REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DJILLALI LIABES DE SIDI BEL ABBES
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE MOLECULAIRE PROTEOMICS ET SANTE

THESE Présentée par

M^me BENMAMMAR née KHODJA Badra

EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLOME DE DOCTORAT 3ème CYCLE

Spécialité : Sciences Biologiques

Option : Microbiologie Moléculaire et Protéomics

Thème

Caractérisation phénotypique et moléculaire des souches de bactéries lactiques productrice de bactériocine.

Soutenu le : **Devant le Jury composé de :**

Président :

Mr. BENALI Mohammed (Professeur, Université de Sidi Bel Abbès).

Examinateurs :

Mr. ABBOUNI Bouziane (Professeur, Université de Sidi Bel Abbès).

Mr. BELABID Lakhdar (Professeur, Université de Mascara).

Directeur de thèse :

Mr. BENINE Mohamed El Amine (MCA, Université de Sidi Bel Abbès).

Année universitaire 2017/2018

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à tous ceux que j'aime :

A celui a qui je dois mon amour pour la science, mon très cher père Kada Farid. Tu as toujours su me motiver, Tu es un pilier solide et incontournable pour ma personne et mon parcours, que Dieu te donne santé et longue vie.

A la prunelle de mes yeux, celle qui a les clefs du paradis, a toi tendre Maman que ce travail soit pour toi le témoignage de mon infinie reconnaissance pour ton aide précieuse et toutes ces années de compréhension. Sans toi que serais- je ?

A mon beau père et ma belle mère

A mes très chères frères :Abdelkader, Abdelhadi, Mohamed et Ahmed

A mes belle soeurs: Samia, Hafida, Chaima , Mariem et Tinhinen

A mes beaux freres: Brahim, et Dahim

A tous mes amis, et surtouts : Fatima, Wafae, Amina et Aicha.

Le plus Grand merci Dédicace à une personne Chére à mon cœur mon marie "Hamza"
qui m'a supporté et d'avoir été très compréhensible

La cerise sur le gateau C'est la personne qui a donné un sens à ma vie et qui illumine de tous sont éclat ma vie ma petite et très chére fille Ritadj

A tout ceux que j'apprécie énormément, et qui contribuent à Nous rendre la vie plus agréable.

Merci à tous.

Remerciements

Avant tout je remercie tout d'abord Allah de m'avoir donné le courage, la force, la santé, et la patience pour pouvoir accomplir ce travail.

Toutes les expressions de l'estime et de gratitude du monde sont insuffisantes pour exprimer mes remerciements à mes parents qui m'ont accompagné durant tout mon cursus d'étude.

Je tiens à exprimer toute mes gratitudes et remerciements à mon encadreur Dr BENINE Mohamed Lamine. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour m'avoir accordé sa confiance et guidé dans mon travail, ces précieux conseils, sa disponibilité et sa gentillesse à notre égard ont contribué au bon déroulement de ce travail de recherche, mais aussi et surtout pour sa qualité humaine.

Je tiens à exprimer ma très grande considération et ma vive reconnaissance au Pr ABBOUNI Bouziane, pour son aide, ces compétences et ces conseils judicieux.

Mes vifs remercîments sont adressés aux membres du jury Messieurs le président Pr. BENALI Mohamed. (Université Djillali Liabes, SBA), Pr .ABBOUNI Bouziane. (Université Djillali Liabès, SBA) et. Pr. BELABID Lakhdar (Université de Mascara) qui me font un grand honneur d'évaluer ce travail.

Un grand merci à, Mr. Dr. KERKOUD Mohamed pour leur précieuse aide et ses conseils pour la réalisation de la partie moléculaire.

Je n'oublie pas de remercier particulièrement M^{me} SAFER Khadija Professeur à l'université d'Oran qui m'a beaucoup aidé, encouragé, dans des moments très délicats.

J'adresse mes remerciements à tous les ingénieurs du laboratoire de microbiologie et biotoxicologie et en particulier Monsieur : SELIOUNI Mostapha, M^{me} MERASI Ferdous et M^{me}Haddad Fatima de leurs aides précieuse.

Un grand merci pour toutes les mamans qui ont accepté de contribuer à cette étude, en me permettant les prélèvements échantillonnales de leur lait maternel.

Résumé

L'intégration de nouvelles souches lactiques provenant de différents écosystèmes est actuellement utilisée pour l'augmentation de la durée de bioconservation des aliments. Outre, l'activité probiotique de certaines bactéries lactiques est exploitée dans la production des aliments à caractères préventif et thérapeutiques.

L'objectif de ce présent travail est l'isolement et caractérisation de bactéries lactiques productrices de bactériocine du lait maternel, l'optimisation de certain facteurs tels que le pH, la température d'incubation impliquées dans la production de la bactériocine. L'isolement des bactéries lactiques productrices de bactériocine est effectué à partir d'échantillons prélevés du lait maternel. Le criblage primaire des souches lactiques à partir de lait maternel, sur un milieu de culture gélosé a permis l'isolement de 28 souche lactique. Le criblage secondaire des bactéries isolées du lait maternel a permis la sélection de 13 souches lactique antagoniste ont été identifiées sur les plans physiologique et biochimique.

L'étude des interactions a révélé un pouvoir inhibiteur de quatre souches sélectionnées fortement inhibitrices vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* UT 602, *S.aureus* CECT 86T, *S.aureus* ATCC 25923, *S.aureus* ATCC 43300 et *E. coli* ATCC 25922. L'effet antagonique a été évalué par des techniques de diffusion sur gélose (méthode de double gélose, méthodes des puits). L'amplification du fragment d'ADN codant la régions 16S ARN des quatre souches lactiques, sélectionnés hautement antagoniste et leur séquencage ont révélé leur appartenance aux espèces suivants : LbL15 :*Enterococcus faecium*, LbC11 : *Enterococcus faecium*, LbC3 : *Lactobacillus brevis*, LbL4 : *Lactobacillus sakei*. En soustrayant l'effet du pH, du H_2O_2 l'inhibition reviendrait à des facteurs antimicrobiens de nature protéique (bactériocine) comme il a été révélé avec *Lactobacillus brevis* (LbC3). L'optimisation de la production de la bactériocine sur milieu MRS est rendue meilleure à un pH de 6 et à une température de 30°C. La cinétique de croissance *d'E.coli* ATCC25922 en présence et en absence de la bactériocine produite par *L.brevis* (LbC3) a montré que la biomasse bactérienne a diminué progressivement après l'ajout des bactériocines. Les résultats des tests technologiques de cette souche sont satisfaisants pour une utilisation industrielle car elle possède une activité protéolytique et un bon pouvoir acidifiant. L'antibiotype de la souche LbC3 montre 50% de sensibilité vis-à-vis des antibiotiques tests.

L'étude des interactions inhibitrices de la souche LbC3 à l'égard de bactéries pathogènes envisagera leur utilisation à des fins technologiques.

Mots-clefs : Isolement, lait maternel, bactéries lactiques, bactériocine, optimisation.

Abstract

The integration of new lactic acid bacteria strains isolated from diverse ecosystems is now used to increase the biopreservation of dairy products. Moreover, probiotic activity of lactic acid bacteria is exploiting in the fact to produce functional foods.

The aim of this study is the isolation and identification of lactic bacteria strains that produce bactériocin from breast milk, optimization of bactériocin and bactériocin production.

The primary screening of lactic acid strains from breast milk on an agar culture medium allowed to isolate 28 lactic strain. The secondary screening of bacteria isolated from breast milk allowed the selection of 13 antagonistic lactic acid bacteria were identified by physiological and biochemical methods. The study of the interactions revealed that four selected highly inhibitory strains capable of inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* UT 602, *S. aureus* CECT 86T, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 43300 and *E. coli* ATCC 25922. The Antagonistic effect was evaluated by diffusion techniques on agar (double agar method, well methods).

The amplification and sequencing of the fragment DNA coding 16S RNA regions of the 4 isolates selected highly antagonist was performed and revealed their belonging to the strains: LbL15 :*Enterococcus faecium*, LbC11 : *Enterococcus faecium*, LbC3 : *Lactobacillus brevis*, LbL4 : *Lactobacillus sakei*. By eliminating the effect of pH, H2O2 from the antimicrobial factors, the inhibiting agent of *Lactobacillus brevis* (LbC3) was determined as a substance of proteinous nature (bactériocin). The optimization bactériocin LbC3 production was made in a MRS différent concentration de pH. The best diffusion of this bacteriocin in an agar at pH equal to 6 and a temperature of 30°C, allowed a better evaluation of its inhibitory effect. The study of bacterial growth of *E.coli* ATCC 25922 in the absence and in the presence of the supernatant *L.brevis* (LbC3) indicated a considerable biomass reduction accompanied with unbalanced growth after adding of the supernatant. The results of technological tests of the strain are satisfactory for industrial use: possesses proteolytic activity and showed a good acidifying power. LbC3 strain behavior was evaluated with 10 antibiotics and had shown sensitivity to 50% of them.

The study of the inhibitory interactions of the LbC3 strain with regard to pathogenic bacteria will consider their use for technological purposes.

Keywords: Isolation, human breast milk, bactériocin, optimization.

ملخص

الأصناف الجديدة من بكتيريا الحليب الناجمة عن أوساط مختلفة تستعمل لإغراض وقائية كما تستغل للإطالة من مدة صلاحية المواد الغذائية.

الهدف من هذا العمل هو عزل وتحديد بكتيريا حمض اللبن المنتجة للبكتيريوسين من حليب الام, دراسة العوامل الفيزيائية المؤثرة في انتاج البكتريوسين (درجة الحرارة, الرقم الهيدروجينى).

تم عزل 28 بكتيريا حمض اللبن من حليب الام. وقد تم اختبار قدرتها على التضاد البكتيري والتي اسفرت عن تحديد13 سلالة حمض اللبن وتم اختبار تحليل هوياتها من خلال الطرق الفسيولوجية والبيو كيميائية.

دراسة التفاعلات تكشف أن أربع سلالات مختارة مثبطات قوية قادرة على منع نمو *S. aureus* CECT 86T .*S. aureus* UT 602, , *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 43300 et *E. coli* ATCC 25922

هذه السلالات تم التأكد من هويتها مرة أخرى من خلال الأساليب الجزئية للحمض النووي الريبوزومى16S كالتالي:

LbL15 :*Enterococcus faecium*, LbC11 : *Enterococcus faecium*,

LbC3 : *Lactobacillus brevis*, LbL4 : *Lactobacillus sakei*

من خلال إبعاد تأثير الحموضة و H_2O_2 عن العوامل المضادة للبكتيريا تم تحديد عامل الابادة (LbC3) *Lactobacillus brevis*كمادة طبيعية بروتينه (البكتيريوسين). تم تحسين انتاج البكتريوسين ل LbC3 في الوسط الغذائي MRS بتغيير درجة الحموضة. هذا الإنتاج في وسط له pH يساوي 6 ودرجة الحرارة 30 درجة مئوية سمح بتقييم أفضل لمفعولها. حركية النمو *E.coli* ATCC25922 في وجود أو عدم وجود البكتيريوسين التى تنتجها*L.brevis* ، أظهرت أن الكتلة الحيوية البكتيرية انخفضت تدريجيا بعد إضافة البكتيريوسين. نتائج الاختبارات التكنولوجية لهذه السلالة هي مرضية للاستخدام الصناعي: لديه خاصية نشيطة في التحليل البروتينى والحمضي. كما أن السلالة LbC3 لها سلوك مختلف ضد 10 مضاد حيوي وهي حساسة ل 50% من المضادات الحيوية المستعملة.

دراسة التفاعلات المثبطة لسلالة LbC3 فيما يتعلق بالبكتريا المسببة للأمراض سوف تنظر في استخدامها لأغراض تكنولوجية.

الكلمات المفتاحية: عزل، حليب الام، بكتيريا حمض اللبن، البكتيريوسين.

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction générale…… 01

Synthèse bibliographique

1- Lait maternel ……. ……. 03

1-1 Généralité…… 03

1-2 La composition du lait maternel…….…… 03

1-2-1 Les protéines ……. 04

1-2-2 Les caséines …….. 04

1-2-3 Les protéines solubles …… 04

1-2-4 Les lipides …….. 04

1-2-5 Les glucides ……... 05

1-2-6 Azotes et sels minéraux ……. 05

1-3 Microbiote du lait maternel …… 05

1-4 Les bactéries lactiques……..... 06

1-4-1 Définition……...…….……. 06

1-4-2 Propriété générales…….…….……. 06

1-4-3 Classification ……. …… 07

1-4-4 Principaux genre des bactéries lactique……... 09

1-4-4-1 *Lactobacillus*…….……... 09

1-4-4-2 *Lactococcus*…….. 10

1-4-4-3 *Enterococcus*……..... 11

1-4-4-4 *Pediococcus*…….. 11

1-4-4-5 *Streptococcus*……... 11

1-4-4-6 *Bifidobacterium*…… 12

1-5 Effet probiotique et propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques…….. 12

1-5-1 Les acides organique……. 12

1-5-2 Le peroxyde d'hydrogéne……. 12

1-5-3 Le dioxyde de carbone……. 13

1-5-4 Le diacétyl ……. ……..... 13
1-5-5 La reutérine…….. 13
1-5-6 Les bactériocines…….…… 13
1-6 Bactériocines des bactéries lactiques…… 14
1-6-1 Historiques et définition……...……... 14
1-6-2 Classification …….. 14
1-6-2-1 Classe I : Les Lantibiotiques …….. 14
1-6-2-2 Classe II : Non-Lantibiotiques ….…… 16
1-6-2-3 Classe III : Les Bactériolysines….…… 16
1-6-2-4 Classe IV …….…… 16
1-6-3 Production des bactériocines…….……..... 16
1-6-4 Mécanismes d'action des bactériocines……... 16
1-6-5 Spectre d'activité du bactériocines..…… 17
1-6-6 Le conditionnement des bactériocines……. 19
1-6-7 Domaine d'application des bactériocines…… 19
1-6-7-1 Domaine alimentaire……... 20
1-6-7-2 Domaines de la médecine humain……..…… 20
1-6-7-3 Domaines agricoles……..... 20
1-7 identification des bactéries par la biologie moléculaire……... 21
1-7-1 Méthode basées sur la PCR…… 21
1-7-2 Amplification de régions consensus et séquençages…….. 22
1-7-2-1 Principe …… 22
1-7-2-2 Protocole générale……... 22

Matériels et méthodes

2-1 Prélèvement du lait maternel …… 23
2-2 Isolement et purification des isolats……... 23
2-3 Purification des isolats de bactéries lactiques…… 23
2-4 Conservation des isolats……. 23
2-5 Caractérisation morphologique…….. 24
2-5-1 Examen macroscopique des colonies……...…… ... 24
2-5-2 Examen microscopique …….. 24
2-5-2-1 Observation à l'état frais…… 24
2-5-2-2 Coloration de Gram…… 25

2-5-3 Test biochimique et physiologiques……..…… 25
2-5-3-1 Test de la catalase……..…… 25
2-5-3-2 Croissance à différente température…….…… 25
2-5-3-3 Croissance à différent pH……..……..…….. 25
2-5-3-4 Culture sur milieu hypersalé……..... 25
2-5-3-5 Recherche de type fermentaire…….…… 25
2-5-3-6 Test d'hémolyse …….. 26
2-5-4 Identification de l'espèce par galerie API50 CH…… 26
2-6 Etude des interactions bactériennes……... 26
2-6-1 La méthode directe (spot agar test)…… 26
2-6-2 La méthode indirecte (well diffusion assay)…….. 26
2-6-3 Localisation de la substance inhibitrice……. 27
2-6-4 Mise en évidence de la nature de l'agent inhibiteur…….. 27
2-6-4-1 Inhibition due au peroxyde d'hydrogène……. 27
2-6-4-2 Inhibition due à la production d'acide organique……. 27
2-6-4-3 Recherche de substance inhibitrice de nature protéique…….. 27
2-6-5 Optimisation de la production de bactériocine…….. 27
2-6-5-1 Effet de la température d'incubation…… 27
2-6-5-2 Effet du pH……..…… 28
2-7 Mode d'action des bactériocines…….. 28
2-8 Caractérisation technologique …..…….…….. 28
2-8-1 Pouvoir acidifiant …….……. 28
2-8-2 Pouvoir protéolytique……..……... 28
2-8-3 Pouvoir lipolytique…… 38
2-8-4 Etude de l'antibiorésistance…… 29
2-8-5 Cinétique de la croissance (production de biomasse)…… 29
2-9 Identification génotypique……...……. 29
2-9-1 Extractions de L'ADN……... 29
2-9-2 Amplification de L'ADN par PCR…… 30
2-9-3 Electrophorèse sur gel d'agarose…….…….. 31
2-9-3-1 Préparation du gel ……... 31
2-9-3-2 Dépôt des échantillons (produits d'amplification)…….. 31
2-9-3-3 Migration …… 31

2-9-3-4 Visualisation…… 31
2-9-7 Séquençage d'ADN…….…….. 32

Résultats et discutions

3-1 Échantillonnage……..…….…….. 33
3-1-1 Chois des isolats……..…….……..... 35
3-2 Caractérisation phénotypique des isolats……...…… 35
3-2-1Caractérisation macroscopique ……... 35
3-2-2 Caractérisation microscopique…… 35
3-2-3- Test biochimique et physiologique…… 38
3-2-4 Le type fermentaire……..…….. 39
3-3 Identification par galerie api 50CH……..……. 40
3-4 Criblage des souches antagonistiques…… 42
3-4-1 Localisation de la substance inhibitrice…….. 45
3-4-2 Mise en évidence de la nature de l'agent inhibiteur…….. 46
3-4-2-1 Inhibition due à la production d'acide organique……. 47
3-4-2-2 Inhibition due au peroxyde d'hydrogène……. 47
3-4-3 Recherche de la substance inhibitrice de nature protéique……. 48
3-4-4 Optimisation de la production de bactériocine……... 48
3-4-4-1 Effet de la température d'incubation……... 49
3-4-4-2 L'effet du pH……. 50
3-5 Mode d'action des bactériocines…… 51
3-6 Caractérisation technologique des isolats de bactéries ……. 52
3-6-1 Pouvoir acidifiant…….…….. 52
3-6-2 Pouvoir proteolytique……..……..... 54
3-6-3 Pouvoir lipolytique……. 56
3-7 Détermination des profils de sensibilité aux antibiotiques..... 57
3-8 Cinétique de la croissance (Production de biomasse)……..... 60
3-9- Identification genotypique.....…... 60
Conclusion et perspective ……. 66
Référence bibliographique……. 68

