces homologues.
- Un mode d'action bactéricide.
- L'adsorption à des récepteurs spécifiques.

### II.5.1 Classification des bactériocines

On trouve des souches productrices de bactériocines chez tous les genres de bactéries lactiques. Le nombre de bactériocines de bactéries lactiques caractérisées a augmenté de façon exponentielle au cours des dix dernières années.

**Tableau 1 :** Classification des bactériocines (Papagianni, 2003).

Classe	Caractéristiques
<p><b>Classe I</b> Lantibiotique</p>	<p>Peptides ribosomiquement synthétisés, post traductionnellement modifiés contiennent des acides aminés inhabituels: lanthionines et <math>\beta</math>-méthyle lanthionine. Masse moléculaire: 2-5KDa</p> <p>Sous classe A : molécules allongées, flexibles. Sous classe B: molécules globulaires sans charge nette ou chargées négatives.</p>
<p><b>Classe II</b> Non lantibiotique</p>	<p>Peptides stables à la chaleur, formés exclusivement avec des acides aminés non modifiés.</p> <p>Synthétisés sous forme d'un pré-peptide inactive clivé à la partie N-terminale pour donner la forme active. Masse moléculaire: &lt;10KDa.</p> <p>Sous classe IIa : pediocin-like peptide, peptide simple contient la séquence YGNGVN terminal nommé aussi (Listeria active peptide).</p> <p>Sous classe IIb : bactériocines à deux peptides. Sous classe IIc : autre bactériocine.</p>
<p><b>Classe III</b> Bactériolysines</p>	<p>Protéines thermolabiles</p> <p>Masse moléculaire &gt; 30KDa</p>
<p><b>Classe IV</b></p>	<p>Complexe bactériocines et parties lipidiques ou glucidiques</p>

### II.6. Mécanisme d'action

Le siège d'activité des bactériocines est la membrane cellulaire, raison pour laquelle les bactériocines n'ont pas d'activité contre les bactéries Gram-négatif. Ces substances vont interagir avec des récepteurs de peptidoglycane en provoquant l'augmentation de la

perméabilité de la membrane et par conséquence, la mort cellulaire. Cependant, les modes d'action des bactériocines sur la membrane sont variés (**Dortu et Thonart, 2009**).

*Partie II*  
*Etude Expérimentale*



### III. Matériel et Méthodes

L'intégralité de ce travail a été réalisée au niveau du Laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Tiaret, durant la période avril – mai l'année 2021.

L'objectif de cette étude s'articule autour des points suivants :

- Isoler et purifier des bactéries lactiques du colostrum (vache, chèvre).
- Etudier leurs propriétés technologiques.
- Étudier l'activité antimicrobienne des isolats lactiques vis-à-vis des souches indicatrices.

#### 1. Matériels utilisés

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

##### 1.1. Matérielles biologique

###### 1.1.1. Prélèvement du colostrum

Les échantillons de colostrum de vache et de chèvre proviennent de la région de Tiaret :

###### a. Colostrum de la vache

Les échantillons sont prélevés de deux vaches différentes de la région Tiaret (Cité Chaïbe Mohamed)

**Vache A** : colostrums prélevés le 02/02/2021 à 19.33 heure, deux jours après l'accouchement de la vache.

**Vache B** : colostrums prélevés le 13/02/2021 à 18.38 heure, une heure après l'accouchement de la vache.

###### ➤ Technique de prélèvement

Les mamelles sont lavées avec l'eau savonneuse puis un rinçage à l'eau javellisée est effectué, les mamelles de la vache sont séchées et nettoyées à nouveau avec l'alcool, les échantillons du colostrum sont recueillis dans des crachoirs de 250ml stériles. Les échantillons de colostrum sont conservés à 4°C et transportés au laboratoire où ils sont analysés.



**Figure 2 :** échantillonnage de colostrums de vache

### **b. Colostrum de chèvre**

L'échantillon de colostrum est prélevé d'une chèvre après une 1h de la mise en bas le 19/02/2021 à 14:30h dans la ferme de Sersou-ainkasema-Tiaret.

#### ➤ **Technique de prélèvement**

Un lavage de la mamelle à l'eau et au savon, puis à 70% à l'alcool est effectué, les premières gouttes sont jetées ensuite pour éviter toute contamination (**Martin et al., 2005**). Les échantillons sont collectés dans des crachoirs stériles, transportés dans une glacière réfrigérée, et conservés à 4°C jusqu'à leur utilisation.

#### **1.1.2. Les souches indicatrices**

Pour les tests d'activités antibactériennes, un micro-organisme pathogène est utilisé :

- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

La souche pathogène était fournie par le laboratoire de Microbiologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'Université Dillali LIABES de Sidi Belabbes.

### 1.2. Milieux de culture

Les milieux de culture utilisés au cours de cette étude expérimentale sont les suivants :

- **Les géloses** : MRS, gélose nutritif et Mueller-Hinton.
- **Les bouillons** : bouillon MRS, M17 et bouillon nutritif.

### 1.3. Produits chimiques et réactifs

Les produits chimiques et réactifs utilisés au cours de cette étude sont les suivants :

- **Les colorants** : Violet de Gentiane et la fuschine
- **Alcool et autres** : l'eau-oxygénée, Lugol, trypsine.

### 1.4. Appareillage et autres

Notre étude a nécessité l'utilisation des appareils, de la verrerie et d'autres matériels dont ils sont cités au-dessous :

#### a) Appareillages

- Autoclave (Webeco).
- Bain Marie (Memmert).
- Balance (Denver).
- Centrifugeuse électrique (Hettich, universal 2S);
- Etuves (Memmert).
- Microscope optique (Motic).
- pH mètre électrique (Mettler Toledo).
- Réfrigérateur (Eniem).
- Incubateur (memmert).
- Spectrophotomètre uv/visible (Jenway).
- Vortex (technokartell).
- Agitateur (Stuart)

#### b) Autres

- Micropipettes (Microlit).
- Les boîtes pétries.

- Les tubes à essais.
- Des flacons.
- Diccateur.

## 2. Méthodes

### 2.1. Isolement et culture de la flore lactique

#### 2.1.1 Préparation des dilutions décimales

Les dilutions sont préparées à partir de la solution mère (Clostrum) : la dilution  $10^{-1}$  a été préparée à partir de 1 ml de la solution mère, ajouté aseptiquement à 9 ml d'eau physiologie stérile. La dilution  $10^{-2}$  a été préparée à partir de 1 ml de la dilution  $10^{-1}$ , de la même manière jusqu'à la dilution  $10^{-6}$  (Guiraud, 2003).