Annexe

Annexe1 : Composition de milieu de culture et tampon…….. 81

Annexe 2 : Antibiotique utilisée…… 83
Annexe 3 : Questionnaire …….. 84

Liste des tableaux

Tableau 1	**:**	Composition moyenne du colostrum (en gpour100ml) (Rotten, 1991).	3
Tableau 2	**:**	Composition moyenne du lait maternel (%).	4
Tableau 3	**:**	Taxonomie et les clés de différentiation des bactéries lactiques (Holzapfel *et al*., 2001).	8
Tableau 4	**:**	Classification des bactériocines (papagianni, 2003).	15
Tableau 5	**:**	Bactériocine produite par des bactéries probiotiques (Gillor, 2008).	18
Tableau 6		Volumes des composants de la solution mixte utilisée pour l'amplification d'ADNr 16s.	31
Tableau 7	**:**	Origine des prélèvements du lait maternel.	34
Tableau 8	**:**	Illustration des critères morphologique et microscopique des bactéries lactiques isolées du lait maternel.	37
Tableau 9	**:**	Présentation des caractères physiologiques des souches lactiques isolées, sélectionnées antagonistes.	38
Tableau 10	**:**	Type fermentaire des souches lactiques isolées, sélectionnées antagonistes.	39
Tableau 11	**:**	Présentation des caractéristiques biochimiques des souches isolées sélectionnées antagonistes, lors de l'utilisation de la galerie Api 50CHL.	41
Tableau 12	**:**	L'étude de l'activité antibactérienne des souches lactiques par la méthode directe.	44
Tableau 13	**:**	L'étude de l'activité antibactérienne du culot des bactéries lactiques par mesure du diamètre de la zone d'inhibition (mm).	45
Tableau 14	**:**	L'étude de l'activité antibactériennes de surnageant des bactéries lactiques par mesure de la moyenne des diamètres de la zone d'inhibition (mm).	46
Tableau 15	**:**	Activité protéolytique et lipolytiques des bactéries lactiques étudiées.	55
Tableau 16	**:**	Résultats de la résistance et la sensibilité aux antibiotiques des bactéries lactiques étudiées.	57

Tableau 17 : Présentation d'un complet génome de la souche sélectionné antagoniste LbL15. 62

Tableau 18 : Présentation d'un complet génome de la souche sélectionné antagoniste LbC11. 63

Tableau 19 : Présentation d'une séquence partielle d'ADN de la souche productrice de la bactériocine LbC3. 64

Tableau20 : Présentation d'une séquence partielle d'ADN de la souche sélectionné antagoniste LbL4. 65

Liste des figures

Figure 1	**:**	Arbre phylogénétique des bactéries lactiques (Holzapfel *et al*., 2001).	9
Figure 2	**:**	Mécanisme d'action des bactériocines.	17
Figure 3	**:**	Vue d'ensemble des applications potentielles des bactériocines (De Vuyst et Leroy, 2007).	19
Figure 4	**:**	Conservation de longue durée des bactéries lactiques purifiées (Saidi *et al*., 2002).	24
Figure 5	**:**	Les types de lait maternel.	33
Figure 6	**:**	Illustration des modes d'accouchement des femmes allaitante.	33
Figure 7	**:**	Répartition d'âge des femmes Allaitant.	34
Figure 8	**:**	Aspect macroscopique des bactéries lactiques, isolées du lait maternel, inoculées sur milieu MRS incubée à une température de 37°C pendant 48h.	36
Figure 9	**:**	Coloration de Gram et l'observation microscopique des souches isolées, sélectionnés lactiques (Gx100).	36
Figure 10	**:**	Test d'hémolyse négatif des souches lactiques isolées du lait maternel.	39
Figure 11	**:**	Photo illustrative du test de recherche du type fermentaire des bactéries lactiques, (milieu de culture de MRS glucosé, mini d'une cloche de Durham).	40
Figure 12	**:**	L'activité antagoniste des souches isolées, sélectionnées lactiques vis-à-vis certaines souches pathogènes.	42
Figure 13	**:**	Pourcentage des bactéries lactiques, isolées a partir de lait maternel inoculées sur milieu de culture MRS, présentant une activité antagoniste vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* UT 602.	43
Figure 14	**:**	Pourcentage des bactéries lactiques, isolées a partir de lait maternel inoculées sur milieu de culture MRS, présentant une activité antagoniste vis-à-vis *Staphylococcus aureus* ATCC 43300.	43
Figure 15	**:**	Pourcentage des bactéries lactiques, isolées a partir de lait maternel inoculées sur milieu de culture MRS, présentant une activité antagoniste vis-à-vis E. coli ATCC 25922.	44

Figure 16 : Les diamètres de la zone d'inhibition de *S aureus CECT86^T* et *d'E coli* 25922 en présence des bactéries isolées, sélectionnées antagonistes. 45

Figure 17 : Prévalence de la substance inhibitrice produite par les bactéries lactiques isolées du lait maternel. 47

Figure 18 : Zones d'inhibitions formées par le surnageant de LbC3 quel que soit le temps thermique à1 00°C. 48

Figure 19 : L'effet de la température d'incubation sur la production de la bactériocine. 49

Figure 20 : Effet du pH sur l'activité antagoniste de *L.brevis* (LbC3) vis-à-vis *E.coli* ATCC25922. 50

Figure 21 : Cinétique de croissance *d'Escherichia coli* ATCC25922 en présence et en absence de surnagent de *L. brevis* (LbC3). 51

Figure 22 : Variation de pH des souches isolées faiblement acidifiées. 52

Figure 23 : Variation de pH des souches isolées moyennement acidifiées. 53

Figure 24 : Variation de pH des souches isolées fortement acidifiées. 54

Figure 25 : Recherche d'activité proteolytique des bactéries lactiques isolées sélectionnés antagonistes sur milieu PCA. 54

Figure 26 : Teste d'activité lipolytique des bactéries lactiques isolées séléctionnées antagonistes. 56

Figure 27 : Quelques résultats du test de l'étude de la sensibilité des souches isolées sélectionnés antagonistes aux antibiotiques. 56

Figure 28 : Pourcentage de la résistance de chaque souche isolée sélectionné antagoniste vis à vis les dix antibiotiques. 58

Figure 29 : Comportement des souches isolées sélectionnés antagoniste vis-à-vis de chaque antibiotique testé. 59

Figure 30 : Cinétique de croissance par les souches sélectionnés antagonistes A : LbC3 ; B : LbL4. 60

Figure 31 : Cinétique de croissance par les souches sélectionnés antagonistes C : LbL15 ; D :LbL11. 60

Figure 32 : Electrophorèse sur gel d'Agarose à 1.2% : d'un fragment de 1500pb amplifié par les amorces universelles. 61

Figure 33 : Aspect morphologique des isolats les plus intéressants. 61

Liste des Abréviations

E	*Escherichia*
En	*Enterococcus Faecuim*
L	*Lactobacillus*
LbC	Bactérie lactique du colostrum
LbL	Bactérie lactique du lait maternel
Lc	*Lactococcus*
S	*Staphylococcus*
Sp	Especes non précise
Ssp	Sous espèce
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ARNr	Acide Ribonucléique Ribosomique
ATCC	Americain Type Culture Collection
dNTP	Desoxynucléotides
DO	Densité Optique
EDTA	Acide Ethylene Diamine Tetra Acétique
G+C	Guanine+Cytosine
GRAS	Generally Regarded As Safe
MRS	Man Rogosa et sharp
Pb	Paire de base
PCR	Polymerase Chain Réaction
TBE	Tris borate- EDTA
TES	Tris EDTA-Saccharose
UFC	Unité formant Colonie
UV	Ultra- Violet

INTRODUCTION

Les bactéries lactiques ont été, depuis longtemps, un outil de conservation et de transformation des aliments, en dépit de l'ignorance de ces potentiels technologiques. Elles étaient présentes dans de nombreux écosystèmes microbiens, car elles ont la particularité de prédominer dans des environnements assez riches tels que le lait et ces dérivés, les végétaux et dans les cavités humaines et les cavités animales.

Les aliments constituent un environnement, dans lequel plusieurs bactéries peuvent cohabiter. Certains de ces microorganismes provoquent seulement des altérations des produits alimentaires alors que d'autres, comme listeria, causent des maladies aux consommateurs. D'où l'importance de les éliminer. Les antibiotiques présentent depuis quelques décennies un excellent moyen pour faire barrage à tous ces microorganismes nocifs. Cependant, ils présentent le grand danger de l'apparition de multirésistances chez ces derniers **(Benmouna, 2012)**.

La présence des bactéries lactiques dans différents écosystèmes, peut assurer, d'une part, le bon déroulement des étapes de production d'un aliment fermenté, ses qualités organoleptiques, et d'autres part, sa conservation naturelle (ou bioconservation), en réduisant ou éliminant l'addition des conservateurs chimiques et en les remplaçant par d'autres qui sont naturels **(O'Sulvan, 2003)**.

La bioconservation des aliments, est due aux pouvoirs antagonistes des bactéries lactiques. En effet, elles ont la particularité de synthétiser des substances inhibitrices, principalement les acides organiques (acide lactique et acide acétique), le peroxyde d'hydrogéne (H_2O_2) et les bactériocines. Ces dernières ont fait l'objet de nombreuses études **(Deegan *et al*., 2006)**.

Ces dernières années, l'intérêt de l'emploi de la bactériocine et ou tout autre bactéries lactiques productrices de substances inhibitrices pour des applications de bio-conservation a suscité beaucoup de recherches **(Schillinger et Lucke, 1989 ; Budde *et al*., 2003 ; Jacobsen *et al*., 2003 ; Vermeiren *et al*., 2004 ; Guessas, 2007)**.

A notre connaissance, les bactéries lactiques trouvées dans le lait maternel restent peut décrite dans la littérature **(jara *et al*., 2011)**; à cet effet, elles peuvent constituer une niche écologique riche et importante pour le criblage des souches lactiques productrice de bactériocine avec de nouvelles propriétés technologiques. Parmi les principales caractéristiques souhaitées pour l'utilisation industrielle d'une souche dans la bioconservation sa capacité de produire des substances inhibitrices. Cependant d'autres propriétés peuvent affecter les critères technologiques ou présenter des risques pour les consommateurs tels l'antibiorésistance **(Guiraud et Rosec, 2004)**. C'est pourquoi le critère « antibiorésistance » est l'un des critères d'évaluation de l'innocuité des souches d'intérêt technologique utilisées comme ferment.

Les objectifs tracés pour la réalisation de ce présent travail sont :

- L'isolement d'une large gamme de souches de bactéries lactiques productrice de bactériocines à partir du lait maternel de la région ouest Algérien.
- La mise en évidence de l'activité antagoniste des souches de bactéries lactiques vis - à- vis de certain souche pathogène.
- L'optimisation de certain facteurs tels que le pH, la température d'incubation impliquées dans la production de la bactériocine.
- L'identification des souches isolées sélectionnés antagoniste par l'utilisation de la galerie Api 50CH et l'amplification du fragment d'ADN codant la région conservée de ARN 16S.
- Evaluation de l'antibiorésistance des souches sélectionnées antagonistes.

1 Lait maternel

1.1 Généralité

Le lait maternel est produit par les cellules sécrétrices des glandes mammaires des mammifères. Il est riche en protéine et en glucides **(Vilain, 2010)**. Il agit comme un moyen de transport de nombreuses substances essentielles de la mère à l'enfant. Chez l'être humain, C'est une émulsion complexe qui fournitures non seulement les nutriments et l'énergie nécessaires pour les facteurs de croissance et de développement de l'enfant, mais aussi qui aident à la protection microbiologique, en réglementant le mécanismes de défense, et accélérer la maturation postnatale du système digestif **(Jara *et al*., 2011)**.

1.2 La composition du lait maternel

La composition du lait maternel varie selon le nombre de jours post-partum, le moment de la journée, la phase de la tétée et l'état nutritionnel de la mère. Des variations interindividuelles sont également enregistrées. Les trois types de lait que l'on retrouve en post-partum sont le colostrum (1 à 7 jours), le lait de transition (7 à 13 jours) et le lait mature (14 jours et plus) **(Lawrence et Lawrence, 1999)**.

Tableau 1 : Composition moyenne du colostrum (en g pour 100ml) **(Rotten, 1991)**.

Durée	Eau	Glucide	Protéine	Lipide	Sels minéraux
J1	84,5	2,8	9,8	2,6	0,4
J2	86,5	3,5	7,5	2,2	0,4
J3	87,3	5,4	3,3	3,8	0,3

Le **Tableau 1** présente les variations dans la composition du lait (colostrum) durant les trois jours du post partum relativement à la concentration en glucides, en lipides et en protéines ; en fonction du nombre de jours post-partum. Pendant les premiers jours de vie de l'enfant, le lait maternel (colostrum) est en moyenne plus enrichie en protéines, plus faible en lipides et plus glucidique que les autres types de lait (lait de transition, lait mature).

Dans les jours qui suivent, la concentration en protéines diminue progressivement alors que la concentration en lipide et en lactose augmente graduellement. Le volume de lait excrété de même que la concentration en lipides peuvent varier d'un sein à l'autre et d'un moment de la journée à l'autre**)**.

Parmi les autres facteurs associés aux changements dans la teneur en lipides totaux du lait humain, on retrouve : l'âge gestationnel de l'enfant à la naissance, la diète, les infections et les désordres métaboliques, la parité, l'adiposité maternelle, le stade de la tétée et le sevrage La composition du lait est corrélée à la quantité de lait consommée par l'enfant et de la régularité des tétées **(Lawrence et Lawrence, 1999)**.

La composition du lait maternel varie au cours de la période totale d'allaitement, du colostrum au lait mature.

Tableau 2 : Composition moyenne du lait maternel (%).

	Eau	Glucide	Protéine	Lipide	Na	K	Cl	Ca
Lait maternel	88 gr	6.8 gr	1,2 gr	3.8 gr	15 mg	55 mg	43 mg	33 mg

1.2.1 Les protéines

La teneur en protéines du lait de femme, comprise entre 0.8 et 1.2 gr pour 100ml, est nettement inférieure à celle des autres mammifères. Néanmoins, elle est parfaitement adaptée aux besoins du nourrisson en raison d'une excellente absorption et d'une parfaite adéquation du profil de ses acides aminés. Les protéines sont constituées essentiellement par les caséines et les protéines solubles. (**Hamosh, 2000).**

1.2.2 Les caséines

Elles sont présentes à un faible taux dans le lait maternel (40%, contre 80 % pour le lait de vache), de ce fait la coagulation du lait de femme est plus fine, ce qui permet une vidange gastrique plus rapide.

La dégradation des caséines libère des peptides à activité biologique (type opioïde ou anti-infectieuse) ou encore des fractions glycopeptidiques stimulant la croissance des bifidobactéries dans le tube digestif du nourrisson **(Ricour *et al*., 1993).**

1.2.3 Les protéines solubles

Ce sont les protéines qui ne précipitent pas avec les caséines, elles se composent essentiellement :

- Des immunoglobulines et des lysozymes, intervenants majoritairement dans les défenses immunitaires du nourrisson.
- De la lactotransferrine, qui est une protéine de transport spécifique pour le fer, pour lequel elle possède une très forte avidité. Ainsi le fer maternel présent à un taux plus faible que dans les préparations industrielles est grâce à cette protéine, capté de manière optimale par le nourrisson. La lactotransferrine, chélatant le fer indispensable a l'expréssion de la virulence des souches pathogenes **(Jia *et al*., 2001).**

1.2.4 Les lipides

La teneur en lipides du lait maternel est proche du lait de vache (3.5gr pour 100 ml). La supériorité du lait maternel réside encore dans une meilleure adaptation pour le nourrisson.

Le coefficient d'absorption des lipides issus du lait maternel dans le tube digestif du nourrisson est de 80 % les 1ers jours contre 60 % avec le lait de vache et, à 3 mois il est de

95 % contre 80 % avec le lait de vache. Ceci est dû à la présence d'une lipase spécifique aux capacités physiologiques du nourrisson. Elle est mise en activité par interaction avec les sels biliaires du tube digestif du nouveau-né et elle est spécifique à la structure des triglycérides du lait maternel.

Le lait maternel apporte par ailleurs des acides gras essentiels intervenant dans la maturation cérébrale et rétinienne du nouveau-né, ainsi que du cholestérol intervenant dans la structure des membranes et comme précurseur hormonal notamment **(Owen *et al*., 2002).**

1.2.5 Les glucides

Le lait de femme est plus riche en glucides que le lait de vache (7.5gr contre 4.5gr pour 100 ml). Alors que le lait de vache ne comporte que du lactose, chez celui de la femme 15 % des glucides sont des oligosaccharides. Ces derniers sont formés de cinq sucres élémentaires (glucose, galactose, N-acétylglucosamine,fucose, acide sialique), de structure ramifiée, ils sont au nombres de plus de 130 **(Gnoth *et al*., 2000).**

Ces sucres ont démontré leur rôle dans la mise en place de l'écosystème bactérien colique et dans la protection des infections digestives et extra digestives en intervenant sur le système immunitaire **(Kunz *et al*., 2000).**

1.2.6 Azote et sels minéraux

Le lait maternel a une teneur faible en azote et en sels minéraux par rapport au lait de vache ce qui permet une moindre charge osmolaire rénale (80 mg par litre contre 230 mg dans le lait de vache ou 170mg dans une préparation pour nourrisson). En découle une meilleure adaptation en cas de pertes hydriques excessives chez le nourrisson, comme c'est là en cas de fièvre ou de diarrhées. **(Benhammadi, 2009).**

1.3 Microbiote du lait maternel

Le lait maternel demeure spécial par sa richesse par plusieurs groupes bactériens (10^3 -10^5 ufc/ml) prédominés par les *Staphylococcus,* les *Streptococcus,* les *Micrococcus, les Lactobacillus,* les *Enterococcus,* les *Lactococcus* et les *Bifidobacterium*. Son apport favorise la prédominance de bifidobactéries et de lactobacilles dans la flore intestinale de l'enfant **(Jara *et al*., 2011)** et des groupe des bactéries lactiques. L'origine de ces bactéries est probiotiques **(Perez *et al*., 2007)**.

Les espèces les plus souvent isolées dans le lait maternel sont *Staph. epidermidis*, *Staph. aureus*, *Strep. mitis*, *Strep. salivarius*, *L.salivarius*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. rhamnosus*, *B. breve* et *B. bifidum*. Des études récentes sont parvenues à mettre en lumière jusqu'à 700 espèces différentes de bactéries. **(Cabrera *et al*., 2012).**

Tout ne peut pas se résumer à cela, il existe aussi des différences considérables entre la composition du microbiote de la peau et celle du lait maternel « Dans les échantillons de lait de la mère, nous avons trouvé des espèces de bactéries qui ne sont pas présentes sur le sein de la mère **(Fernández, 2013)**. De plus, les bifidobactéries qui font partie du microbiote du lait sont anaérobies. Ce facteur, à lui seul, fait de la peau ou de la bouche un environnement

peu favorable pour ce type de bactéries. Ces découvertes désignent plutôt les intestins maternels comme la source d'au moins certaines bactéries du lait maternel.

Le mécanisme exact par lequel les bactéries traversent l'épithélium intestinal, contournent le système immunitaire pour atteindre les glandes mammaires, reste encore mal défini à ce jour **(Martin, 2004).**

Le lait maternel contient plusieurs types de bactéries qui peuvent être considérées comme des probiotiques, ce qui signifie que ces bactéries exercent des effets anti-infectieux, anti-inflammatoires et métaboliques sur le bébé. Des chercheurs ont porté une attention particulière sur l'asthme et la dermatite atopique. Les bactéries du lait maternel pourraient améliorer voire même empêcher ces troubles. « Ce qui rend ces microbes particulièrement attirants comparés aux autres bactéries, c'est qu'ils sont d'origine humaine et qu'ils sont bien tolérés même par des organismes particulièrement sensibles comme ceux des bébés. Les bactéries du lait maternel sont adaptées de manière unique pour résider dans les intestins humains et pour avec une interaction avec nous dès notre naissance, et d'autres scientifiques s'intéressent à une autre maladie, la mastite. Ce trouble affecte jusqu'à un tiers des mères qui allaitent. Il est souvent résistant à une thérapie par antibiotiques et constitue la raison principale pour laquelle les mères arrêtent d'allaiter.

Certaines souches bactériennes du lait maternel (des lactobacilles comme *L.salivarius, L. gasseri et L. fermentum*) peuvent agir comme des probiotiques pour la mastite. Les études ont montré que les troubles des femmes qui ont ingéré ces bactéries pendant une période d'au moins trois semaines se sont beaucoup améliorés, Les bactéries probiotiques ingérées colonisent la glande mammaire par le chemin entéro-mammaire et une fois qu'elles ont atteint leur destination, elles réduisent les bactéries causant la mastite (*staphylococci* et *streptococci*) **(Jiménez *et al.*, 2013).**

1.4 Les bactéries lactiques

1.4.1 Définition

Le groupe des bactéries lactiques défini pour la 1ère fois par **Orla Jensen (1919)**, présente un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme**.** Elles colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, les viandes, les végétaux et les céréales et font parties de la flore gastro-intestinale et vaginale humaine ou animale. Elles sont impliquées dans un grand nombre de fermentations spontanées de produits alimentaires **(Pfeiler et Klaenhammer, 2007)**. Les bactéries lactiques sont bien tolérées par les animaux et l'homme ayant le statut GRAS 'Generally Recognized As Safe' **(Adams., 1988)**.

1.4.2 Propriété générales

Les bactéries lactiques sont des bactéries a Gram positif, immobiles, asporulées, catalase et oxydase négative, nitrate réductase négative, anaérobies ou aérotolérantes, se présentant sous formes de coques ou de bacilles qui ont moins de 55 mol % du contenu G+ C dans leur

ADN (à l'exception de *Bifidobacterium*). En outre, elles ne liquéfient pas la gélatine, ne produisent pas d'indole, ni d'hydrogène sulfureux **(Caplice et Fitzgerald, 1999)**.

Les bactéries lactiques sont généralement mésophiles ; certaines sont psychrotolérantes ou thermotolérantes elles se développent majoritairement à pH 4,0-4,5 et certaines sont encore actives à pH 9,6 ou pH 3,2. Elles ont des tolérances très variables vis à vis du sel. Enfin, les bactéries lactiques possèdent de faibles activités protéolytiques et lipolytiques et ont une exigence marquée en acide aminés, dérivés de base puriques et pyrimidiques et vitamines B **(Caplice et Fitzgerald, 1999).**

Toutes les bactéries lactiques ont un métabolisme fermentaire strictement saccharolytique qui, en utilisant les glucides, elles peuvent produire soit de l'acide lactique exclusivement (bactéries homolactiques strictes), soit de l'acide lactique et de l'acide acétique (bactéries hétérolactiques facultatives), soit de l'acide lactique, de l'acide acétique ou de l'éthanol et du CO_2 (bactéries hétérolactiques strictes) **(Vandamme *et al*., 1996)**.

1.4.3 Classification

La systématique est en évolution permanente. Il n'y a jamais eu de règles unanimement reconnue sur la façon dont deux bactéries différentes devraient être phénotypiquement classées. La littérature scientifique suit généralement les recommandations des comités de taxonomie qui opèrent sous les auspices de l'union internationale de sociétés microbiologiques **(Sneath, 2001)**.

La première classification des bactéries lactiques a été établie en 1919 par **Orla- Jensen**. Elle est basée sur les caractéristiques observables telles que les propriétés morphologiques, biochimiques et physiologiques. Les marqueurs chimiotaxonomiques, comme la composition des acides gras et les constituants de la membrane cellulaire, ont été également utilisés pour la classification **(Tableau 3)**.

Les bactéries lactiques appartiennent à la lignée des firmicutes, à la classe des bacilli, et à l'ordre des lactobacilles. D'après **Ludwig *et al*. (2008)**, les bactéries lactiques sont divisées en trois familles :

Famille des Lactobacillaceae comportant les *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* et *Pediococcus*.

Famille des Leuconostocaceae contenant les *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*.

Famille des Streptococcaceae comprenant les *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Lactovum*.

Tableau 3 : Taxonomie et les clés de différentiation des bactéries lactiques **(Holzapfel *et al.*, 2001).**

Genre	Forme	Catalase	Réduction nitrate	Fermentation	Genre types
Betabacteruim	bacille	-	-	Hétérofermentaire	*Lactobacillus*
Thermobacterium	bacille	-	-	Homofermentaire	*Lactobacillus*
Streptobacteruim	bacille	-	-	Homo et hétérofermentaire	*Lactobacillus*
					Carnobacterium
Streptococcus	coque	-	-	Homofermentaire	*Streptococcus*
					Enterococcus
					Lactococcus
					Vagococcus
Betacoccus	coque	-	-	Hétérofermetaire	*Leuconostoc*
					Oenococcus
					Weissell
Micobacteruim	bacille	+	+	Homofermentaire	*Brochothrix*
Tetracoccus	coque	+[1]	+	homofermentaire	*Pediococcu*
					Tetragenococcus

La classification actuelle des bactéries lactiques fait apparaitre douze genres : *Aerococcus*, *Carnobacteruim*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella***. (Stiles et Holzapfel, 1997)**.

Sur la base des données de séquençage de 16S et 23S de l'ADNr, les bactéries Gram positives forment deux embranchements. Un embranchement composé de bactéries Gram positives avec un pourcentage G + C inférieur à 50% (*Clostridium*) et un autre formé de bactéries ayant une teneur en G + C supérieure à 50% (Actinomycétes) **(Holzapfel *et al*., 2001 et Gevers, 2002)**. Les bactéries lactiques typiques ont une teneur en G + C inférieure à 50% alors que le genre *Bifidobacterium* qui, d'un point de vue physiologique, fait partie des bactéries lactiques, appartient à la branche des Actinomycètes qui comprend aussi *Propionibacterium* et *Brevibacterium* **(Vandamme et *al*., 1996) (Figure 1).**

[1] sont généralement catalase négative mais quelque souches produisent une pseudo-catalase qui résulte des réactions faussement positives

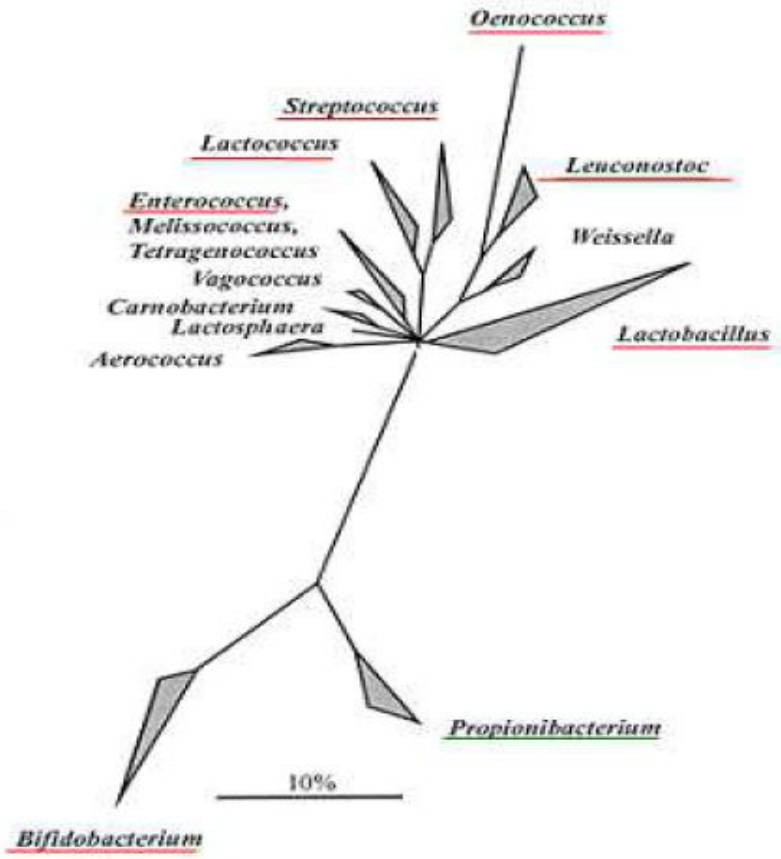


Figure 1 : Arbre phylogénétique des bactéries lactiques **(Holzapfel *et al.*, 2001)**.

La barre indique une divergence de séquence estimée de 10%. Les bactéries à base G+C (en haut) sont phylogénétiquement éloignées des bactéries à haut G+C sqs(en bas). Sont soulignés en rouge les genres pour lesquels la séquence d'au moins un génome est disponible, en vert ceux pour lesquels au moins un génome est en cours de séquençage.

1.4.4 Principaux genres des bactéries lactiques

1.4.4.1 *Lactobacillus*

Les lactobacilles sont des bactéries à Gram positif, microaérophiles se trouvant couramment dans une grande diversité environnementale, y compris les environnements laitiers riches en éléments nutritifs, les habitats microbiennes d'hôtes tels que les muqueuses humaines, ainsi que les niches écologiques naturels tels que les plantes et le sol. Le genre *Lactobacillus* appartient au phylum Firmicutes, la classe des Bacilli, et l'ordre des Lactobacillales **(Barrangou *et al*., 2012)**.

La multiplicité des niches écologiques de lactobacilles se refléte dans la diversité et phylogénie hétérogène du genre. Le genre comprend plus de cent espèces différentes, parmi d'autres beaucoup d'entre eux sont caractérisé biologiquement, technologiquement et commercialement tels que : *L. acidophilus, L. casei, L delbruekii susp. Bulgaricus, L. plantrum, L. rhamnosus* et *L.sarivaruis* **(Kleerebezem et Vaughan, 2009)**.

Les lactobacilles forment une partie de la microflore naturelle des animaux hôtes et occupent diverses niches à l'intérieur de l'hôte, tels que le tractus gastro-intestinale, le tractus urogénitale, la cavité buccale, et de la peau. Les lactobacilles sont présents dans les produits laitiers et sont particulièrement abondants dans les produits laitiers fermentés. En outre, les lactobacilles sont naturellement présents dans les plantes et le sol. *L. plantarum* a été signalée à être naturellement dominante survenant espèces bactériennes dans les légumes comme le chou et la laitue **(Yang et *al*., 2010)**. Sa température optimale de croissance est le plus souvent comprise entre 30 et 40°C. L'écart de pH pour la croissance se situe entre 3 et 8. En générale, elles tolèrent l'oxygène mais se développent bien dans des conditions anaérobies. Elles produisent de l'acide lactique en tant que principale produit de fermentation à partir de sucre.

Les lactobacilles ont des propriétés assez importantes, commençant par l'activité protéolytique pour couvrir ces besoins de croissance. Les systèmes protéolytiques contribuent aux changement biochimiques se produisant au cours de la maturation des divers produits alimentaires laitiers et non laitiers fermentés, conduisant à la production de peptides bioactifs avec des effets immunologiques et sur la santé **(Matar *et al*., 2001)**. Ils sont également responsables des propriétés organoleptiques des produits finis. Les propriétés fonctionnelles (corps, texture, fondre et extensibles). L'activité protéolytique des souches de *L.plantarum* peut avoir un rôle dans la préservation de la formation de toxine de *Clostridium botulinum* dans aliments réfrigérés **(Skinner *et al*.,1999)**. La lipolyse aussi est éventuellement essentielle dans l'affinage du fromage, des acides gras libres sont en outre convertis en cétones méthyliques, des lactones, des thioesters… etc., contribuent, en plus des acides gras libres, de flaveur du produit fini. Les lipases / estérases des bactéries lactiques semblent être exclusivement intracellulaires **(Castillo *et al*., 1999 ; Chich *et al*., 1997)**, avec l'activité remarquable la plus élevée chez *L. delberckii* subsplactis et *L. acidophilus* **(El-Soda *et al*., 1986)**. Il se trouve qu'un large éventail de souches de *Lactobacillus* est couramment utilisé comme probiotiques en raison de leur fonction favorables à la santé inhérentes ont été proposées **(Barrangou *et al.,* 2012)**.

1.4.4.2 *Lactococcus*

Le genre *Lactococcus* comprent sept espéces **(Batt, 2000)**. Morphologiquement les lactoquoques sont des coques à Gram positif de 0,5-1,5 µm, formant des chaines courtes. Elles sont mésophiles, capables de fermenter les hexoses par voie homofermentaire, produisant de l'acide lactique L (+), et ont des exigences complexes pour sa croissance **(Kim, 2014 ; Wright, 2012)**.

Les Lactocoques ont été isolés à partir des végétaux **(Cai *et al*., 2010 ; Carr *et al* 2002)**, du lait, ou à partir d'autre sources animales, y compris l'intestin humain **(Kubota *et al*., 2010)**.

La bactériocine découverte en 1927, nommée «Nisine» produite par *Lc*. *Lactis* est utilisée de Facon courante comme additif alimentaire (E234) pour la conservation de certain aliment, dont celle de la viande. Elle est par ailleurs la seul bactériocine pouvant légalement être utilisée comme agent de conservation.

1.4.4.3 *Enterococcus*

Les entérocoques sont des cocci ovoïdes à Gram positif se présentant isolées, en paires, en chaines courtes ou elles peuvent être disposées en groupes en particulier si la morphologie des cellules est étudiée à partir des cultures cultivées sur un support solide. Les cellules sont souvent allongées dans la direction de la chaine.

Les entérocoques peuvent jouer un rôle bénéfique dans la maturation et le développement de l'arôme de certains produits alimentaires traditionnellement fermentés tels que les fromages et la charcuterie. Elles sont également utilisés comme probiotiques humains, pour traiter les maladies diarrhéiques causées par des pathogènes d'origine alimentaire **(Svec et Franz, 2014)**.

1.4.4.4 *Pediococcus*

Les pédiocoques sont des bactéries à Gram positif, oxydase-négatives et catalase négative. Elles sont immobiles, se révèlent autant que cellules sphériques d'une taille uniforme et se disposent comme tétrades par autre division perpendiculaire en deux directions **(Gunther et Blanc, 1961)**.

Les espèces *P. acidilactici*, *P. pentosaceus*, *P. parvulus* et *P. inopinatus* sont des cultures starters importants dans la production de plusieurs produits à travers le monde **(Franz *et al*., 2014)**. *P. pentasaceus* peut jouer un rôle dans la fermentation et la maturation du fromage **(Callon *et al*., 2004)**. Un certain nombre de bactériocines (pediocines) a été décrit pour *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* **(Todorov et Dichs, 2005)**.

1.4.4.5 *Streptococcus*

Les membres du genre *Streptococcus* sont Gram positif, catalase négative, anaérobie facultatif ont la forme sphérique ou ovoïde, moins de 2µm de diamètre et un faible contenu en G +C. Les streptocoques ne sont pas mobiles et ne forment pas de spores. La température optimale de croissance est habituellement d'environ 37°C, mais des températures de croissance minimale et maximale peuvent varier entre les espèces. Beaucoup d'entre elles sont commensales de l'homme et les animaux, et certaines sont hautement pathogènes **(Whiley et Hardie, 2009)**.

1.4.4.6 *Bifidobacterium*

Les bifidobactéries sont des bacilles à gram positif, non mobiles, ne produisent pas du gaz et ne forme pas de spores. Elles sont des anaérobies mais quelques espèces tolérant l'O_2 dans la présence ou non du CO_2. Ces dernières sont dépourvues de la catalase, le contenu en G +C est de 61% **(Mattarelli et Biavati, 2014)**.

Les bifodobactéries sont des bactéries commensales de l'homme, elles sont également retrouvées chez les animaux **(Biavati *et al*., 2000)**. Les conditions optimales de croissance des bifidobactéries d'origines humaine se situent à des températures comprises entre 37°C et 41°C, et des valeurs de pH entre 6,5 et 7 **(Hadadji, 2007)**. A l'heure actuelle les

bifidobactéries sont les fameuses bactéries utilisées autant que probiotiques, à travers divers produits comme par exemple : les laits fermentés, des fromages….etc.