**Figure 03** : les dilutions décimales à partir d'une solution mère (colostrum)

### 2.1.2 Dénombrement des bactéries lactiques

Le dénombrement a été effectué sur le milieu gélosé de Man-Rogosa-Sharp (MRS) en partant de la dilution  $10^{-2}$  jusqu'à  $10^{-6}$

a) L'ensemencement a été fait en profondeur. En déposant dans des boîtes de Pétri 1 ml de chaque dilution, puis en faisant couler de la gélose MRS.

b) Dans une jarre d'anaérobiose, et avant que la bougie ne s'éteigne, les boîtes sont mises dedans et la jarre est ensuite fermée.

c) La jarre est incubée à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 24 à 48h.



**Figure 04 :** Boîtes de Pétri dans la jarre d'anaérobiose

- Les colonies à dénombrer sont de petites tailles, de couleurs blanchâtres et brillantes à pourtours réguliers, elles peuvent apparaître en forme circulaire ou lenticulaire (**Kacem et Karam, 2006**).

## 2.2. Purification des isolats de bactéries lactiques

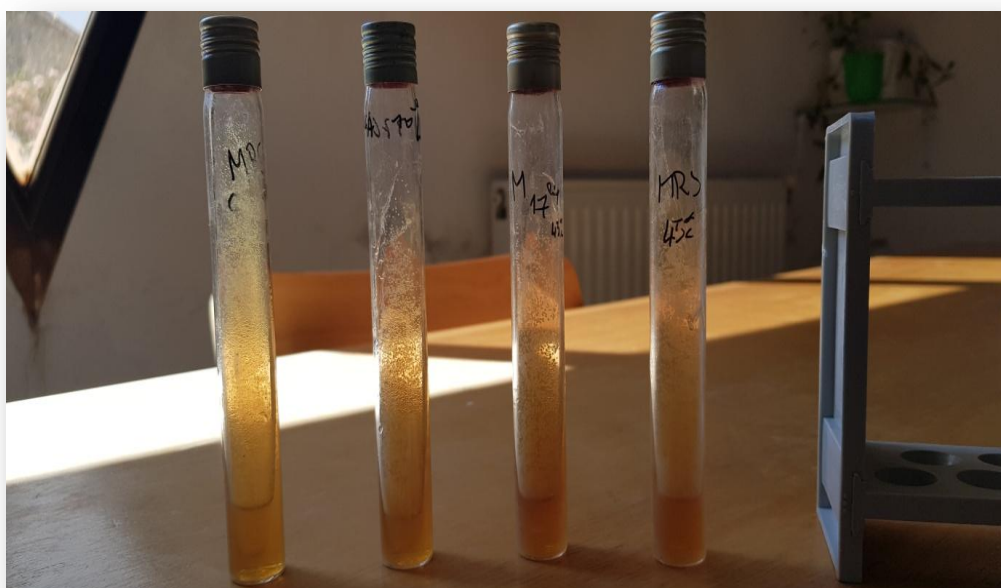
La purification consiste à réaliser des repiquages successifs sur gélose et bouillon MRS, avec une incubation à 37°C pendant 24h, jusqu'à l'obtention de colonies de même taille, de même forme et de même couleur renseignant sur la pureté des souches (**Idouiet al., 2009**).

## 2.3. Conservation des isolats

Après purification, les souches sont conservées par deux méthodes :

### 2.3.1 Conservation à courte durée

Les souches sont ensemencées sur gélose MRS inclinée en tube. Après incubation à 37°C pendant 18 heures, les cultures sont gardées à + 4°C. Les repiquages des cultures se font toutes les trois semaines (**Saidiet al., 2002**).



**Figure 05** : souches lactiques conservé à courte durée

### 2.3.2 Conservation à long durée

A partir des cultures jeunes de 18h sur milieu liquide, les cellules sont récupérées par centrifugation à 4000t/min pendant 10 min. Une fois le surnageant éliminé, le milieu de culture de conservation est ajouté sur le culot, qui contient 70 % de lait écrémé (enrichi par 0.05% d'extrait de levure) et 30% de glycérol. Les cultures sont conservées en suspension dense et en tubes Eppendorfs à -20°C.

En cas de besoin, les cultures sont repiquées dans le lait écrémé à 0.5% d'extrait de levure, deux fois avant utilisation (**Badiset *al.*, 2005**).



**Figure 06 :** Souches lactiques conservé à langue durée

## 2.4. Caractérisation morphologique des souches lactiques isolées à partir des colostrums de vache et de chèvre

### 2.4.1 Examen macroscopique des colonies

Pour déterminer les caractères morphologiques, les colonies de 24 h à 48 heures obtenues après culture en anaérobiose dans le milieu MRS agar ou M17 à 37 °C sont observées à la loupe binoculaire. Chaque colonie est examinée pour sa taille, sa couleur, ses contours, sa texture, sa forme et son relief.

### 2.4.2 Examen microscopique

**Coloration de Gram :** Ce test a été réalisé sur des cultures jeunes de moins de 24 heures. Un frottis de cellules est réalisé sur une lame. Une coloration de Gram est effectuée. Ensuite, le frottis est observé au microscope sous immersion au grossissement X 100. Les isolats ayant une coloration violette sont Gram positif (+) tandis que ceux présentant une coloration rose sont Gram-négatifs (-).

## 2.5. Tests biochimiques et physiologiques

### 2.5.1 Test de la catalase

Le test catalase sert à démontrer si la bactérie possède l'enzyme catalase servant à décomposer le peroxyde d'hydrogène.

La détermination de l'activité catalytique consiste à prélever une colonie sur gélose MRS ou M17 et la dissocier dans une goutte d'eau oxygénée ( $H_2O_2$ ) à 10 volumes ; l'apparition de bulles révélant le dégagement d'oxygène (Ahmed et Irene 2007).

### 2.5.2 Croissance à différente température

La croissance à différentes températures a permis une différenciation entre les thermophiles ou les mésophiles. Des cultures jeunes sontensemencées dans le bouillon MRS et incubées par la suite pendant 48h à différentes températures : 30°C, 37°C, et 45°C (**Schillinger et Luck., 1987**). La croissance est appréciée par l'apparition de trouble.

### 2.5.3 Croissance à différent pH

Ce test a permis de différencier entre les souches qui croissent dans un milieu acide ou neutre. Un bouillon MRS est préparé avec différent pH : 3, 3.5, 4.5, 5.4 et 6.5 comme témoin. Ensuite, une préculture des souches lactiques isolées est introduite dans les bouillons préparés. L'incubation est faite à 37°C pendant 72 heures. (**Carr et al., 2002**).