1.5 Effet probiotiques et propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques

Les probiotiques ont été définis comme des organismes vivants qui, après ingestion en certaines qualités, exercent des effets bénéfiques pour la santé **(Crittenden *et al*., 2005)** ; allant au-delà des vertus nutritives inhérentes de base **(Schaafma, 1996)**. Ils doivent remplir les conditions suivantes : être non pathogène et non toxiques bien entendu, exercer un « effet bénéfique » sur l'hôte, contenir un nombre élevé de cellules viables, posséder une survie élevée dans le tractus gastro-intestinal, exercer un effet métabolique pendant le transit intestinal, rester viable pendant le stockage et l'utilisation, en fin avoir de bonnes propriétés gustatives **(Tamime *et al.*, 1995)**. Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques peuvent être associées à de nombreux éléments. Elles résultent de l'effet combiné de différents facteurs biologiques provenant de leurs activités métaboliques.

Selon **Ishibashi et Yamazaki (2001)**, les bactéries lactiques sont de plus en plus utilisées en alimentation humaine et animale pour leurs effets probiotiques. Parmi ces effets on peut citer :

Les bactéries lactiques exercent un effet inhibiteur sur le développement et la synthèse de toxines par autres microorganismes pathogènes ;

Les bactéries lactiques possèdent des propriétés antitumorales qui pourraient être due à l'inactivation ou l'inhibition des composés carcinogènes dans le tractus gastro-intestinal ; la réduction des activités enzymatiques des bactéries intestinales telle que la β-glucuronidase, l'azoréductase et la nitroréductase ;

La prévention et traitement des diarrhées dues aux infections gastro-intestinales.

Les probiotiques sont encore impliqué dans la réduction du cholestérol **(Saavedra, 2001)**.

En effet, les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes classé en deux catégories : composée a petite masse moléculaire (LMM= low molécular compound) tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, diacétyl, le dioxyde de carbone, et des composées a grand masse moléculaire (HMM : high masse molécular compound) tel que les bactériocines **(ammor *et al*., 2006)**.

1.5.1 Les acides organiques

Les acides organiques sont produits par les bactéries lactiques au cours de processus de fermentation alimentaires. Leur effets antimicrobiens sont bien connus à l'heure actuelle **(Tou *et al*., 2006)**. Ces acides, sous leur forme dissociée ou non dissocié, agissent au niveau de la membrane et en inhibant les systèmes membranaires de transport actif **(Annan Prah et Agyeman, 1997)**. L'activité antimicrobienne d'un acide organique dépend de sa nature (acide fort, acide faible). L'acide acétique, par exemple, est plus inhibiteur que l'acide lactique ; il inhibe les levures, les moisissures et les bactéries **(Blom et Mortvedt, 1991)**.

1.5.2 Le peroxyde d'hydrogène

Les bactéries lactiques sont dépourvues de catalases catalysant la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et en oxygène **(Condon, 1987)**. Le peroxyde d'oxygène peut s'accumuler et être inhibiteur de différents microorganismes par l'oxydation des lipides membranaires et la destruction des structures des protéines cellulaires **(Zalan *et al.*, 2005)**.

1.5.3 Le dioxyde de carbone

Les bactéries lactiques hétérofermentaire synthétisent du dioxyde de carbone (CO_2) Comme métabolite secondaire. Son accumulation dans le milieu extérieur crée une anaérobiose qui peut être toxique pour les microorganismes aérobies présents dans l'aliment. Toutefois, le dioxyde de carbones peut aussi, à faible concentration, stimuler la croissance de certaines bactéries **(Dobrogosz, 1990)**.

1.5.4 Le 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 Ziney *et al.*, 1998)**.

1.5.5 La reutérine

La reutérine (ou 3-hydroxypropionaldehyde) est une substance antimicrobienne qui est produite comme métabolite intermédiaire pendant la fermentation anaérobie du glycérol par certaines espèces de *Lactobacillus* ainsi que par d'autres genres bactériens non lactiques tels que *Bacillus, Klebsiella, Citrobacter, Enterobacter et Clostridium* **(El-Ziney *et al.*, 1998)**. Elle a un large spectre d'activité. Elle a une action contre les bactéries (Gram-positif ou Gram-négatif), les champignons et les protozoaires. Elle interfère avec la réplication de l'ADN. Elle a des applications aussi bien dans le domaine médical que dans le domaine alimentaire **(Vollenweider, 2000).**

1.5.6 Les bactériocines

Certains ferments sont capables de produire des bactériocines ; ces molécules sont particulièrement intéressantes pour l'élaboration de produits à partir de lait cru donc susceptibles de contenir des micro-organismes indésirables voire pathogènes **(Cintas *et al.*, 2001)**. Les consommateurs sont directement concernés par la présence d'additifs chimiques dans leurs aliments. En conséquence, ils sont attirés par des produits alimentaires frais et sans ajout d'agents de conservation chimiques. Les bactériocines produites par les bactéries lactiques, peuvent être considéré comme des conservateurs naturels ou biopréservateurs qui accomplissent ces exigences. La conservation bio fait référence à l'usage de microorganismes antagonistes ou leurs produits métaboliques inhibent ou détruisent des microorganismes indésirables dans les aliments, afin d'augmenter la sécurité alimentaire et prolonger la durée de vie de conservation **(Schillinger *et al.*, 1996)**.

1.6 Bactériocines des bactéries lactiques

1.6.1 Historique et définition

En 1925, Gratia appelait «colicines", des substances antimicrobiennes sécrétées par *E. coli* et actives contre *E. coli* V. En 1928, Rogers a rapporté pour la première fois une substance antimicrobienne produite par *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* autre que les acides organiques et le peroxyde d'hydrogène. Cette substance a été identifiée plus tard par **Hirsch (1951)**, qui a démontré sa nature protéique et l'a nommée "nisine". En 1953, Jacob et ces collaborateurs proposèrent le terme plus général de ‹‹ bactériocine ›› à ces substances.

Différentes définitions des bactériocines a été données au cour du temps La définition qui reste la plus largement acceptée est celle de **(Klaenhammer, 1988)** qui définit les bactériocines comme des protéines, ou complexes de protéines, avec une activité bactéricide contre des espèces proches de la souche productrice.

Les bactériocines sont des peptides extracellulaires, thermostables, synthétisés par voie ribosomique doués d'une activité bactéricide ou bactériostatique contre les espèces proches (spectre étroit) ou d'autre genres (spectre large) et à laquelle la cellule productrice dispose d'un mécanisme d'immunité spécifique **(Cotter *et al*., 2005)**.

1.6.2 Classification

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont réparties en quatre classes, comme proposé par **(Klaenhammer, 1993)**. Nous donnons en Tableau 4 la classification proposée par **(Papagianni ,2003)**.

1.6.2.1 Classe I : les lantibiotiques

Les lantibiotiques sont des peptides de taille inférieure à 5 kDa, stables à la chaleur et qui contiennent des acides aminés inhabituels soufrés formés post-traductionnellement, comme la lanthionine, la β-méthyl lanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine. Les lantibiotiques peuvent être divisés en deux type ; **sous classe Ia :** qui comprend des peptides cationiques hydrophobes allongés contenant jusqu'à 34 acides aminés ; **sous classe Ib** : qui comprend les peptides globulaires chargés négativement ou sans charge nette et contenant jusqu'à 19 acides aminés **(McAuliffe *et al*., 2001)**.

Tableau 4 : Classification des bactériocines **(Papagianni, 2003)**.

Classe	Caractéristiques
Classe I Lantibiotique	Peptides ribosomiquement synthétisés, post traductionnellement modifies contiennes des acides aminées inhabituels : lanthionines et β-méthyle lanthionine. Masse moléculaire : 2-5KDa Sous classe A: molécules allongées , flexibles. Sous classe B :molecules globulaires sans charge nette ou chargées negative.
Classe II Non lantibiotique	Peptide stable à la chaleur, formés exclusivement avec des acides aminés non modifies. Synthétisés sous forme d'un pré peptide inactive clivé a la partie N-terminale pour donnés la forme active. Masse moléculaire :<10KDa. Sous classe IIa : pediocine like peptide, peptide simple contient la séquence YGNGVN terminal nommé aussi (Listeria active peptide). Sous classe IIb : bactériocines a deux peptides. Sous classe IIc : autre bactériocines.
Classe III Bactériolysines	Protéines thermolabiles Masse moléculaire > 30KDa
Classe IV	Complexe bactériocines et parties lipidiques ou glucidiques

1.6.2.2 Classe II : non-lantibiotiques

Ce sont des peptides de taille inférieure à 10 kDa, stables à la chaleur, ne contenant pas d'acides aminés modifiés. Leur point isolélectrique varie entre 8 et 10. Cette dernière est subdivisée en trois sous-classes ; **sous-classe IIa** Ces bactériocines contiennent entre 27 et 48 acides aminés et ont toutes une partie N-terminale hydrophobe contenant la séquence consensus YGNGV ainsi qu'un pont disulfure et une partie C-terminale moins conservée, hydrophobe ou amphiphile qui détermine la spécificité d'action. Elles ont toutes une activité contre *Listeria monocytogenes*. Certaines bactériocines de cette sous-classe contiennent également un deuxième pont disulfure dans leur domaine C-terminale qui semble être important dans la stabilisation de la structure tertiaire. Il semble par ailleurs qu'il leur conférerait une meilleure activité antimicrobienne, une meilleure résistance à l'exposition à des hautes températures et un spectre d'action plus large **(Richard *et al*., 2006)**; **sous-classe IIb**: Elle comprend les bactériocines ayant besoin de deux peptides pour avoir une activité. Deux types de bactériocines de classe IIb peuvent être distingués : le type **E (*Enhancing*)** où la fonction d'un des deux peptides est d'augmenter l'activité de l'autre et le type **S**

(***Synergy***) où les deux peptides sont complémentaires ; **sous-classe IIc**: Toutes les autres bactériocines de classe II ne pouvant pas être classées dans les sous-classes a et b.

1.6.2.3 Classe III : les bactériolysines

Les bactériolysines sont des protéines de taille supérieure à 30 kDa et sensibles à la chaleur. Cette classe ne contient que quatre bactériocines **: l'helveticin J** produite par Lactobacillus helveticus **l'enterolysin A** produite par *Enterococcus faecium*, **la zoocin A** produite par *Spreptococcus zooepidemicus* et **la millericin B** produite par *Streptococcus milleri* **(Papagianni, 2003)**.

1.6.2.4 Classe IV

Une quatrième classe se compose des bactériocines qui forment de grands complexes avec d'autres macromolécules **(Kalenhammer, 1993**), requérant une partie glucidique ou lipidique (Papagianni, 2003). Cependant, actuellement aucune bactériocine n'a été purifiée ou décrite et il ya a bonne raison de croire que ce type de bactériocine est un objet façonné dû aux propriétés cationiques et hydrophobes des bactériocines qui ont comme conséquence complexant avec d'autres macromolécules dans l'extrait brut **(Cleveland et *al.,* 2001)**.

1.6.3 Production des bactériocines

Les bactériocines sont produites à la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire de croissance **(Dortu et Thonart., 2009)**. Différentes protéines sont impliquées dans la production des bactériocines et sa régulation. Les bactériocines sont produites sous forme d'un prépeptide non-biologiquement actif qui subira des modifications post-traductionnelles pour aboutir au peptide actif. Cette production est souvent régulée par un système de Quorum Sensing, un mécanisme permettant à certains gènes d'être exprimés en fonction de la densité de la population bactérienne, L'expression de gènes localisés soit sur le chromosome, comme c'est le cas de la mersacidine **(Altena *et al*., 2000)**, soit sur un plasmide, comme c'est le cas de la sakacine A **(Axelsson *et al*., 1995)**, ou sur un transposon, comme c'est le cas de la nisine **(Rauch *et al*., 1992).**

Les facteurs influençant la production de bactériocines sont principalement la souche productrice, la température, le pH, la composition du milieu et la technologie de fermentation employée **(Dortu, 2008)**.

1.6.4 Mécanismes d'action des bactériocines

Le siège d'activité des bactériocines est la membrane cellulaire, Cependant, les modes d'action des bactériocines sur la membrane sont variés.

Certains lantibiotiques, comme par exemple la nisine, montre un mode d'action double : d'une par elles s'attachent au lipide II. le principale transporteur des unités de peptidoglycane du cytoplasme a la paroi cellulaire, ce qui empêche la synthèse correcte de la paroi cellulaire causant la mort de la cellules: d'autre part elles utilisent le lipide II comme point d'ancrage pour initier le processus d'insertion dans la membrane et la formation de pore provoquant la mort rapide de la cellule. Les bactériocine a deux peptides comme par

exemple la lacticine 3147, peuvent avoir cette activité double partagée entre les deux peptide **(Wiedemann *et al*., 2001)**.

D'un autre côté, le mécanisme d'action supposé des bactériocines de classe IIa est l'interaction de la bactériocine avec la membrane ou un récepteur, la mannose perméase, pour ensuite former un pore dans la membrane de la cellule ce qui induit la perméabilisation de la membrane et la mort de la cellule **(Dalet *et al*., 2000)**. Le mécanisme de formation des pores n'est pas connu même si l'hypothèse la plus courante est l'assemblage de différentes molécules de la bactériocine **(Diep *et al*., 2007)**. Les pores formés par les bactériocines de classe IIa causent la perte d'ion potassium ainsi que d'acides aminés et d'autres molécules de faible poids moléculaire ce qui dissipe les deux composantes de la force proton motrice **(Bauer *et al*., 2005)**. Une exception au mode d'action membranaire est représentée par les bactériocines de la classe III (bactériolysine) tel que la lysostaphine, dont l'action bactéricide consiste à cliver la partie peptidique du peptidoglycane des cellules cibles **(Nilsen *et al*., 2003) (Figure 2)**.

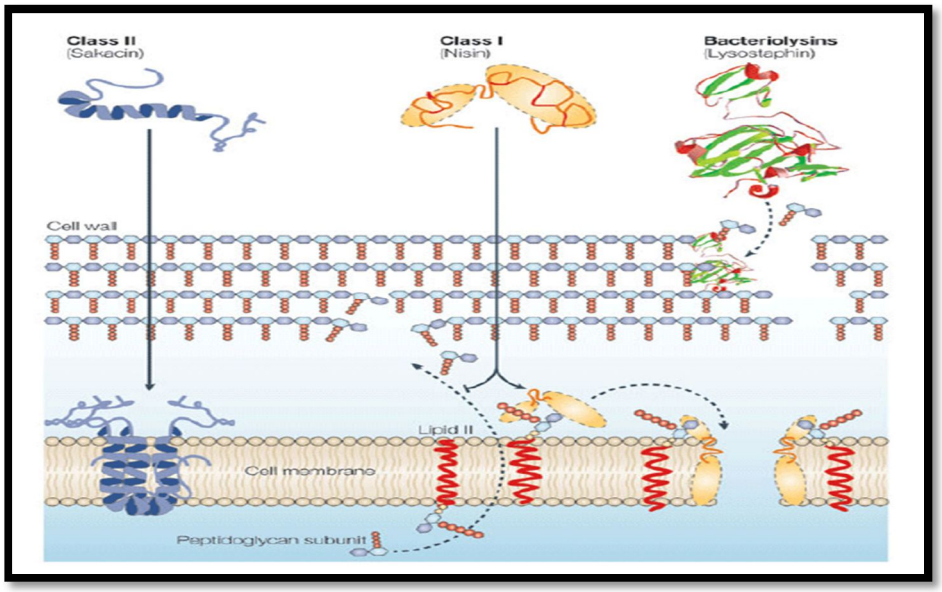


Figure 2 : Mécanismes d'action des bactériocines **(Nilsen *et al.*,2003).**

1.6.5 Spectre d'activité bactériocinique

Les bactériocines des bactéries lactiques exercent leur activité létale uniquement sur les bactéries Gram positif en provoquant ou non leur lyse cellulaire. Le spectre d'activité est généralement plus large que celui des colicines produites principalement par des souches d'*Escherichia coli* **(Tableau 5)**.

Le spectre d'activité des bactériocines de la sous classe IIa est variable. Il est plus ou moins large mais touche essentiellement des bactéries phylogénétiquement proches de la souche productrice. Dans tous les cas, le genre *Listeria* est inhibé. Il comprend également des bactéries lactiques et d'autre bactéries a Gram positif, en particulier des espèces pathogènes ou indésirables comme *Staphylococcus aureus*, *Clostriduim sp*, *Bacillus sp*, et *Micrococcus sp.* Les bactériocines des autre classes sont généralement connues pour posséder un spectre d'activité étroit, limité a la même espèce ou à des bactéries phylogénétiquement proches de la souche productrice **(Cascales *et al.*, 2007).**

Tableau 5 : Bactériocine produite par des bactéries probiotiques **(Gillor,2008)**.

Souche(s) inhibée (s)	**Souches productrice**	**Bactériocine**
Bactériocine de la classe I		
Listeria monocytogenes	*Lactobacilhus* UCC188	ABP-118
E.coli O157:H7	*Lactobacillus acidophilus Propionibacterium freudenreichii*	Bovamine^{TM}
Vibrio anguillarum	*L acidophilus*	Lacticine B
	Bacilhus subtilis	Bacillocine 22
	Clostridim butyricium	Butyricyne 7423
Streptococcus pygenes	*Streptococcus salivarium K12*	Salivaricine
Streptocccus sobrims Satreptococcus mutans		Salivaricine A &B
Micrococcus luteus Streptococcus anginosis Eubacteriuan saburreum		Sarivaricine B
Enterococcus spp; *Neisseria gonorrhoeae*	*S. salivarius* CRL1328	Salivaricine
E. coli O111, *Listeria monocytogenes*	*Lactobacilhus casei* L26	UN[a]
Aermonos salmonicida ruckeri	*Carnobacterium Maltaromaticum* B26 et B33	Carnocine
Helicobacter pylori	*Lactobacilhus johnsonii*	UN
H . pylori ; *Helicobacter felis*	*L . acidophilus*	UN
Bactériococines de la classe II		
Enterococcus ,*Listéria Monocytogenes* ; *klebsiella Pseudomonas* ; *Shigella*	*Pediococcus acidilactici*	Pediocine
Salamonella dusseldorf SA13 *E . coli*	*Enterococcus faecium* EK13	Entérocine
Salmonella pullorum	*E . faecium*	

1.6.6 Le Conditionnement des bactériocines

Il est très difficile de conditionner les bactériocines sous une forme purifiée. La purification des bactériocines est une procédure longue et coûteuse qui nécessite la mise en œuvre de nombreuses techniques à savoir une précipitation des protéines au sulfate d'ammonium, différentes combinaisons de chromatographies sur colonne telles que des échanges d'ions ou des interactions hydrophobes et une étape finale de chromatographie liquide à haute performance en phase inverse. Ces traitements ne sont pas applicables à l'échelle industrielle.