### 2.5.4 Culture sur milieu hypersalés

La croissance en présence de différentes concentrations de chlorure de sodium (NaCl) donne des renseignements précieux pour l'identification. Les cultures à tester sontensemencées sur des bouillons MRS hypersalés à 3.5 % et 6.5 % de NaCl. Après une incubation à 30°C



pendant 24h à 72h, le développement des cultures est apprécié par comparaison avec un tube témoin non ensemencé, incubé dans les mêmes conditions (Carr *et al.*, 2002)

### 3-Identification biochimiques des isolats lactiques

Le profil fermentaire des bactéries lactiques isolées à partir des colostrum de vache et de chèvre était établi par les tests suivant :

**1. ONPG** : test de l'enzyme B-galactosidase par hydrolyse du substrat o-nitrophényl- bD -galactopyranoside en OMP(orthonitrophényl- B-D-galactopyranoside) qui possède une structure analogue au lactose.

**Technique** : A l'aide d'une once de platine, préparer une suspension bactérienne a étudié dans un tube à essai contient d'eau distillé puis on ajoute un disque ONPG. Après incubation

L'apparition d'une couleur jaune (ONP) indique la présence de la B-galactosidase.

**2. ADH -LDC -ODC** : Les enzymes ADH, LDC et ODC catalysent respectivement la décarboxylation de l'arginine, de la lysine et de l'ornithine présent dans le milieu.

L'alcalinisation du milieu est révélée par un virage de l'indicateur de pH (le pourpe de bromocrésol) à sa teinte basique (violette).

**3. CITRATE DE SIMMONS** : Le milieu est présenté sous forme de gélose inclinée. La pente est ensemencée par une strie longitudinale réalisée à l'anse, à partir d'une suspension de la culture solide en eau distillée stérile .

Virage de l'indicateur de pH au bleu : alcalinisation du milieu et utilisation du citrate comme seule source de carbone.

**4. Sulfure d'hydrogène** : s'il y a fermentation du glucose ou du lactose, cela induit une acidification qui, en présence de rouge de phénol ( indicateur de pH ), provoque une coloration jaune du milieu. S'il y a production d'H<sub>2</sub>S, cela induit un noircissement du milieu en présence de sulfate ferreux et de thiosulfite de sodium.

### 5. URE: test de l'enzyme uréase

*L'uréase* enzyme hydrolysant l'urée, activité directement détectable par le suivi de l'alcalinisation.

**Technique :** réaliser une suspension bactérienne a étudié dans un tube à essai contenant le milieu urée indole + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**6. Test TDA:**Ce test est réalisé pour rechercher l'enzyme tryptophane désaminase dans le milieu.

**Technique :**réaliser une suspension bactérienne a étudié dans un tube à essai contenant le milieu urée indole. Après 24h en ajoute le FeCl<sub>3</sub>.

**7. Test indole :** Ce test est réalisé pour la recherche de la production d'indole dans le milieu par l'action de l'enzyme tryptophanase.

**Technique :**réaliser une suspension bactérienne a étudié dans un tube à essai contenant le milieu urée indole.Par une piqure centrale. Après 24h en ajoute le réactifs Kovacs , la formation d'un anneau rouge.

**8. Test VP:** le test de voges-proskauer pour la détection de l'acétoïne ( acétylméthylcarbinol) produite par fermentation du glucose par des bactéries utilisant la voie du butylène glycol.

**Technique:**Ensemencer largement un tube ClarK et Lubs .Après incubation en divise le contenu du milieu en deux tube .

Dans le premier tube on ajoute quelque goutte de rouge de méthyle, dans le deuxième tube on ajoute les réactifs VP1(alpha naphthol) et VP2 (basse forte NaOH).

### 3.1.1 Recherche de type fermentaire

La mise en évidence de la production du CO<sub>2</sub> à partir du glucose sur milieu MRS contenant la cloche de Durham. Le milieu est réparti dans des tubes à essais à raison de 10 ml, stérilisés à 120 °C durant 15 min. Après inoculation avec 1% de la souche étudiée, le développement d'une souche hétérofermentaire se traduit par l'apparition du gaz dans la cloche du Durham, qui est absent chez les homofermentaire(**Gibson et abd el Malek., 1945**).

## 4. La détermination des profils de sensibilité aux antibiotiques des souches lactiques isolées à partir de colostrum de vache et de chèvre

Préparation de l'inoculum :un prélèvement de plusieurs colonies morphologiquement similaires est effectué à partir d'une culture jeune de 18à 24heures. La suspension

microbienne (les lactocoques) étaient préparée sur bouillon (Muller-Hinton), après un ajustement de la turbidité de l'inoculum à celle de la turbidité du standard 0,5 McFarland, la densité optique doit être comprise entre 0,08 à 0,13. l'inoculum recommandé est d'environ  $1 \times 10^8$  germes/ml .

Les disques d'antibiotiques sont déposés stérilement, à la surface d'un milieu standardisé (5 antibiotiques par boîte). Préalablement ensemencé avec un inoculum calibré d'une culture pure de la bactérie à tester. Après incubation les boîtes de Petri sont examinées et les diamètres des zones d'inhibition entourant les disques sont mesurés et comparés aux valeurs critiques des différents agents antimicrobiens testés, afin de déterminer la catégorisation clinique (résistant, intermédiaire, sensible) selon les normes recommandées (comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (2007) .

## **5. Étude de l'activité antibactérienne des souches lactiques isolées à partir de colostrum de vache et de chèvre**

### **5.1 Méthodes de double couches (méthode de Fleming *et al.*, 1975)**

Les souches lactiques d'une culture de 18 h sont ensemencées en touche (à l'aide d'une pipette pasteur stérile) à la surface d'un milieu MRS. Après 24h d'incubation, une gélose Mueller Hinton contenant la souche indicatrice pathogène d'une culture de 18h est coulée au-dessus de la première couche de gélose.

La lecture des boîtes s'effectue après 24h d'incubation à 37 °C, les souches présentant une zone d'inhibition sont considérées comme productrices de substances antimicrobiennes. La taille des zones d'inhibition est mesurée en mm.

# *Résultats et discussion*

## **IV. Résultat**

### **1. Isolement des souches lactiques**

L'échantillonnage des différents prélèvements a permis l'isolement de 3 souches bactériennes, les isolats sont Gram positif, catalase négative, ces deux caractères, laissent supposer leur probable appartenance au groupe des bactéries lactique.