La stratégie souvent mise en œuvre consiste dès lors en l'adsorption de la bactériocine sur la cellule productrice suivie d'une centrifugation ou d'une ultrafiltration de la culture et de la désorption de la bactériocine par abaissement du pH à 2 et augmentation de la concentration en chlorure de sodium. Les bactériocines semi-purifiées peuvent alors être conditionnées sous forme sèche par atomisation ou lyophilisation par exemple **(Parente *et al.*, 1997)**. La nisine, la seule bactériocine légalement approuvée comme additif alimentaire, est commercialisée sous une forme semi-purifiée.

1.6.7 Domaines d'applications des bactériocines

Les bactériocines peuvent être appliquées sous un forme purifiée, semi-purifiée., Les bactéries productrices peuvent également être appliquées dans les produits alimentaires, la bactériocine sera alors produite in situ. **(Figure 3).**

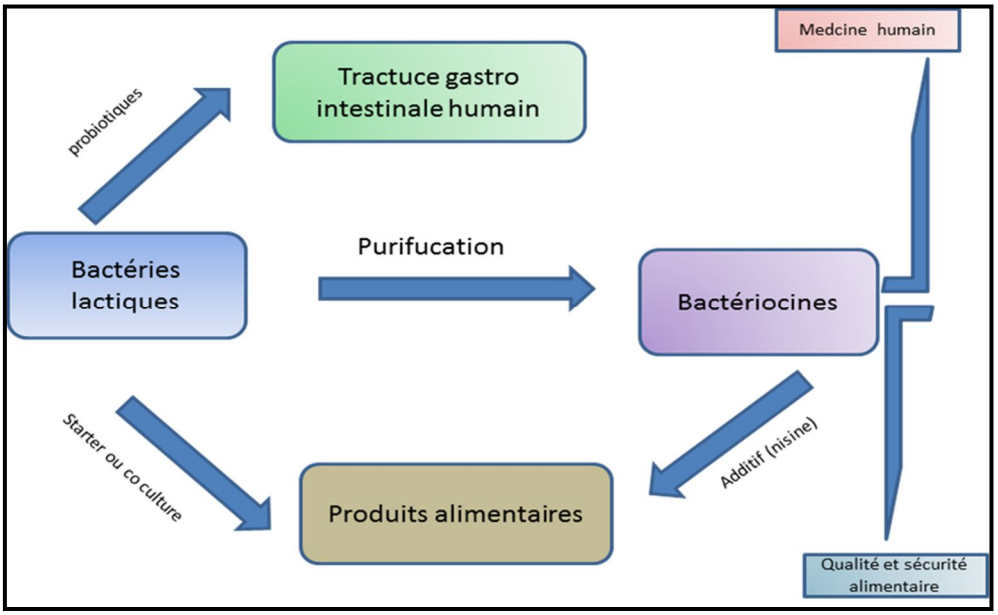


Figure 3 : Vue d'ensemble des applications potentielles des bactériocines **(DeVuyst et Leroy, 2007)**.

1.6.7.1 Domaine alimentaire

L'utilisation des bactériocines dans le domaine alimentaire est avantageuse non seulement à cause de leur large spectre d'activité, mais aussi parce qu'elles sont non toxiques, facilement dégradables par les enzymes digestives et ne compromettent pas la prise des médicaments (Ryan et *al*., 1998). Du fait qu'elles sont des substances naturelles, l'emploi des bactériocines permettrait d'avoir des produits plus sains et réduirait l'utilisation des agents chimiques de conservation **(Harlander, 1993)**. Ces dernières années, l'application des bactériocines dans la technologie a gagné une grande attention.

Malgré le fait que la majorité des bactériocines soit des substances naturelles non toxiques, seule la nisine est reconnue jusqu'à maintenant comme « GRAS » (Generally Recognized As Safe) **(Delves-Broughton, 1990)**. Ainsi, la nisine est utilisée comme additif dans les aliments en conserves, notamment dans les produits laitiers, les soupes et les poudings à base de céréales **(Smaoui, 2010)**.

1.6.7.2 Domaines de la médecine humaine

L'utilisation des bactériocines n'est pas restreinte au domaine alimentaire, plusieurs études ont démontré que l'utilisation répandue des antibiotiques pour traiter et prévenir les infections, engendrait de sérieux problèmes de toxicité et de résistance. Par leurs caractéristiques mentionnées précédemment, les bactériocines ont été énormément appréciées comme étant des agents de thérapie naturelle, alternative aux antibiotiques, puisque l'effet inhibiteur des bactériocines pourrait réduire les effets nocifs engendrés par l'antibiothérapie.

Quelques lantibiotiques sont utilisables dans les applications médicales pour l'espèce humaine et animale. L'épidermine produite par *Staphylococcus epidermidis* est active contre *Propionibacterium acnes*, qui cause l'acné. Ce lantibiotique est utilisé dans la thérapie pour remplacer l'usage habituel de l'érythromycine et de la vitamine A. Cette application montre plusieurs avantages tels que l'absence de résistance aux lantibiotiques et leur faible coût de production par rapport aux antibiotiques. La nisine, quant à elle, peut être utilisée dans le traitement des ulcères gastriques vu sa stabilité aux pHs acides et son activité contre *Helicobacter pylori* **(De Vuyst et Vandamme, 1994)**. Trois autres bactériocines produites par *Lactobacillus johnsonii* LA1, *Lactobacillus casei* YIT 9029 et *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 montrent une activité inhibitrice contre l'agent pathogène gastrique humain *Helicobacter pylori* qui cause des ulcères gastriques **(Avonts et De Vuyst, 2001)**.

1.6.7.3 Domaine agricole

La protection des plantes contre les microorganismes phytopathogènes ainsi que la préservation des semences, sont les objets de l'exploitation des bactériocines en agriculture. Dans ce cas, les substances antibactériennes et substances antifongiques seront associées afin de lutter contre les ravageurs phytopathogènes **(Paik *et al.*, 1997)**.

1.7 Identification des bactéries par la biologie moléculaire

L'identification des bactéries, isolées à partir de prélèvement biologiques, pendant des années, a été basée uniquement sur des critères morphologiques et biochimiques. Le développement des techniques de biologie moléculaire à partir des années 1990 a permis d'introduire ces approches au sein des laboratoires d'analyse biologique. Leur intérêt dans identification des bactéries s'est accru au fil des années. Elles permettent d'obtenir un résultat en quelques heures dans les situations d'urgence (identification et typage du germe, et détection des résistances antibiotiques) ou d'identifier un microorganisme si les systèmes utilisées en routine (approche biochimique) sont pris en défaut. De plus, dans des prélèvements biologiques, elles rendent possible la caractérisation des bactéries si la culture est restée négative, si les bactéries intracellulaires strictes (pour lesquelles la culture est réservée à des laboratoires spécialisés) ou des bactéries encore incultivables à ce jour.

Le gène ciblé est en fonction des informations disponibles sur l'isolat bactérien. Le gène codant l'acide ribonucléique ribosomique (ARNr) 16S est l'outil de choix si les tests précédemment réalisés n'ont pas permis de définir le genre ou l'espèce auxquels appartient l'isolats bactérien. Un système d'identification mettant en jeu un gène plus variable est préférable si des critères d'orientation sont disponibles.

La plupart des techniques mises en œuvre sont basées sur l'utilisation de l'amplification génique (polymerase chain reaction « PCR ») couplée à une réaction de séquençage du fragment obtenu par la technique de Sanger ou de la PCR en temps réel. Pour cette dernière méthode, la spécificité et la sensibilité sont meilleures, la durée de réalisation de l'analyse est plus courte et c'est le germe recherché ou le groupe de bactéries à caractériser qui commandent le système utilisé.

Dans les années à venir, le développement des techniques de séquençage des génomes entiers va ouvrir des possibilités considérables en ce qui concerne l'identification des bactéries, leur épidémiologie, l'étude de leur sensibilité aux molécules antibiotiques et la caractérisation de leurs facteurs de virulence **(Roux et Rolain, 2014)**.

1.7.1 Méthodes basées sur la PCR (réaction en polymérisation en chaine)

L'identification au rang de l'espèce des bactéries lactiques préalablement isolées de mouts et vins par culture sur plaque. De là, la méthode PCR peut être adaptée à plusieurs niveaux d'identification (genre, espèce ou souche) en fonction du choix des amorces (courte séquence oligonucléotidique). Le principe est le suivant : l'amorce recherche la région complémentaire pour s'apparier sur la matrice d'ADN qui est analysé. C'est à partir de l'extrémité de l'amorce que la polymérisation s'opère recopiant le brin d'ADN matrice un très grand nombre de fois ce qui conduit à l'amplification **(Castellucci, 2012)**.

1.7.2 Amplification de régions consensus et séquençage : sous-unité de l'ARN ribosomique 16S

1.7.2.1 Principe

Le séquençage de l'amplification du gène codant pour l'ARNr 16S constitue la méthode de base. Cette approche s'appuie sur la présence obligatoire de l'ARNr dans les bactéries. La séquence nucléotidique de ce gène permet la classification phylogénétique et l'identification d'isolats inconnus. Car la base de données existante pour ce gène est la plus étendue des gènes bactériens. La séquence nucléotidique de la région entre les gènes codant pour les ARNr 16S et 23S, appelée ITS, peut être utilisée pour l'identification, mais sa séquence est moins conservée. Dans ce cas, la PCR utilise des amorces correspondantes aux régions conservées universelles dans les gènes codant l'ARNr 16S et 23S, de part et d'autre de l'ITS **(Castellucci, 2012)**.

1.7.2.2 Protocole générale

Cette méthode nécessite l'extraction de l'ADN de la culture pure à identifier. L'ADN extrait sert de matrice dans la réaction PCR. Après séparation par électrophorèse, les amplifiants sont purifiés avec les kits appropriés, puis ils sont séquencés. Les séquences obtenues des gènes codant l'ARNr 16S sont comparées à celles figurant dans les bases de données disponibles **(Chentouf, 2014)**.

2 Matériels et méthodes

2.1 Prélèvement du lait maternel

24 échantillons de lait maternel (immature ou Mature) ont été prélevés durant des périodes d'allaitement allant de 1jour à 1 mois après l'accouchement. Les prélèvements sont réalisés dans des conditions aseptiques après lavage du sein à l'eau puis au savon, puis à 70% à l'alcool. Les premières gouttes sont jetées, pour éviter toute contamination **(Martin *et al*., 2005)**. Les échantillons de lait maternel ont été placés dans des flacons stériles, transportés dans des glacières réfrigérées, puis conservés à 4°C jusqu'à leur utilisation.

2.2 Isolement et purification des isolats

L'isolement des bactéries lactiques est réalisé sur les milieux MRS (Man-Rogosa-Sharp) et M17. Le milieu MRS à pH=6.8 a été utilisé pour la croissance de la microflore lactique totale, les lactobacilles sont énumérés sur milieu MRS acidifié à pH=5.4 additionné de 0.05% de cystéine (composition des milieux en **annexe 1**). 1ml de l'échantillon de lait maternel est pipeté aseptiquement dans 9ml d'eau physiologique et des dilutions décimales sont réalisées (10^{-1} à 10^{-7}). Les dilutions ainsi préparées, 0.1 ml de la dilution appropriée est étalé sur le milieu (MRS, M17) et incubés à 37°C en condition d'anaérobiose (pendant 48-72 heures).

2.3 Purification des isolats de bactéries lactiques

La purification consiste à réaliser des repiquages successifs sur gélose et bouillon MRS ou sur M17. Les bactéries à $Gram^{+}$, $catalase^{-}$ et non sporulées sont retenues et repiquées sur bouillon (MRS, M17). jusqu'à l'obtention d'une culture pure dont la pureté est estimée par observation microscopique après coloration de Gram **(Balows *et al*., 1992; Curk *et al*., 1996 et Heleni *et al*., 2006)**.

2.4 Conservation des isolats

Il existe deux types de conservation

- Conservation à court terme

Les souches sont ensemencées sur gélose MRS incliné en tube. Après incubation à 37°C pendant 18 heures, ces culture sont gardées à + 4°C. Les repiquages des cultures se fait tous les trois semaines **(Saidi *et al*., 2002)**.

- Conservation à long terme

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, on ajoute le milieu de culture de conservation 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

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

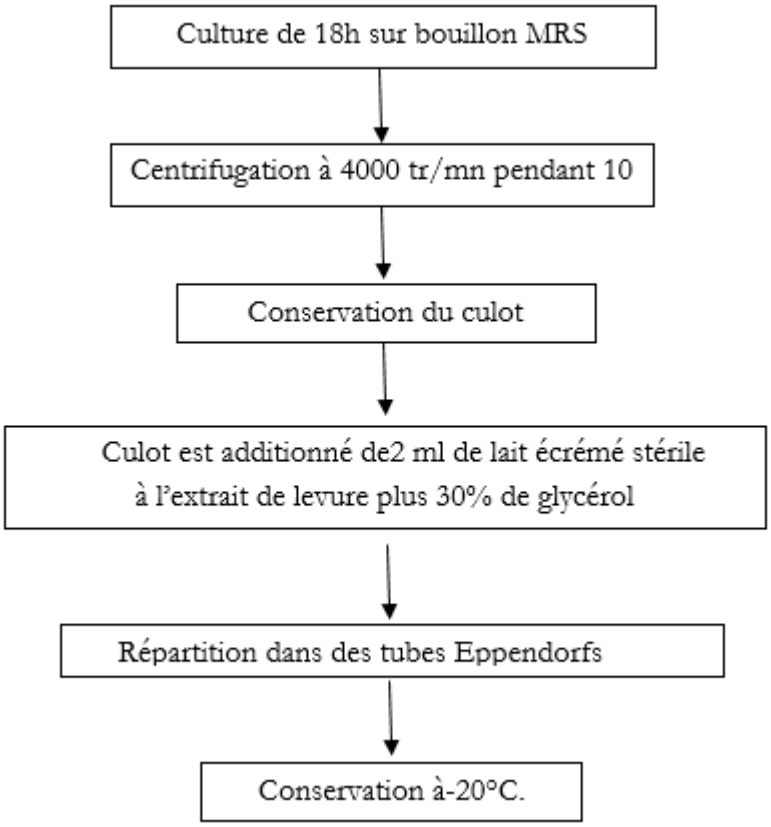


Figure 4: Conservation de longue durée des bactéries lactiques purifiées (Saidi *et al*., 2002).

2.5 Caractérisation morphologique

2.5.1 Examen macroscopique des colonies

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

2.5.2 Examen microscopique

2.5.2.1 Observation à l'état frais

Une préparation à l'état frais permet d'examiner la mobilité. Déposer une goutte d'eau stérile sur la lame. Prélever une fraction de colonies sur gélose, faire une suspension

homogène dans la goutte d'eau, ensuite, recouvrir d'une lamelle en évitant la formation des bulles d'air. Ensuite, les cellules sont examinées au microscope optique (G x40 et x100).

2.5.2.2 Coloration de Gram

Ce test a été réalisé sur des cultures jeunes de moins de 24 heures. Un frottis de cellules a été réalisé sur une lame. Une coloration de Gram a été effectuée. Ensuite, le frottis a été 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 (-)

2.5.3 Tests biochimiques et physiologiques

2.5.3.1 Test de la catalase

Cette activité a été réalisée selon le protocole expérimental décrit par **Prescott *et al*., (2003)**. La recherche de l'enzyme catalase est le deuxième test de pré-identification.

Elle a été mise en évidence par contact de la colonie avec une solution fraiche d'eau oxygéné à 10 volumes, un dégagement gazeux abondant (du dioxygéne) sous forme de mousse traduit la présence de la catalase.

2.5.3.2 Croissance à différente température

La croissance à différent température a permis une différenciation entre les thermophiles ou les mésophiles. Des cultures jeunes ont été ensemencés dans le bouillon MRS en les incubant 48h à différents températures : 15°C, 30°C, 37°C, et 45°C **(Schillinger *et Luck*., 1987)**.

2.5.3.3 Croissance à différent pH

Ce test a permis de différencier entre les souches qui croissent dans un milieu acide ou neutre. On a préparé un bouillon MRS avec différent pH : 3, 3.5, 4.5, 5.4 et 6.5 comme témoin. On a introduit une préculture des souches dans les bouillons préparés puis on a incubé à 37°C pendant 72 heures **(Carr *et al*., 2002)**.

2.5.3.4 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 ont été ensemencées 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 a été apprécié par comparaison avec un tube témoin non ensemencé, incubé dans les mêmes conditions **(Carr *et al*., 2002)**.

2.5.3.5 Recherche de type fermentaire

La mise en évidence de la production du CO_2 à partir du glucose sur milieu MRS contenant la cloche de Durham. Le milieu est réparti dans des tubes à essais a 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 homofermentaires **(Gibson et abd el Malek., 1945)**.