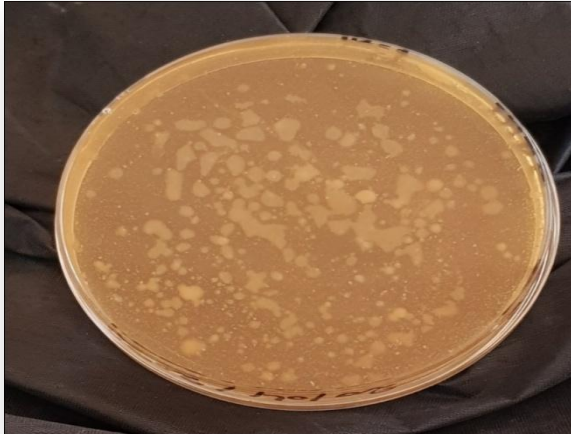
Les souches lactiques ont été pré-identifiées à ce stade sur la base de ses aspects macroscopique et microscopique, ainsi que des tests physiologiques tels que la croissance à différentes températures, dans des milieux hyper-salées à différentes concentrations.

### **2. Caractérisation morphologique**

#### **2.1 Aspect macroscopique**

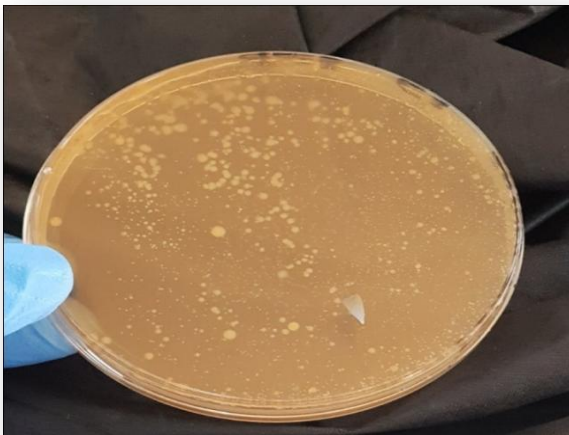
L'étude macroscopique consiste à faire une observation à l'œil nu, l'aspect de culture en milieu gélosé permet de déterminer la forme, la couleur et l'aspect de colonies.

L'observation macroscopique a montré en effet que toutes les colonies avaient une couleur blanchâtre au transparente, bien rondes, laiteuses de formes sphériques plus au moins allongées de petite taille. Sur bouillant, la souche présente un trouble homogène qui caractérise le groupe des bactéries lactiques.



**Aspect des colonies sur  
Milieu MRS**

Forme lenticulaire,  
Colonie blanchâtre et de formes variable



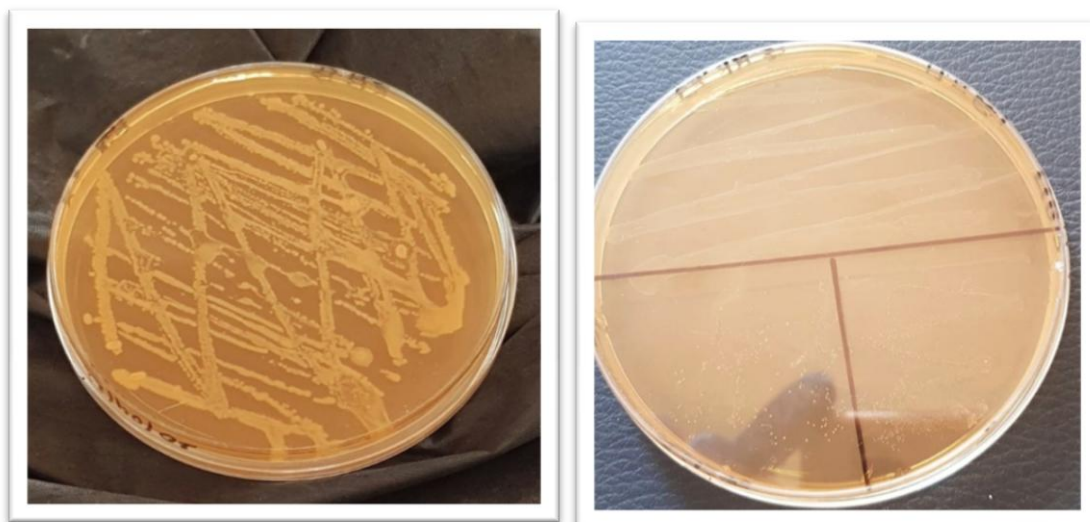
**Aspect des colonies sur  
Milieu MRS**

Forme circulaire blanchâtre, pourtour  
régulier



Colonies de très petites taille, forme  
circulaire transparente

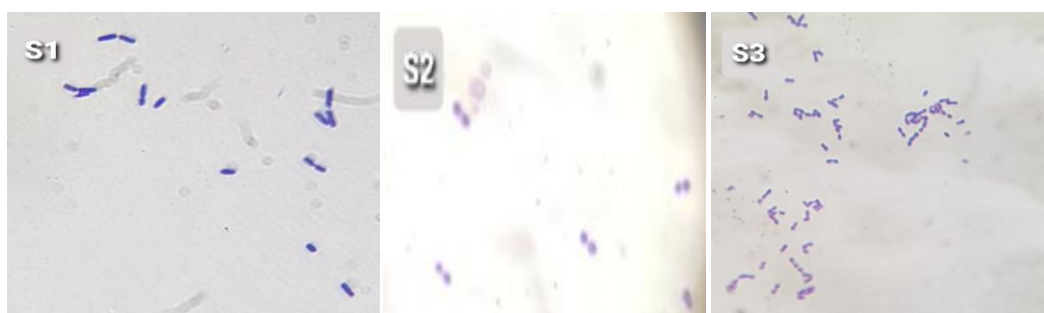
**Figure 7 :** aspect des colonies des  
souches lactiques isolées sur le  
milieu MRS solide



**Figure 8** : aspect macroscopique après purification des colonies des souches lactiques isolées sur le milieu MRS solide

## 2.2 Aspect microscopique

L'observation microscopique des souches isolées et sélectionnées de bactéries lactiques après coloration de Gram a révélé plusieurs formes : bacillaires ou coccidées à Gram positif. Les bactéries lactiques sont : Gram positif, catalase négative ; peuvent se présenter comme des bâtonnets ou cocobacilles et aussi comme Lactobacilles, aussi ils peuvent être sous forme coccidées. Les bactéries lactiques appartiennent aux différents genres comme les entérocoques, les streptocoques ...etc , selon leurs différents modes d'associations (**Kandler et Weise , 1986** ) (figure 9)



**Figure 9** : Observation microscopique des souches isolées à partir de colostrum de vache et de chèvre après coloration de Gram

(G ×100)

### 2.3 Test de catalase

Conformément aux bactéries lactiques, toutes les souches étudiées ne possèdent pas la catalase.

**Tableau 2 :** illustration des critères morphologique et microscopique des bactéries lactiques isolées du colostrum

	Gram	Catalase	Morphologie	Type, forme de colonies	Identification
<b>S1</b>	+	-	Bacilles, isolés, en diplos et en chainettes courtes	Lenticulaire, Colonies blanchâtres et de formes variables	<i>Lactobacillus</i>
<b>S2</b>			Cocci, isolés, diplos	Forme circulaire blanchâtre, pourtour régulier	<i>Lactococcus</i>
<b>S3</b>			Cocci en chainettes	Colonies de très petites tailles, forme circulaire transparente	<i>Streptococcus</i>

## 3. Test biochimique et physiologique

### 3.1 Croissance a différente température

Les souches lactiques isolées à partir de colostrum de vache et de chèvre ont été testées pour leur croissance à différentes températures (30°C, 37°C, et 45°C).

Les résultats sont représentés dansle tableau ci-dessus.



**Tableau 3** : Présentation des caractères physiologique des souches Lactique isolées

Souches	pH de croissance		Température de croissance			Salinité	
	4,8	6,5	30°C	37°C	45°C	3.5%	6.5%
<b>S1</b>	+	+	-	-	+	+	-
<b>S2</b>	+	+	+	+	-	+	-
<b>S3</b>	+	+	+	+	-	+	-

### 3.2 Croissance à différents pH

La croissance des souches isolées à partir de colostrum de vache et de chèvre a été testée sur milieux MRS avec deux pH différents : pH 4, 8/ pH 6,5

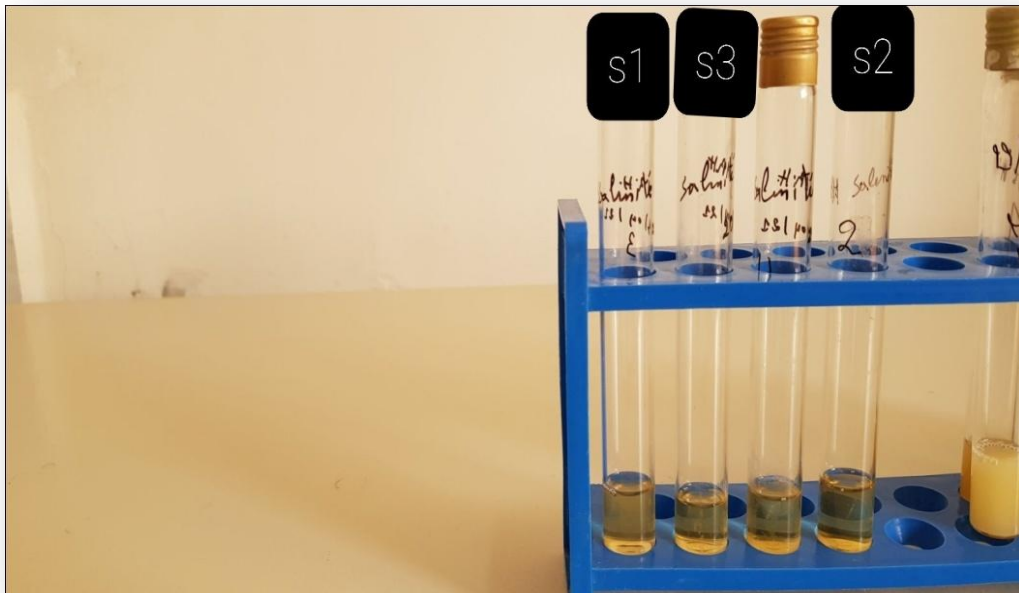
Les résultats obtenus sont représentés dans le **tableau 3 (ci-dessous)** et la **figure 10**



**Figure 10** : Résultat de la résistance des isolats pH 4,8 et pH 6,5

### 3.3 Croissance sur milieu hypersalé

Les souches ont étéensemencées sur Milieux MRS hypersalé à 3,5 % Et les résultats sont représenter sur le **tableau 3** et la **figure 11**



**Figure 11 :** Résultats de la résistance des souches aux milieux hypersalés 3,5%

#### 4. Type Fermentaire des souches lactiques isolées

La recherche du type fermentaire était réalisée sur milieu de culture stérile contenant une cloche de Durham, permettant la différenciation entre deux groupes bactériens, soit homo-fermentaire ou hétéro-fermentaire .

Les résultats obtenus ont montré l'absence (Homo-fermentaire) de la production du gaz( CO<sub>2</sub>) à partir du glucose **figures 12 et 13**



**Figures 12 -13 :** photos illustratives du test de recherche de type fermentaire des bactéries lactiques isolées (milieu de culture de MRS glucosé, muni d'une cloche du Durham)

## 5. Résultat de l'identification biochimique des isolats lactiques

La souche lactique S2 était retenue pour une éventuelle identification biochimique. Cette souche a donné la meilleure performance dans le test de confrontation avec les souches cliniques.

Les résultats des tests biochimiques effectués sur la souche lactique S1 sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Tests	ONPG	ADH LDC. ODC	Citrate de Simmons	Sulfine d'hydrogène	URé	TDA	Indole	VP
Résultat	+	-	-	-	-	-	-	-

## 5. Étude de l'activité antimicrobienne des souches lactiques

### Méthode de Fleming *et al.*, (1975)

Notre choix s'est donc porté sur une technique bien décrite dans la littérature est celle de **Fleming *et al.*,(1975)** qui nous a permis de faire une première sélection des souches lactique antibactériennes.

Les résultats de l'interaction obtenue, révèlent la présence d'une zone claire au tour de la souche lactique S2.

Le résultat de l'interaction entre la souche lactique *Lactococcus* sp. (S2) et la bactérie pathogène *Entérocooccus faecalis* ATCC29212 est mentionné dans la figure suivante :



**Figure 14** : inhibition obtenue par la méthode de Fleming (1975) par la souche *Lactococcus* sp. contre la souche clinique *Entérocooccus faecalis* ATCC29212.

- La souche *Lactococcus* sp. a une activité inhibitrice contre la bactérie pathogène *Entérocooccus faecalis* ATCC29212, le diamètre de la zone d'inhibition est 6mm.
- L'inhibition est notée positive lorsqu'elle est supérieure à 1mm ( **Schilinger et Lucke , 1989**)

## V. Discussion

Les bactéries lactiques ont été isolées du colostrum de vache et de chèvre, Elles ont été cultivées et isolées sur milieu MRS, M17. Du fait des exigences nutritionnelles des bactéries lactiques, les milieux de culture doivent être très riches en sucres, en matières azotées et surtout en facteurs de croissances.