2.5.3.6 Test d'hémolyse

Le caractère hémolytique a été recherché par ensemencement en stries de la gélose au sang de cheval. Après incubation pendant une période de 24h à30°C, le type d'hémolyse a été examiné (α hémolytiques : couleur verte autour des colonies ; βhémolytique : éclaircissement autour des colonies ou γ hémolytique : le milieu n'est pas modifié). **(Maragkoudakis *et al*., 2006).**

2.5.4 Identification de l'espèce par galerie API 50 CH

L'utilisation des galeries biochimiques API 50 CH (biomérieux, France) permet d'établir le profile fermentaire des bactéries lactiques. Elle permet l'étude rapide de la fermentation de 49 sucres. Le catabolisme des glucides conduit à des acides organiques qui provoquent le virage d'un indicateur de pH. Les résultats obtenus constituent le profil fermentaire de la souche. Les bactéries lactiques sont repiquées sur milieu MRS. Les cultures sont centrifugées (6000tr/5min). Le culot est remis en suspension dans 4 ml d'eau distillée stérile, puis on refait une deuxième centrifugation a une vitesse de 3000 tours pendant 3min. ensuite, on ajoute au culot 4ml de MRS BCP (milieu de culture sans sucre avec un indicateur de pH ; le poupre de bromocrésol) de manière que la capacité du mélange corresponde à l'étalon n°2 dans l'échelle de Mac Farland. Cette suspension est réparti dans les 50 microtubes de la galerie qui sont recouvertes ensuite d'huile de vaseline stérile afin d'obtenir les conditions d'anaérobiose. Les galeries sont incubées à 37°C et des lectures sont faites à 24h et 48h **(Saidi., 1997)**.

2.6 Etude des interactions bactériennes

La recherche d'éventuelle production de substance inhibitrice par les bactéries isolées est réalisée selon deux méthodes :

2.6.1 Méthode Directe (Spot agar test)

L'activité antimicrobienne de nos souches a été évaluée sur milieu solide selon la méthode **(Fleming *et al*., 1975)**. Le milieu MRS est ensemencé en touche par nos isolats (souches inhibitrices). Après 24heures d'incubation une couche du milieu Mueller-Hinton (0.7%) est ensemencée par la souche indicatrice (*Staphylococcus aureus* UT 602, *S.aureus* CECT 86T, *S.aureus* ATCC 25923, *S.aureus* ATCC 43300 et *E. coli* ATCC 25922) est coulée à la surface puis ré incubée pour 24 à 48 heures supplémentaire. Les souches présentant une zone claire tout autour sont considérées comme productrices de substances antimicrobiennes.

2.6.2 Méthode indirecte (well diffusion assays)

Décrite par **(Barefoot *et al*., 1983)**, cette méthode permet de mettre en contact le surnageant de la souche lactique productrice de substance antimicrobienne avec la souche

test. Les souches précédemment sélectionnées pour leur production de substance antimicrobienne sont concernées par ce test. Les souches sont cultivées dans du milieu MRS liquide et incubées pendant 18heures. Après incubation, le milieu est centrifugé (8000tr/10min) et le surnagent est conservé. Dans une boite de pétri contenant du MRS solide et ensemencé par la souche indicatrice, des puits sont réalisées avec un emporte-pièce et celés par 10µl de gélose MRS. Les recevront 100µl du surnageant de la souche à tester et les boites sont incubée pendant 24à 48heures. Les colonies entourées d'une zone claire dans la nappe de culture de la souche test et ayant un diamètre supérieur à 2mm sont considérées comme positive.

2.6.3 Localisation de la substance inhibitrice

A partir des cultures des souches testées en milieu MRS liquide, incubées 24heures à 30°C, un volume de 50 ml de culture est centrifugé dix minutes à 10 000 tours/ min. Les tests d'inhibition sont réalisés comme précédent à la fois sur le surnageant, représentant la fraction extracellulaire, et sur le culot, correspondant à la fraction cellulaire.

2.6.4 Mise en évidence de la nature de l'agent inhibiteur

Les inhibitions de la croissance de la souche indicatrice peuvent être dues à l'acidification du milieu" production des acides orgabique" **(Liu, 2003)**, à la production de peroxyde d'hydrogène **(Strus *et al*., 2006)**, ou à la synthèse de bactériocines **(Klaenhammer, 1988)**.

2.6.4.1 Inhibition due au peroxyde d'hydrogène

Pour écarter l'effet du peroxyde d'hydrogène dans l'inhibition des souches indicatrices pathogènes, les surnageant des cultures des bactéries lactiques sont traités par 1mg/ml de catalase puis incubées à 37°C pendant 1h. Le surnageant est stérilisé par filtration et testé par la méthode des puits sur les souches pathogènes **(Cogan *et al.*, 1981 et Julliard *et al.*, 1987)**.

2.6.4.2 Inhibition due à la production d'acides organiques

Pour éliminer l'effet des acides organiques, notamment des acides lactique et acétique, le surnageant a été neutralisé à pH 6,5 par une solution de NaOH 0,1N et seule la substance antimicrobienne si elle produite exprime son action sur les souches pathogènes **(Fleming *et al*., 1975)**.

2.6.4.3 Recherche de substances inhibitrices de nature protéique

Les bactériocines étant connues pour être des protéines résistant à des températures élevées, la thermostabilité des substances inhibitrices a été testée par chauffage à 100°C pendant 0,15, 20 et 30 min des surnageant des souches testées. Comme précédemment, on utilise la méthode de diffusion en puits, le surnageant a été neutralisé à pH 6,5 par une solution de NaOH 0,1N pour éliminer l'effet des acides organiques. Afin d'éliminer le peroxyde d'hydrogène accumulé dans le milieu de culture, le surnageant a aussi été traité deux heures par une catalase à 30°C avant de procéder au test d'inhibition. **(Labioui *et al*., 2005)**.

2.6.5 Optimisation de la production de bactériocine

2.6.5.1 Effet de la température d'incubation

Dans le but d'explorer l'effet de la température sur la production de bactériocine, des tubes à essai contenant le milieu de culture liquide de MRS sont ensemencés avec la souche test antagoniste *L.brevis* (LbC3), incubés à différentes températures 25°C, 30°C, 35°C, 40°C et 45°C. La production de bactériocines est évaluée par mesure de la zone inhibitrice.

2.6.5.2 Effet du pH

Dans le but de tester effet de la valeur du pH sur la production du bactériocine, des tubes à essai contenant le milieu de culture liquide de MRS à différentes valeur de potentiel d'hydrogène (pH) (4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7 et 7.5) sont inoculés avec la souche productrice de bactériocine *L. brevis* (LbC3).

2.7 Mode d'action des bactériocines

Dans le but d'explorer l'effet de la production des bactériocines sur la croissance du germe témoin de l'activité antagoniste *E.coli* ATCC 25922, deux cultures de la souche témoin de l'activité antagoniste sont inoculées sur bouillon nutritif, incubées à une température de 30°C.

Le volume de 1ml du surnageant des souches de bactéries lactiques sélectionnées antagonistes est ajouté aux cultures des germes témoins de l'activité antagoniste *E.coli* ATCC 25922, inoculée dans un milieu de culture, au début de la phase exponentielle. Des prélèvements stériles à des intervalles de temps réguliers sont effectués afin d'évaluer la croissance bactérienne.

2.8 Caractérisation technologiques

2.8.1 Pouvoir acidifiant

A partir des cultures des souches testées en milieu MRS ou M17 liquide, incubées 24heures à 30°C, Un volume de 10 ml de lait écrémé stérile a été mis dans un tube à essai. Le tube a été inoculé par 100 µl d'une culture de l'isolat en phase exponentielle sur milieu MRS ou M17 selon le milieu d'origine de l'isolat et incubées à 37°C. Un intervalle de 3, 6, 15, 24h heurs, des échantillons ont été prélevés de façon aseptique pour déterminer le pH.

- Capacité a coagulé le lait

Ce test permis de repérer les isolats qui ont été capables de coaguler le lait à 30°C après une incubation en aérobiose de 24 et 48h **(Bendimerad, 2013)**.

2.8.2 Pouvoir proteolytique

Pour déterminer l'activité protéolytique des bactéries lactiques, le milieu a été utilisé : la gélose PCA additionnée du lait écrémé à 10%. Chaque boite par la suite a été ensemencée par la méthode de multipoint. Après une incubation à 30°C pendant 24h, la protéolyse est révélée par des zones claires autour des colonies **(Veuillemard, 1986)**.

2.8.3 Pouvoir lipolytique

L'activité lipolytique est recherchée sur milieu MRS tamponné à pH 7 et additionné de 1% de Tween 80 (source lipidiques artificielles) ou de beurre ou d'huile d'olive (source lipidiques naturelles). Les boites ont été ensemencées à l'aide d'un inoculateur multipoint. Après une incubation à 30°C pendant 24 à 48h, la lipolyse est révélée par une zone d'éclaircissement entourée des souches ensemencées **(Guiraud et Galzy, 1980; Karam, 2012)**.

2.8.4 Etude de l'antibiorésistance

Des pré-cultures ont été préparées dans du bouillon MRS et incubées à 37°C pendant 18heures. Un volume de 200 µl des pré-cultures (10^8 ufc/ml) est inoculé dans 8 ml de milieu de culture de gélose molle à une concentration de (0.7%). Ensuite, le mélange est homogénéisé à l'aide d'un Vortex coulé sur une couche de milieu MRS solide. Après séchage la gélose. Des disques d'antibiotiques **(Annexe 2)** sont déposés stérilement, à la surface du milieu (5 antibiotique par boite). Afin d'éviter le chevauchement des zones d'inhibition on a respecté une distance de 15mm entre le bord de la boite et les disques périphériques puis une distance de 25mm entre deux disques. Après incubation à 37°C pendant 24h, le diamètre des zones d'inhibition observées autour des disques était mesuré. Les résultats ont été exprimés comme sensible (S), intermediaires (I) et résistantes (R) selon les applications des recommandations du comité de l'antibiogramme (2012) **(Benabou, 2012; Karam et Karam, 1994**).

2.8.5 Cinétique de la croissance (Production de biomasse)

L'étude de la cinétique de la croissance bactérienne permet d'optimiser les conditions de production de métabolites. La croissance bactérienne a été mesurée par spectrophotométrie (λ = 600 nm). La variation de la cinétique bactérienne a été mesurée après chaque trois heur et après 24 h d'incubation à 37 °C.

2.9 Identification génotypique

Les étapes principales de l'identification moléculaire a été réalisées sur les différents isolats sélectionnés antagoniste sont :

a) Extraction de l'ADN génomique à partir des isolats bactériens.
b) Amplification d'ADN par PCR
c) Électrophorèse sur gel d'agarose
d) Séquençage d'ADN

2.9.1 Extraction de l'ADN

L'ADN total bactérien de nos isolats sélectionnés antagoniste (LbL3, LbL4, LbC11, LbL15) extrait selon la méthode d'extraction de **Gevers *et al*, (2001)** et qui consiste aux étapes suivantes :

- Les cellules à partir d'une colonie sont resuspendue dans 1ml d'eau distillée stérile ensuite centrifuger à 3000 tours pendant 10 minutes, le culot est stocker à -20°C pendant 1h.
- Le culot est ensuite lavé dans 1ml de tampon TES et resuspendu dans 300 µl de tampon STET.
- 75µl de tampon de lyse sont ajoutés à la suspension et incubés à 37°C pendant 1h.
- Après préchauffage de 37°C, ajouter 40µl de SDS 20% dans du tampon TE (10mM Tris-HCL, 1mMEDTA, pH8.0)
- Agiter aux vortex pendant 60 secondes et incuber à 37°C pendant 10min
- Continuer l'incubation à 65°C pendant 10min encore.
- Ajouter 100 µl du tampon TE et le lysat est extrait avec 1 volume de Phénol/chloroforme/ isoamylalcohol.
- Les phases sont séparées par centrifugation à 3000 tour pendant 20min. la phase aqueuse est mixée avec 70µl de NaCL 5M et 1 ml d'isopropanol, l'ADN est précipité dans la glace pendant 15min.
- L'extrait d'ADN est collecté par centrifugation 3000 tours/pendant 20min et le culot est lavé dans de l'éthanol froid à 70%.
- Centrifugation pendant 10 min afin de collecter l'ADN purifié en culot
- Le culot d'ADN pure est dissout finalement dans l'eau distillée stérile pour des fin analytique ou bien est conservé à -20°C jusqu'à son utilisation.

2.9.2 Amplification de L'ADN par PCR

L'amplification des fragments d'ADN par la technique de la PCR est réalisée dans un cycler de Biorad (Biorad, USA), par l'utilisation des amorces universelles qui permette d'amplifier le fragment d'ADN codant la région 16SrDNA

fD: 5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

rD1: 5′AAGGAGGTGATCCAGCC-3′

Cette technique consiste à introduire un volume de 4µl de l'ADN génomique, obtenu par extraction dans un Eppendorf, ensuite un volume de 25µl de mixture réactionnelle est ajouté.

Pour diminuer les risques d'erreurs et de contamination nous avons préparé une solution mixte contenant tous les composants de la PCR **(Tableau 6)**.

Tableau 6 : Volumes des composants de la solution mixte utilisée pour l'amplification d'ADNr 16s.

Composant de la solution mixte	Concentration finale pour volume finale de 25µl pour un seul échantillon
Solution Tampon	2.5µl
DNTP	2 µl
Amorce	0.5 µl
Amorce	0.5 µl
Taq polymérase	0.25µl
Eau distillé stérile	14.25 µl

Après avoir placé les tubes contenant l'ADN bactérien dans le thermocycleur, un pré dénaturation à 94°C pendant 15 minutes est entamé.

Ensuite, le programme d'amplification est exécuté selon trois étapes répétées en 35 cycles définis :

- Dénaturation à 94°C pendant 3min.
- Hybridation des amorces à 53°C pendant 1min.
- Elongation (polymérisation) à 72°C pendant 2min.

Enfin, une étape d'extension finale est réalisée à 72°C pour 5minutes. La tailles de l'amplifia obtenu était de 1500pb pour tous les échantillons amplifiés comparativement aux marqueurs de tailles utilisés.

2.9.3 Électrophorèse sur gel d'agarose

Afin de visualiser les amplicons Une Electrophorèse, sur gel d'agarose à 1.2% des produits de PCR a été réalisée.

2.9.3.1 Préparation du gel

- Mettre 1.2 g d'agarose déshydraté dans un Erlenmeyer de capacité suffisante
- Ajouter l'agarose à 100ml de TBE
- Mettre le mélange Agarose + TBE en régénération aux micro-ondes pendant 4min.
- Lorsque l'agarose est complètement dissout Laisser refroidir jusqu'à ce qu'il devienne possible de saisir le flacon à main nue (température environ 45-50°C).
- Ajouter 10µl de Bromure d'Edithium (BET) dans le mélange Agarose-TBE.
- Agiter (sans chauffer) doucement pour éviter la formation de bulles d'air.
- Préparer le moule pour le coulage du gel.
- Placer le moule sur une surface bien horizontale.
- Couler lentement le gel sur 3 à 5mm d'épaisseur et laisser gélifier dans la cuve, le peigne mis au préalable pour créer des espaces pour les puits.

- Laisser refroidir 30 min environ avant d'enlever délicatement le peigne
- Les puits sont placés du côté de la cathode à l'intérieure de la cuve de l'appareil à électrophorèse.
- Le gel est enfin prêt pour le dépôt des échantillons.

2.9.4 Dépôt des échantillons (produits d'amplification)

- Mélanger (7µl d'ADN amplifié + 5 µl de la solution de charge "bleu de bromophénol").
- Remplir les puits avec ce mélange en faisant attention à ne pas déchirer le fond du gel avec la pointe de la pipette.

2.9.5 Migration

- Fermer la cuve, branchée les fils et exercez un voltage de 90v jusqu'à 101v pendant 40min pour permettre la sortie de l'ADN des puits.
- Laisser migrer jusqu'à ce que le colorant de charge arrive à proximité du bord du gel.
- Quand le témoin de migration (colorant bleu) atteint l'extrémité du gel, le courant est coupé.

2.9.6 Visualisation

La visualisation de l'ADN sur le gel d'agarose est réalisée grâce à un colorant fluorescent le bromure d'Ethidium (BET). Ce composé possède la propriété de s'intercaler entre les paires de bases des acides nucléiques. Le gel est visualisé dans l'obscurité à l'aide d'un appareil à UV puis photographié avec un appareil numérique **(Kouadri, 2014)**.

2.9.7 Séquençage d'ADN

Le séquençage des produits de la PCR de l'ADN ribosomale 16s obtenus est purifié et séquencés par l'utilisation des amorces universelles (fD1 et rD1) selon la technique décrite par Sanger. Les séquences obtenues sont comparées avec celles de la banque de données GeneBank par l'utilisation du Programme blast (**https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi** Balast) deNCBI.

3 Résultats et discussions

3.1 Échantillonnage

Les échantillons de lait maternel ont été volontairement donnés par les mères à différents endroits en Algérie (Sidi Bel Abbes, Oran, Tlemcen) **(Tableau 7)**.

Les mères ont été informées du caractère expérimental de l'étude et ont donné leur consentement **(annexe 3)**.

Dans notre étude 65% des échantillons de lait maternel était de type colostrum, 8% de type lait de transition et 27% de lait mature **(Figure 5)**.

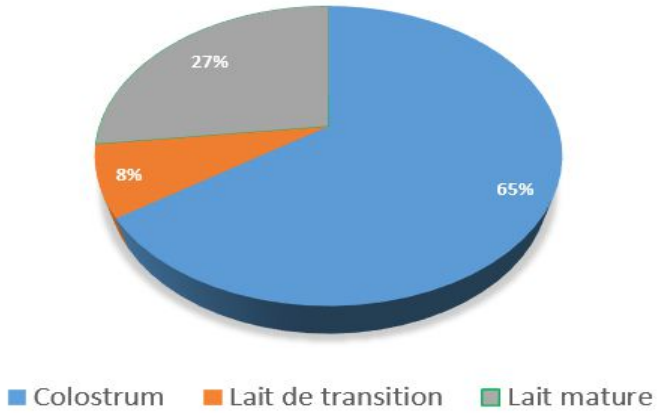


Figure 5 : Les Types de lait maternel.