La présence de divers genres de bactérie lactiques dans le colostrum de chèvre et de vache était prévisible car des bactéries lactiques ont été trouvées dans la microflore de tous colostrum étudiés.

L'étude des principaux caractères morphologique, biochimique et physiologique ont montré une diversité de genre et d'espèces de bactérie lactiques détectées dépendent essentiellement de la nature du colostrum (vache ou bien chèvre) et des conditions d'analyse.

Selon **Drouault et Corthier (2001)**, les bactéries lactiques sont des bactéries à Gram positif. Nos résultats indiquent que les cellules observées après coloration de Gram sont bleues voilettes pour tous les isolats donc ce sont des bactéries à Gram positif. Ces résultats concordent avec celles retrouvées par **Lairiniet al., 2014**.

Selon **Savado et Traore (2011)**, il existe deux grands groupes de bactéries lactiques morphologiquement bien distincts : les cocci et les bacilles. L'observation microscopique a révélé deux formes de cellules : bacilles (isolat BL2 et BL3) et cocci (isolat BL1).

Les résultats d'identification de ce travail montrent une présence majoritaire de coques par rapport les bâtonnets (bacilles)

Les bactéries lactiques ne possèdent pas d'activité catalasique (absence de bulles). Elles sont dites catalase négative. Ces caractéristiques permettent leur classification au groupe des bactéries lactiques selon **Savado** et **Traore (2011)**. Ces résultats concordent avec ceux retrouvés par **Lairiniet al., (2014)**.

L'identification phénotypique des souches conventionnelles était basée les tests morphologiques, physiologiques et biochimiques.

La flore dominante est représentée par les *Lactococcus*, l'aspect macroscopique montre que les lactocoques développent sur le milieu M17 et donnent des petites colonies à contour régulier de couleur blanchâtres, lisses et légèrement bombées.

Les lactocoques sont microscopiquement des bactéries à Grams positifs de forme de cocci sphérique, associé en paire, groupées en chaînettes plus au moins longues (**Teuber M. et Geis A, 2006**).

Les lactocoques sont des bactéries homofermentaires, ne poussent pas à 45°C .

Dans ce travail nous avons isolé une souche de *Lactobacillus*.

D'après l'observation macroscopique faite sur la souche de *Lactobacillus* développé sur milieu MRS (**Man et al., 1960**) ; on a remarqué que les colonies sont clonées irrégulières, érodées de couleur crème et de 1 à 3 mm de diamètre, et l'observation sous microscope après coloration de Gram, indique qu'il s'agit de bacilles apparents Gram positif (**Klien et al., 1998; Axelsson, 2004 . Hammes et Hertel, 2006; Tabasco et al., 2007**).

La souche de *Lactobacillus* fermente le glucose sans production de gaz CO<sub>2</sub>, donc cette souche est homofermentaire (**Hammes et Hertel, 2006**)

La deuxième étape a permis de recenser des souches possédant l'activité antibactérienne intéressante.

Les bactéries lactiques dont le nom en est lui-même évocateur, ont pour caractéristique commune la production d'acide lactique. Leur capacité d'utiliser plusieurs sources carbonées conduit à la formation de l'acide lactique comme seul produit final, abaissant ainsi le pH et créant un environnement défavorable au développement des bactéries pathogènes et des microorganismes d'altération .

Cette inhibition est due à leurs capacités à produire plusieurs métabolites antimicrobiens, tels que les acides organiques (acide lactique, acide acétique,...), le peroxyde d'hydrogène,

l'éthanol, le diacétyl, le dioxyde de carbone et les bactériocines ( **Klaen Hammer 1988; Abee et al., 1995**). Ces dernières, font depuis quelques décennies, l'objet d'innombrables études notamment dans l'objectif d'application alimentaires.

les micro-organismes pathogènes d'importance particulière dans les produits laitiers incluent les espèces d' *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*( **BELARBI Fatma., 2010** )

L'activité antagoniste des trois souches isolées sélectionnés est mise en évidence vis-à-vis (*Entérocooccusfaecalis* ATCC29212 ) a été détectée . Cette interactions positive indique l'inhibition de la croissance de bactérie pathogène testé ( *Entérocooccusfaecalis* ) et montre un pouvoir antagoniste, qui est traduit par l'apparition des zones d'inhibition (**FLeming et al .,1975; Barefoot et Klaenhammer 1983; Tabac et al .,;2007**), ces résultats indiquent que nos bactéries lactiques sont capables de synthétiser des substances inhibitrices ayant une activité antibactérienne.

# *Conclusion*

## Conclusion

Les bactéries lactiques jouent un rôle important dans la bio-conservation des aliments et dans la biothérapie grâce à leur pouvoir d'inhibition des bactéries pathogènes. Le pouvoir inhibiteur est dû à la production de nombreux métabolites ayant des propriétés antagonistes telles que les bactériocines.

Dans cette étude, le spectre d'activité de ces souches a été utilisé sur une souche de bactéries pathogènes *Entérocooccus faecalis* ATCC29212.

Dans ce travail de mémoire, un isolement suivi d'un criblage des bactéries lactiques à partir des colostrums de vache et de chèvre était effectué. Leur culture sur milieu spécifique a dit de s'orienter vers ces bactéries, leurs caractères physiologique et biochimique permettent de les différencier des autres groupes bactériens.

Parmi les genres des bactéries lactiques, on a réussi à isoler les lactobacilles, les lactocoques, les streptocoques.

Les résultats de l'étude de l'antagonisme par la méthode double couche montrent que les souches de isolats lactiques *Lactococcus* produisent des substances inhibitrices de *Entérocooccus faecalis* ATCC29212.

Les résultats obtenus ont montré que la souche *Entérocooccus faecalis* ATCC29212 étaient sensibles aux substances produites chez les lactocoques avec un diamètre d'inhibitions très intéressant.



## *Référence Bibliographique*

**Références bibliographies:**

**Ahmad Faris Mahd Adnan, Irene K.P.Tan ,2007.**isolation of lactic acid bacteria from Malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potential.bioresource Technology.,98:1380-1385.in memoire magistère (**Belarbi Fatima 2010-2011**)

**Ammor, S., Tauveron G., Dufour E., Chevallier I. (2006).**Antibacterialactivity of lacticacidbacteriaagainstspoilage and pathogensbacteriaisolatedfrom the samemeatssmallscalefacility. Food Control, 17, 454-468.in mémoire de master (**Présenté par Mlle BEDOUD Hidaya Mlle BOUFENINZA Loukha Mlle BOUZIANE Soumia 2018-2019**).