Les femmes ayant participée à cette étude ont eu un accouchement par voie basse (normale) (71%), les autres ont accouché par césarienne (29%) **(Figure 6).**

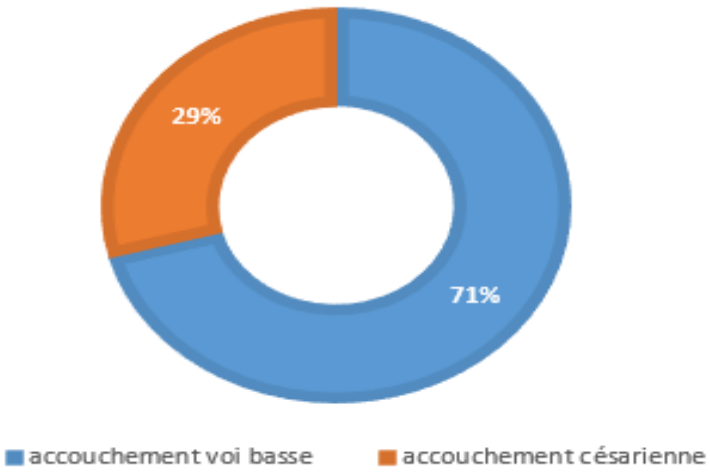


Figure 6 : Illustration des modes d'accouchement des femmes allaitantes.

Tableau 7 : Origine des prélèvements du lait maternel.

	Région	Jour	Nombre	Type
E1	Oran	1	1	normale
E2		1	1	normale
E3		2	1	normale
E4		2	1	normale
E5		2	1	normale
E6		2	1	normale
E7		15	1	normale
E8		20	2	césarien
E9	SBA	7	1	normale
E10		3	1	normale
E11		2	1	normale
E12		3	1	normale
E13		8	1	césarien
E14		1	1	césarien
E15		7	1	césarien
E16		15	2	césarien
E17		20	2	césarien
E18		30	2	césarien
E19	Tlemcen	1	1	normale
E20		7	1	normale
E21		15	2	normale
E22		20	2	normale
E23		30	1	normale
E24		12	1	normale

La Figure 7 illustre la répartition des femmes allaitante par groupe d'âge de 19 ans à 39 ans. La moyenne d'âge était de 29 ans.

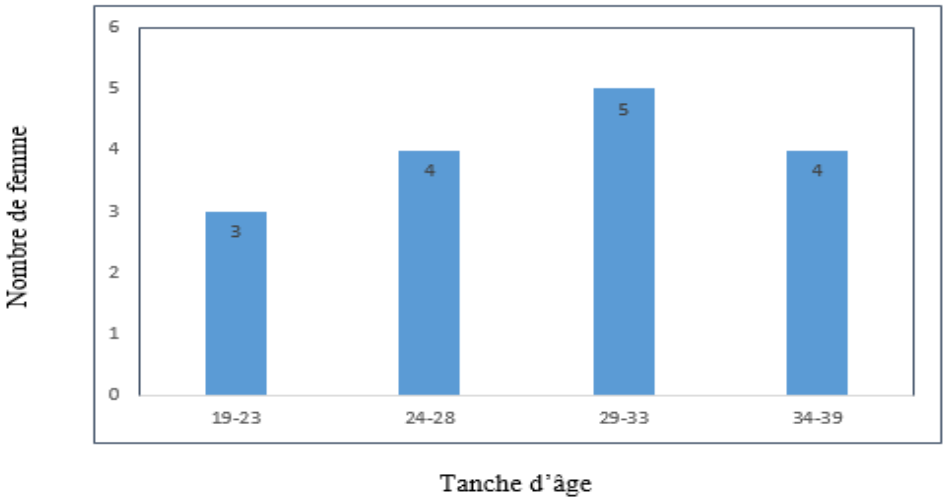


Figure 7 : Répartition d'âge des femmes Allaitantes.

3.1.1 Choix des isolats

L'isolement de souches bactériennes productrices de substances inhibitrices est effectué à partir de 24 échantillons de lait maternel prélevés au niveau de différentes régions d'ouest de l'Algérie (Sidi bel abbés, Oran, Tlemcen).

L'échantillonnage des différents prélèvements effectués ont permis l'isolement de 28 souches bactériennes. Ces isolats sont Gram positif, catalase négative et asporulants, ces caractères laissent supposer leur probable appartenance au groupe des bactéries lactiques **(Tableau 8)**.

Les résultats des interactions obtenues ont permis de retenir 13isolats représentatif sur 28 isolats du lait maternels, seulement 4 souches peuvent être considérées comme hautement productrices de substances inhibant des bactéries pathogènes. Le choix des 04 souches fortement inhibitrices est basé sur les deux critères : l'importance du diamètre de la zone d'inhibition et le pourcentage des souches inhibées.

3.2 Caractérisation phénotypique des isolats

3.2.1 Caractérisation macroscopique

L'étude des caractères culturaux sur les différents milieux solides, a permis d'identifier les différentes colonies qui caractérisent les différents Genres bactériens par observation macroscopique.

L'aspect des colonies isolées sur milieu MRS est de forme ronde, grande ou petite de couleur blanchâtres ; contrairement sur le milieu M17, elles sont petites, transparentes, à pourtour régulier **(Figure 8)**.

3.2.2 Caractérisation microscopique

L'observation microscopique après coloration de Gram, a révélé plusieurs formes : bacillaires ou coccidé, Gram positif. Les bactéries lactiques sont : Gram positif, catalase négative ; peuvent se présenter comme des bâtonnets ou coccobacilles et sont reconnues comme lactobacilles, aussi ils peuvent êtres sous forme coccidé et sont reconnues comme entérocoques, streptocoques ou pédiocoques...selon leur différents modes d'association **(Kandler et Weise, 1986) (Figure 9)**. Sur bouillant, les souches présentent un trouble homogène qui caractérise le groupe des bactéries lactiques.

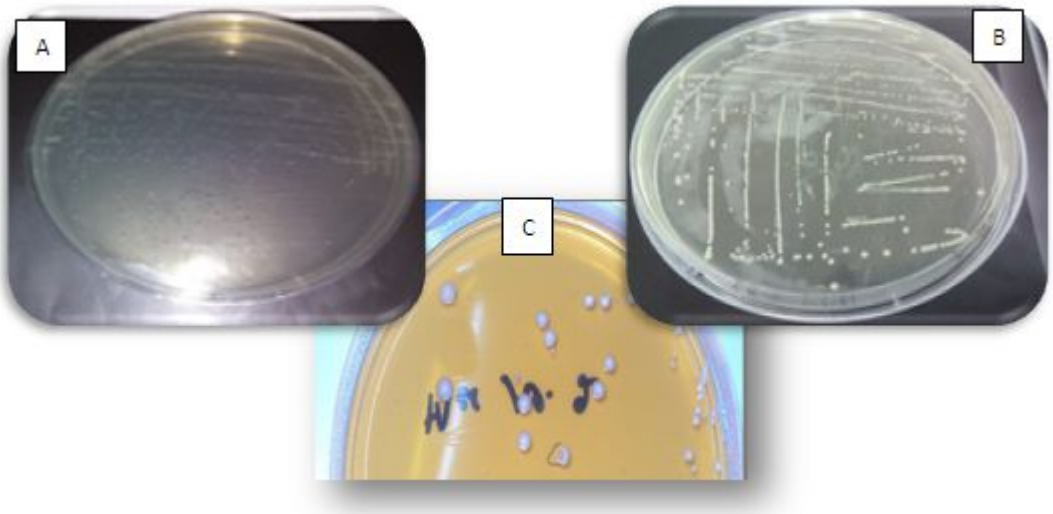


Figure 8: Aspect macroscopique des bactéries lactiques, isolées du lait maternel, inoculées sur milieu MRS incubée à une température de 37°C pendant 48h.

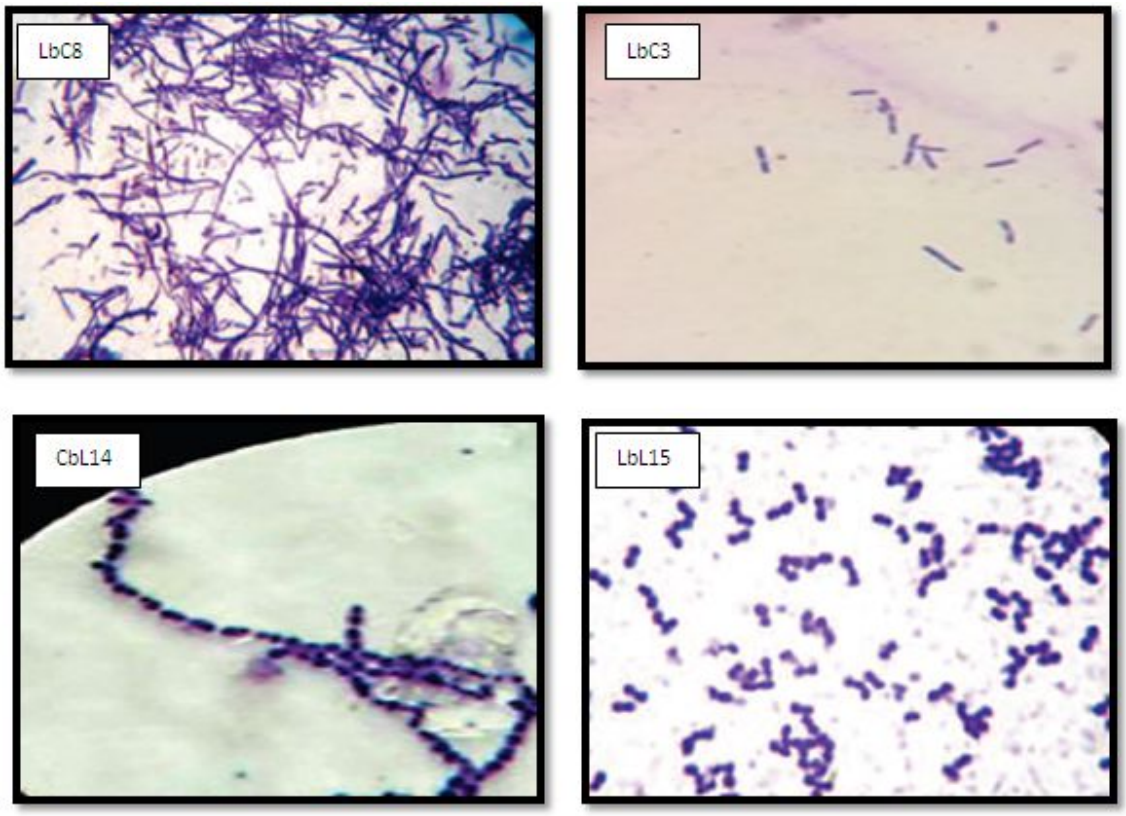


Figure 9 : Coloration de Gram et l'observation microscopique des souches isolées, sélectionnés lactiques (Gx100).

Tableau 8 : Illustration des critères morphologique et microscopique des bactéries lactiques isolées du lait maternel.

	Gram	Cat	Morphologie	Forme, Type de colonie	ID
LbC_7	+	-	Bacille courte, isolés, en diplo et en chainette courte	Moyenne colonie blanchâtre, ronde	*Lactobacillus*
LbL_3					
LbL_1					
LbC_6					
LbC_4					
LbC_3			Diplobacilles	Colonie moyenne blanchâtre et ronde	
LbC_9			Déplobacille	Petite colonie blanchâtre arrondie	
LbC_8			Cocci, isolés, diplo	Colonie moyenne blanchâtre, bombé, ronde	
LbL_4					
LbL_{21}					
LbL_{18}					
CbL_2				Des petites colonies transparentes	*Lactococcus*
CbL_4					
CbL_6					
CbL_{10}					
LbL_{15}				Des petites colonies transparentes arrondies	*Enterococcus*
LbC_{11}					
CbL_{13}					
CbL_7			Cocci isolée et en paire		
CbL_8					
CbL_9					
CbL_5					
CbL_{11}			Cocci en chaînette	Petite Colonies blanches, rondes ou lenticulaires	*Streptococcus*
CbL_{12}					
CbL_{14}					
CbL_{15}					

3.2.3 Tests biochimiques et physiologiques

Les tests physiologiques et biochimiques permis la caractérisation des 11 souches apparentées aux lactobacilles et deux souches apparentés aux entérocoques, dénombrées parmi les vingt-huit isolats. Les résultats de caractérisation physiologiques obtenus sont réunis dans le **Tableau 9**.

Tableau 9 : Présentation des caractères physiologiques des souches lactiques isolées, sélectionnées antagonistes.

Souches	Croissance et salinité du milieu (NaCl)		Températures de croissance			pH de croissance					Hémolyse
	3.5 %	6.5%	15°C	30°C	45°C	3	3.5	4.5	5.4	6.5	
LbC_{11}	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	Y
LbC_{3}	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	Y
LbC_{8}	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	Y
LbC_{9}	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	Y
LbL_{3}	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	Y
LbL_{4}	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	Y
LbC_{2}	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	Y
LbC_{6}	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	Y
LbC_{7}	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	Y
LbL_{1}	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	Y
LbL_{18}	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	Y
LbL_{15}	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	Y
LbC_{21}	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	Y

D'après les résultats, onze souches (LbC3, LbC8, LbC9, LbL3, LbL4, LbC2, LbC6, LbC7, LbL1, LbL18, LbC21) ont montré une capacité à croitre à 30°C mais pas à 45°C donc sont classées parmi les souches mésophiles.

Les deux autres souches (LbL15, LbC11) qui ont la capacité de se développer à 45°C sont classées comme étant des bactéries thermophiles.

Toutes les souches sont pourvues d'un caractère non hémolytique, poussent à une concentration de 3.5% de NaCl et non pas à 6.5%. L'absence d'activité hémolytique chez les bactéries lactiques indique que ces bactéries ne sont pas virulentes **(Figure 10).**



Figure 10 : Test d'hémolyse négatif des souches lactiques isolées du lait maternel.

3.2.4 Le type fermentaire

Le type fermentaire réalisé sur milieu de culture glucosé stérile, contenant une cloche de Durham, permet la différentiation entre deux groupes bactériens, soit homo-fermentaire et hétéro-fermentaire **(Figure 11)**. Les résultats obtenus ont montré l'absence (homofermentaire) et présence (hétérofermentaire) de la production du gaz (CO_2) à partir du glucose **(Tableau 10)**.

Tableau 10 : Type fermentaire des souches lactiques isolées, sélectionnées antagonistes.

Homofermentaire	Hétérofermentaire
LbC2	LbL3
LbC6	LbC9
LbC7	LbC3
LbL1	LbC21
LbL18	
LbL4	
LbC8	
LbC11	
LbL15	



Figure 11 : Photo illustrative du test de recherche du type fermentaire des bactéries lactiques, (milieu de culture de MRS glucosé, muni d'une cloche de Durham).

3.3 Identification par galerie api 50 CH

Les résultats de la fermentation des hydrates de carbone sur la galerie API50CH, ont permis l'identification des espèces.

Le **Tableau 11**, indique les résultats du profil de fermentation des hydrates de carbones, Après la comparaison des résultats, avec les données de **De Roissart H.B (1986)**, **Carr *et al* (2002)**, **Axelsson (2004) et Hammes et Hertel (2006)**. Les souches sont classées dans les espèces suivantes :

Les souches (LbC8, LbC2, LbC6, LbC7, LbL1, LbL18,) appartiennent à l'espèce *Lactobacillus plantrum*, les souches (LbC3, LbC9, LbC21, LbL3) appartiennent à l'espèce *Lactobacillus brevis*, et la souche (LbL4) appartiennent à l'espèce *Lactobacillus sakei.* Pour (LbC11, LbL15) appartiennent à l'espèce *Enterococcus faecium.* Ces résultats sont en accord avec des études antérieures, et renforce la conclusion que le colostrum peut être une source importante de souche de Lactobacilles, tels rapportés par **(Dilek *et al*.,2011)**, qui a isolée 20 souches de lactobacilles de 100 échantillons de colostrum, et **(Jiménese *et al*., 2008)** a isolé 2 *Lactobacillus sp* à partir de 35 échantillons de colostrum. Autres chercheurs ont isolés *En. faecium* du lait maternel humain **(Heikkila *et al*., 2003)**. La présence *d'En. faecium* dans le lait maternel a confirmé l'hypothèse d'un transfert vertical du LAB intestinal de l'intestin de la mère vers son lait et par le lait vers l'intestin du nourrisson **(Martin *et al*., 2003)**.

Tableau 11 : Présentation des caractéristiques biochimiques des souches isolées sélectionnées antagonistes, lors de l'utilisation de la galerie Api 50CHL.

	LbC_9	LbL_3	LbC_{21}	LbC_6	LbC_8	LbC_7	LbC_2	LbL_{18}	LbC_3	LbL_4
Glycérol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Erythritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Xylose	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
L-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MDX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannose	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Manitol	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
D-Sorbitol	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
MDM	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
MDG	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
NAG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amygdaline	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Arbutine	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
ESC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicine	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
D-Celiobiose	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
D-Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Lactose	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
D-Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Trehalose	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Imuline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Mélézitose	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
D-Raffinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Amidon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycogéne	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gentiobiose	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
D-Turanose	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
D-Lyxose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Tagatose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GNT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5KG	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
2KG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

3.4 Criblage des souches antagonistes

L'activité antagoniste des 13 souches isolées sélectionnés est mise en évidence vis-à-vis *Staphylococcus aureus* UT 602, *S.aureus* CECT 86T, *S.aureus* ATCC 25923, *S.aureus* ATCC 43300 et *E. coli* ATCC 25922.

Les prés-cultures de bactéries lactiques isolées sélectionnées et les souches témoins sont inoculées dans un milieu de culture liquide de BHIB et dans un bouillon nutritif respectivement. Le test de l'activité antagoniste est effectué sur milieu de culture gélosé de MRS selon la technique directe **(de Fleming *et al*.,1975)** elle se traduit par la formation d'un halo autour de la souche ensemencée en touche dont il faudrait mesurer le diamètre, la lecture des résultats consiste à mesurer le rayon de l'halo d'inhibition, et la méthode indirecte décrite par **Barefoot *et al*, (1983)**.

Les résultats obtenus ont montrés que 30,76% des souches testées ont manifesté une excellente activité. A l'opposé, 69.23% des souches testées ont présenté une faible activité antagoniste vis-à-vis des souches pathogènes testées.

Ces résultats indiquent que nos bactéries lactiques sont capables de synthétiser des substances inhibitrices ayant une activité antibactérienne. L'ensemble des souches ne présente pas le même spectre d'action vis-à-vis des bactéries pathogènes **(Figure 12, Figure 13, Figure 14, Figure 15)**.