**Axelsson Lars.2004**lactic Acid Bacteria : classification and physiology in Lactc Acid Bacteria Microbiological and functional Aspects. Salmines s.,WrightA.V.?OuwehandA.3Ed., Marcel Dekker,pp:1-66.in memoire magistère (**Belarbi Fatima 2010-2011**)

**Abee,T, L Krockel, et C Hill.** «Bacteriocins: modes of action and potentials in food.» Int J Food Microbiol 28 (1995): 169 185

**Bayoub, K., Elotmani, F., Assobhei, O., Jaoua, S., Soukri, A. (2006).** Contribution à l'étude des bactériocines produites par des souches isolées du lait fermenté traditionnel «Raïb». Revue des régions arides, 21: 270-275.

**Benkerroum , N, et A.Y Tamime.** «Technology transfer of some Moroccan: a review.» Food Microbiol 21 (2004): 399–413.

**Badis A., Laouabdia S.N., Guetarnid., Kihal M et Ouzrout R. 2005.**Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chevre de deux populations caprines locales « arabia et Kabyle ». sci et Tech. 23 :30-37. in mimore**KhodjaBadra 2017-2018**

**Belgacem, Z. B., Abriouel, H., Omar, N. B., Lucas, R., Martínez-Canamero, M., Gálvez, A., &Manai, M. (2008).**Antimicrobialactivity, safety aspects, and sometechnologicalproperties ofbacteriocinogenicEnterococcusfaeciumfrom artisanal Tunisianfermentedmeat. Food Control, 21(4), 462-470. in mémoire de master (**Présenté par Mlle BEDOUD Hidaya Mlle BOUFENINZA Loukha Mlle BOUZIANE Soumia 2018-2019**).

**Boudry, C., Dehoux, J. P., Wavreille, J., Collard, A., Portetelle, D. et Thewis, A. (2009).**Effets biologiques et immunitaires du colostrum bovin sur le porcelet ausevrage. 9ème

*Journée des Productions porcines et avicoles" Impact de l'alimentation sur la santé animale : nouveaux développements", 15-22 in mémoire de master (Présenté par Mlle BEDOUD Hidaya Mlle BOUFENINZA Loukha Mlle BOUZIANE Soumia 2018-2019).*

**Carr F.J., Chill D. et Maida N. 2002.** *The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey.* *Crist. Rev. Microbiol.* 28(4) :281-370. in mémoire **Khodja Badra 2017-2018**

**Desmazeaud, M.** "Rôles des cultures de microorganismes dans la flaveur et la texture des produits laitiers fermentés." *Fédération internationale de Laiterie ; Bruxelles (BEL), and Proceeding of the International Dairy Congress Biotechnology-Milk Products, 1990.* in mémoire (**Hammi Ikram 16 septembre 2016**)

**Dortu, C, et P Thonart.** «Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et.» *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 13 (2009): 143-15

**De Vuyst, L. (2000).** *Technology aspects related to the application of functional starter cultures.* *Food Technology and Biotechnology*, 38(2), 105-112. in mémoire de master (Présenté par Mlle BEDOUD Hidaya Mlle BOUFENINZA Loukha Mlle BOUZIANE Soumia 2018-2019).

**Dortu, C. et Thonart, P. (2009).** *Les bactériocines des bactéries lactiques: caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires.* *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 13(1), 143-154. in mémoire de master (Présenté par Mlle BEDOUD Hidaya Mlle BOUFENINZA Loukha Mlle BOUZIANE Soumia 2018-2019)

**Drouault, S. et Corthier, G. (2001).** *Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé.* *Veterinary Research*, 32(2), 101-117. in mémoire de master (Présenté par Mlle BEDOUD Hidaya Mlle BOUFENINZA Loukha Mlle BOUZIANE Soumia 2018-2019).

**El-Ziney M.G., Uyttendaele M., Debevere J. et Jakobsen M. 1998.** *Characterization of growth and metabolite production of Lb. reuteri during glucose/glycerol cofermentation in batch and continuous cultures.* *Biotechnol. Lett.* 20 (10): 913-916. . in mémoire **Khodja Badra 2017-2018**

**Fleming H.P., Erchells J.L and Caslilow R.N. 1975.** *Microbiol inhibition on isolate Pediococcus from cucumber bunc.* *Appl. Environ. Microbiol.* 30:1040-1042. in mémoire **Khodja Badra 2017-2018**

- Fleming H.P., Erchells J.L and Caslilow R.N.** 1975. *Microbiol inhibition on isolate Pediococcus from cucumber bune.* Appl. Environ. Microbiol. 30:1040-1042.
- Gálvez, A, H Abriouel, R L Lopez, et N Ben Omar.** «Bacteriocin-based strategies.» *Int J Food Microbiol* 120 (2007): 51-70
- Gibson et abd el Malek.** 1945.*The formation of carbone dioxide by lactic acid bacteria and Bacillus licheniformis and a cultural method of detecting the processus.* J. Dairy Res. 14: 35. in mmoire **Khodja Badra 2017-2018**
- Gibson, L.F, J Woodworth, and A.M George.** "Probiotic activity of aeromonas media on the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, when challenged with *Vibrio tubiashii*." *Aquaculture* 169 (1998): 111-120.in mémoire (**HammiIkram 16 septembre 2016** ).
- Guiraud, J.P.** (2003).*Microbiologie Alimentaire. Tec & Doc, Dunod. Paris, 90-292.* in mémoire de master (**Présenté par Mlle BEDOUD Hidaya Mlle BOUFENINZA Loukha Mlle BOUZIANE Soumia 2018-2019**).
- Hampikyan H, Bingol EB, Colak H, Aydin A** (2009) *The evaluation of microbiological profile of some spices used in Turkish meat industry.* *Journal of Food, Agriculture and Environment* 7(3&4):111–115
- Hammes w.p.,Hertel C,**2006 the genera lactobacillus and carnobacterium.,prokaryotes.,4:320-403. in memoire magistère (**Belarbi Fatima 2010-2011**)
- Houser, B. A., Donaldson, S. C., Kehoe, S. I., Heinrichs, A. J.etJayarao, B. M.** (2008).A survey of bacteriologicalquality and the occurrence of *Salmonella* in raw bovine colostrum. *FoodbornePathogens and Disease*, 5(6), 853-858. in mémoire de master (**Présenté par Mlle BEDOUD Hidaya Mlle BOUFENINZA Loukha Mlle BOUZIANE Soumia 2018-2019**).
- Idoui., Boudjerda J., Leghouchi E et karam N.E.** 2009. *Lactic acid bacteria from « Sheep's Dhan », a traditionalbutter from shee'ps milk: Isolation, identification andmajor technological traits.* Gr. Y. Aceites. 60(2):177-183.in mmoire **Khodja Badra 2017-2018**
- Kacem, M. et Karam N.E.** (2006). Physicochemical and microbiologicalstudy of "shmen", a traditional butter made fromcamelmilk in the sahara (Algeria): isolation and identification of lacticacidbacteriaandyeasts. Gr. Y.Aceites, 57(2), 198-204. . in mémoire de master (**Présenté par Mlle BEDOUD Hidaya Mlle BOUFENINZA Loukha Mlle BOUZIANE Soumia 2018-2019**).

**Kandler O et Weiss N.** 1986. Genus *Lactobacillus* In : *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol 2, 9ième ed. Ed. Sneath PHA, Mair N.S., Sharpe M.E, Holt J.G. Williams and Wilkins, Baltimore USA.

**Klaenhammer, T.R.** "Bacteriocins of lactic acid bacteria." *Biochimie* 70 (1988): 337-349.

**Klein G.,Pack A.,Bonaparte c., Reuter G., 1998.**Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria international. *Journal of food microbgy.*,41:103-125. in memoire magistère (Belarbi Fatima 2010-2011)

**Martin S., Roe D., Faulon J.L.** 2005. Predicting protein-protein interactions using signature products. *Bioinformatics.* 21(2) :218-26.

**Moraes, M.P, L.M Perin, M.B.T Ortolani, A.K Yamazi, G.N Viçosa, and L.A Nero.** "Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic." *Food Sci.Technol* 43 (2010): 1320-1324.

**Mayra-Makinen, A. etBigret, M. A. R. C. (2004).** Industrial use and production of lacticacidbacteria. *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-*, 139, 175-198. in mémoire de master (Présenté par Mlle BEDOUD Hidaya Mlle BOUFENINZA Loukha Mlle BOUZIANE Soumia 2018-2019).

**Nes, I. F., Kjos, M. etDiep, D. B. (2011).** Antimicrobial components of lacticacidbacteria. *Lacticacidbacteria—microbiological and functionalaspects.fourthedition.* in mémoire de master (Présenté par Mlle BEDOUD Hidaya Mlle BOUFENINZA Loukha Mlle BOUZIANE Soumia 2018-2019).

**Piard, J.C, et M Desmazeaud.** «Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. I.» *Lait* 71 (1991): 525 - 541.

**Papagianni M., 2003.**Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function and applications. *Biotechnol. Adv.*21(6), 465-499.in mémoire Khodja badra 2017-2018

**Reis, J. A., Paula, A. T., Casarotti, S. N. etPenna, A. L. B. (2012).**Lacticacidbacteriaantimicrobialcompounds: characteristics and applications. *Food Engineering Reviews*, 4(2), 124-140. in mémoire de master (Présenté par Mlle BEDOUD Hidaya Mlle BOUFENINZA Loukha Mlle BOUZIANE Soumia 2018-2019).

**Ricciardi , A, and F Clement.** "Exopolysaccharides from lactic acid bacteria : Structure, production and technological applications." *ITAL J FOOD SCI* 12 (2000): 23-45. in mémoire **Hammi Ikram 16septembre 2016**

**Saidi N., Guessas B., Bensalah F., Badis A., Hadadji M., Henni D.E., Prevost H. et Kihel M. 2002.** Caractérisation des bactéries lactiques isolées du lait de chèvre des regions arides. *J. Alg. Reg. Arides. 1* :1-11. in mmoire**KhodjaBadra 2017-2018**

**Savado, A. et Traore, A. S. (2011).**La flore microbienne et les propriétés fonctionnelles des yaourts et laits fermentés. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 5(5), 2057- 2075. in mémoire de master (**Présenté par Mlle BEDOUD Hidaya Mlle BOUFENINZA Loukha Mlle BOUZIANE Soumia 2018-2019**).

**Savijokie, K., Ingmer H. ET Varmanen P. (2006).**Proteolyticsystems of lacticacidbacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 71, 394-406. in mémoire de master (**Présenté par Mlle BEDOUD Hidaya Mlle BOUFENINZA Loukha Mlle BOUZIANE Soumia 2018-2019**).

**Schillinger U.I., Lücke F.K. 1989.**Antibacterial activity of lactobacillus sake isolated from meat. *Appl Environ Microbiol.* 55(8) : 1901-6. . in mmoire**KhodjaBadra 2017-2018**

**Tailliez, P. (2001).** *Mini-revue:les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y a près de 3 milliards d'années.* *Le lait*, 81(1-2), 1-11. in mémoire de master (**Présenté par Mlle BEDOUD Hidaya Mlle BOUFENINZA Loukha Mlle BOUZIANE Soumia 2018-2019**).

**Tabasco R.,Rarup T., Janer c.,Pelae3c.,RequenaT.,2007**selective enumeration and identification of mixed cultures of streptococcus thermophilus,lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus,,Lacidophilus,L.poracasci Subsp and Bifidobacterium lactis in fermented milk. *Dairy Jonrrnal.*,23:250-255. in memoire magistère (**Belarbi Fatima 2010-2011**)

**Settanni, L, and A Corsetti.** "Application of bacteriocins in vegetable food." *Int J Food Microbiol* 121 (2008): 123-138

**Schillinger U.I., Lücke F.K. 1989.** Antibacterial activity of lactobacillus sake isolated from meat. *Appl Environ Microbiol.* 55(8): 1901-6.

# *Annexe*

## Annexe :Composition de milieux de culture et tampons

### Milieu MRS (De Man Rogosa et Sharpe, 1960)

Extrait de levure	5	g
Extrait de viande	10	g
Peptone	10	g
Acétate de sodium	5	g
Citrate de sodium	2	g
Glucose	20	g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2	g
MgSO <sub>4</sub>	0,25	g
MnSO <sub>4</sub>	0,05	g
Agar-agar	15	g
Cystéine-HCl	0,5	g
Eau distillée	1000	ml

pH=6,8

### Milieu M17 (Terzaghi et Sandine, 1975)

Peptone de caséine	10	g
Peptone peptique de viande	2,5	g
Peptone papaine de soja	5	g
Extraits de levure	2,5	g
Extraits de viande	5	g
B-glycérophosphate	19	g
MgSO <sub>4</sub>	0,25	g
Lactose	5	g
Acide ascorbique	0,5	g
Agar-agar	20	g
Eau distillée	1000	ml

pH=7.2

### Milieu Mueller Hinton (Muller et Hinton, 1941)

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

pH=7,4