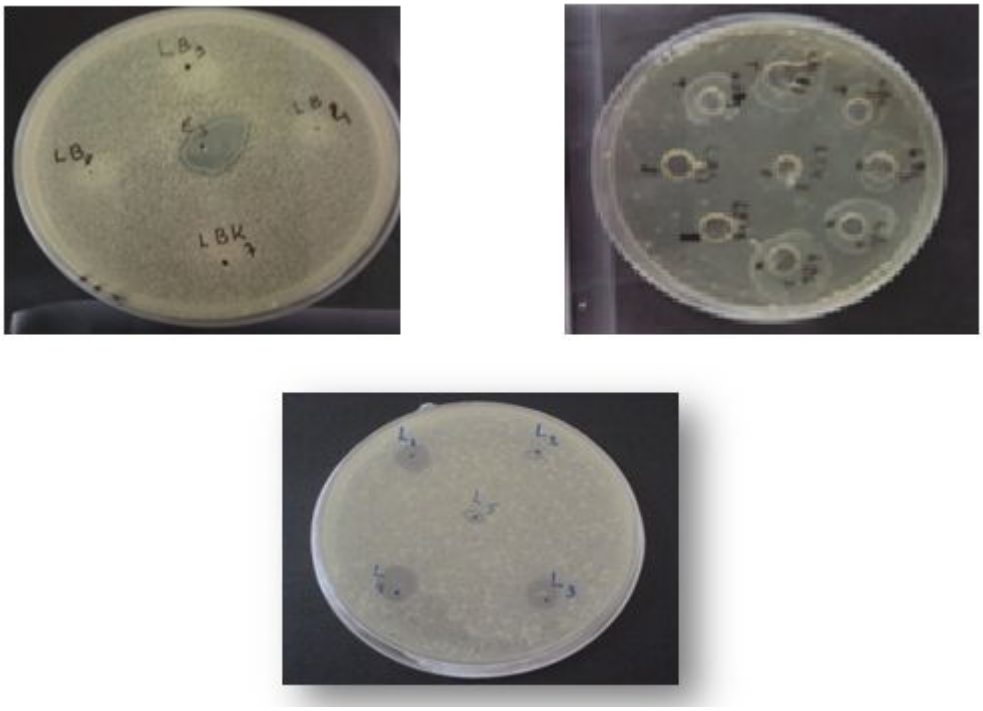


Figure 12 : L'activité antagoniste des souches isolées, sélectionnées lactiques vis- à-vis de certaines souches pathogènes.

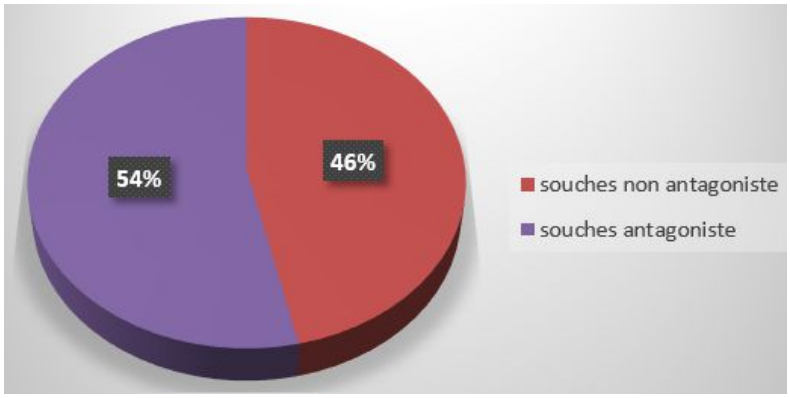


Figure 13 : Pourcentage des bactéries lactiques, isolées à partir de lait maternel inoculées sur milieu de culture MRS, présentant une activité antagoniste vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* UT 602.

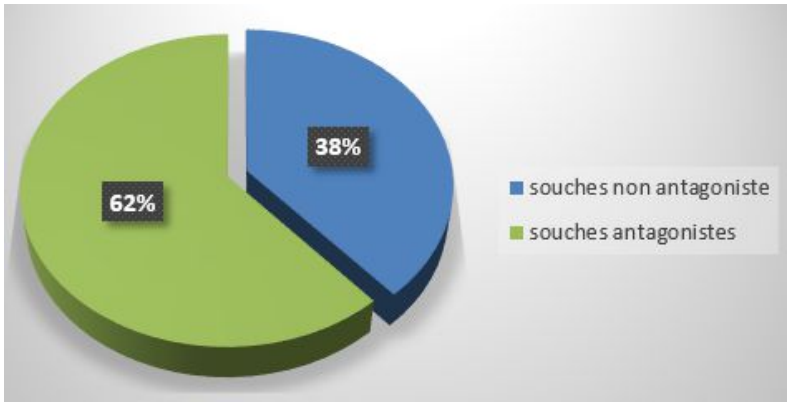


Figure 14 : Pourcentage des bactéries lactiques, isolées à partir de lait maternel inoculées sur milieu de culture MRS, présentant une activité antagoniste vis-à-vis *Staphylococcus aureus* ATCC 43300.

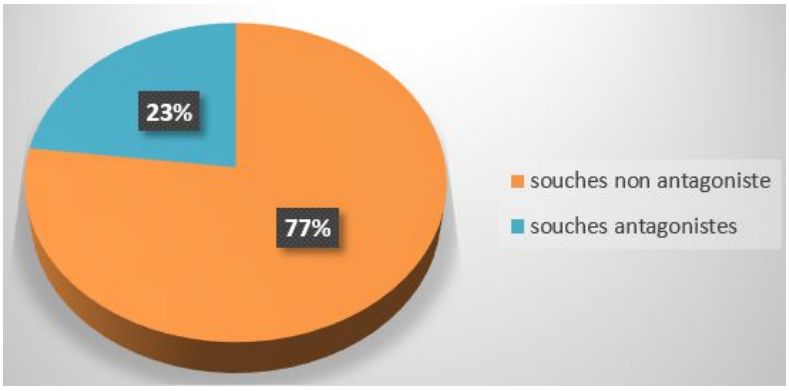


Figure 15 : Pourcentage des bactéries lactiques, isolées à partir de lait maternel inoculées sur milieu de culture MRS, présentant une activité antagoniste vis-à-vis *E. coli* ATCC 25922.

Le Tableau 12 montre des activités antimicrobiennes d'inhibition remarquable pour les souches qui ont été retenues.

Tableau 12 : L'étude de l'activité antibactérienne des souches lactiques par la méthode directe.

	S. aureus UT 602	*S.aureus* CECT 86^T	*E.coli* ATCC 25922	*S.aureus* ATCC 25923	*S.aureus* ATCC 43300
LbC_{11}	+	+	+	+	+
LbC_3	+	+	+	+	+
LbC_8	+	+	-	-	+
LbC_9	+	+	-	-	+
LbL_3	-	+	-	-	+
LbL_4	-	+	-	-	-
LbC_2	+	+	-	-	-
LbC_6	-	+	-	-	-
LbC_7	-	+	-	-	+
LbL_1	+	+	-	-	+
LbL_{18}	+	+	-	-	+
LbL_{15}	-	+	+	+	-
LbC_{21}	-	+	-	-	-

+ : reaction positive, **- :** reaction negative

L'étude de l'activité antagoniste des souches isolées sélectionnées antagonique (LbC3, LbL4, LbC11, LbL15) est mise en évidence vis à vis certaines souches pathogènes par la méthode des puits **(Figure 16)**.

.

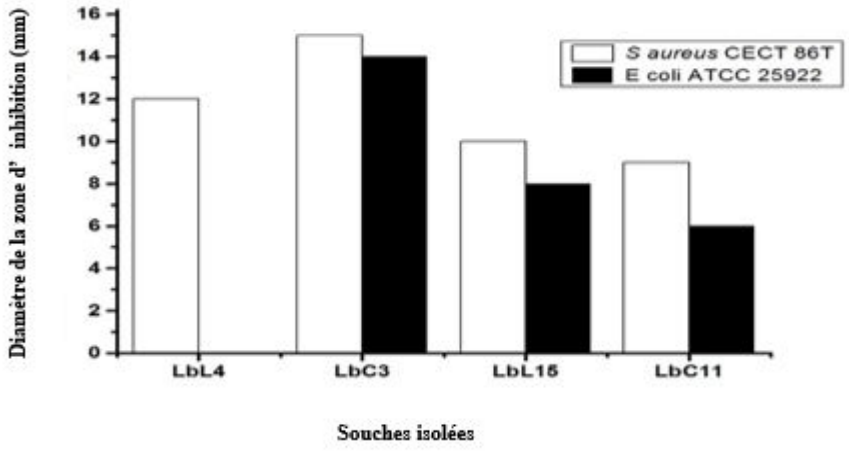


Figure 16 : Les diamètres de la zone d'inhibition de *S aureus* CECT86T et d'*E coli* 25922 en présence des bactéries isolées, sélectionnées antagonistes.

Les zones d'inhibition formées apparaissent claires avec des bordures bien distinctes avec des diamètres variables. *L.brevis* (LbC3) a manifesté une excellente activité antagoniste vis-à-vis de *S.aureus* CECT 86T et *E.coli* ATCC 25922, avec des diamètres des zones d'inhibition de 14±0.80mm. Cependant, les diamètres des zones d'inhibition formées des trois souches (*L.plantarum* [LbL4], *En. feacium* [LbL15, LbC11]) vis-vis de *S.aureus* CECT 86T sont 12±0.99mm, 10±0.75mm, 9±0.66mm respectivement.

La souche *L. sakei* (LbL4) n'a manifesté aucune activité antagoniste vis-vis la bactérie Gram négative *Escherichia coli* ATCC 25922.

La capacité inhibitrice in vitro des bactéries lactiques vis-à-vis des germes pathogènes démontre une bonne propriété probiotique, comme dès lors qu'elle peut jouer un rôle dans la préservation de la qualité hygiénique des denrées alimentaires **(Ammor *et al*., 2006)**.

3.4.1 Localisation de la substance inhibitrice

A partir des meilleures zones d'inhibition, on a sélectionné quatre souches pour localiser la ou les substances responsables de l'interaction.

Tableau 13: L'étude de l'activité antibactérienne du culot des bactéries lactiques par mesure du diamètre de la zone d'inhibition (mm).

Souches		***S aureus* UT 602**	***S.aureus* CECT 86^T**	***E.coli* ATCC 25922**	***S.aureus* ATCC 25923**	***S.aureus* ATCC 43300**
L sakei LbL4		-				
L brevis LbC3		-				
En faecium	LbC11	-				
	LbL15					

Tableau 14 : L'étude de l'activité antibactériennes de surnageant des bactéries lactiques par mesure de la moyene des diamètres de la zone d'inhibition (mm).

Souches		*S aureus* UT 602	*S.aureus* CECT 86^T	*E.coli* ATCC 25922	*S.aureus* ATCC 25923	*S.aureus* ATCC 43300
L sakei **LbL4**		-				
		0	**12**	**0**	**0**	**0**
L brevis **LbC3**		**13**	**15**	**14**	**12**	**11**
E faecium	**LbC11**	**10**	**10**	**8**	**11**	**5**
	LbL15	**0**	**9**	**6**	**6**	**0**

D'après les résultats illustrés dans les deux tableaux ci-dessus, il apparait que l'activité antibactérienne du culot bactérien vis-à-vis des souches cibles est pratiquement nulle, montrant que les fractions cellulaires ne présentent aucun effet sur la croissance des souches pathogènes ; A l'inverse, les fractions extracellulaires (surnageant) des souches lactiques montrent un pouvoir antibactérien.

Les résultats obtenus se rapprochent de ceux d'autres études quant à la propriété du culot bactérien et celle relative au surnageant. **(Achemchem et Abrini, 1997 ; Labioui *et al.*, 2005)**.

3.4.2 Mise en évidence de la nature de l'agent inhibiteur

La présence d'une inhibition n'est pas due uniquement à la production de bactériocines, cette inhibition peut avoir plusieurs origines parmi lesquelles : la production d'acide organiques, de peroxyde d'hydrogène, de phages et ou de bactériocines **(Moreno *et al*., 1999 ; Navarro *et al*., 2000 ; Rodriguer *et al*., 2002 ; Maldonado *et al* ., 2003 ; Todorov et Dicks., 2005 et Boumhira *et al* .,2011)**.

Pour la recherche de la nature de l'agent inhibiteur sur milieu solide, a permis la sélection des souches hautement productrices de substances inhibitrices qui se répartissent comme suit : *Lactobacillus brevis* (LbC3), *Lactobacilus sakei* (LbL4), *Enterococcus feacium* (LbL15, LbC3).

Ce choix est basé sur les travaux de **Hosono *et al*., (1977)** qui établit que la sélection des souches soit établit à partir des mesures des activités inhibitrices sur milieux solides.

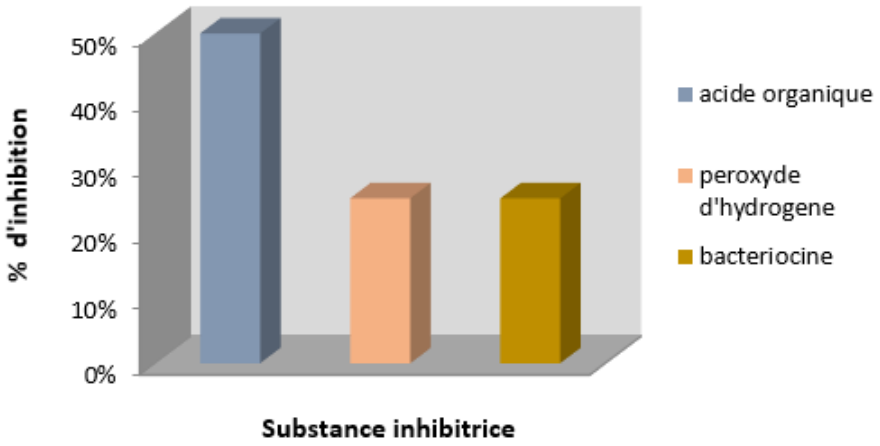


Figure 17 : Prévalence de la substance inhibitrice produite par les bactéries lactiques isolées du lait maternel.

3.4.2.1 Inhibition due à la production d'acides organique

Après élimination de l'effet des acides organiques, par neutralisation avec une solution NaOH et filtration par filtre millipore 0.22, les surnageant neutre et filtrés ont été testé pour leur activités inhibitrices contre les germes tests par la méthode des puis citée précédemment.

Ces résultat montrent une perte de l'activité inhibitrice des surnageant vis-à-vis les souches pathogènes pour les deux souches *En. feacium* (LbL15, LbC11). Par contre les surnageant neutres des souches LbC3, LbL4 ont inhibées différemment la croissance des souches cibles.

Ces résultats nous laissent supposer que l'inhibiteur majeur pour les souches *E.feacium* (LbL15, LbC11) sont les acides organiques produit par les souches lactiques, et l'apparition de l'activité antagoniste, après élimination de l'effet d'acide organique, chez LbC3, LbL4 confirme l'existence d'autre substances antibactériennes telles que le peroxyde d'hydrogène, et les bactériocines like.

3.4.2.2 Inhibition due au peroxyde d'hydrogéne

La souche (LbL4) produit du peroxyde d'hydrogène. Cette enzyme peut être dégradée par une enzyme la catalase présente chez certaines espèces bactériennes.

L'intervention du peroxyde d'hydrogène dans les phénomènes d'inhibition par les bactéries lactiques a été établie. Lorsqu'il est libéré à des concentrations suffisantes, il peut provoquer l'inhibition de certains contaminants **(Bourgeois et Larpent, 1996)**.

3.4.3 Recherche de la substance inhibitrice de nature protéique (bactériocine)

Après élimination de l'effet des acides organiques, par neutralisation avec une solution NaOH 1N et filtration par filtre 0.22µn et l'effet de peroxyde d'hydrogène, les surnageant neutre et filtrés ont été testés pour leur thermorésistante (0, 15, 20 et 30 min à 100°C) contre les germes pathogènes. Nous avons constaté la présence des zones d'inhibition de

Lactobacillus brevis (LbC3) quel que soit le temps de traitement thermique 0,15, 20, 30 min à 100°C. Ce qui fait suggérer que la souche étudiée (LbC3) produit une substance de nature protéique qui permet l'inhibition des autres bactéries indicatrices.

La thermorésistance des bactériocines est recherchée par de nombreux chercheurs **(Parente *et al*., 1994 ; Labioui *et al*., 2005)**. Les mêmes résultats ont étés obtenus concernant l'activité des bactériocines AMA-K et plantaricine LR/ 14 non affectée par le traitement thermique **(Todorov *et al*., 2007 ; Kumar Tiwari et Srivastava. 2008)**.

La production de bactériocine a été observée uniquement par *L. brevis* (LbC3), tel que mise en évidence dans une autre précédente, a démontré une capacité limité à produire des bactériocines par les souches isolées du lait maternel. **(Kozak *et al*., 2015)**

La résistance des souches au traitement thermique est une propriété intéressante lors des procédés de pasteurisation ou de stérilisation utilisables dans les industries alimentaire et pharmaceutique **(Figure 18)**.

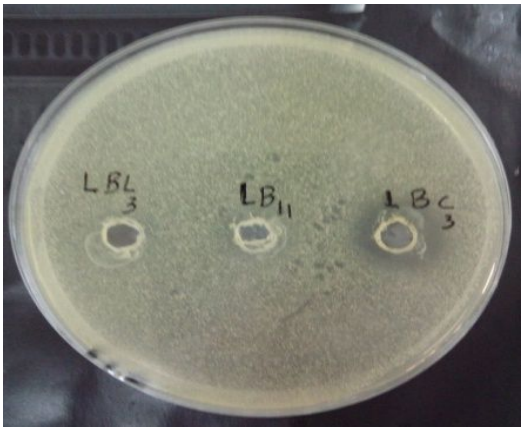


Figure 18 : Zones d'inhibitions formées par le surnageant de *L brevis* (LbC3) quel que soit le temps thermique à 100°C.

3.4.4 Optimisation de la production de bactériocine

Les conditions de culture influencent fortement la production de bactériocines. en effet, l'optimisation de la croissance ne résulte pas nécessairement en l'optimisation de la production de bactériocines **(Parente *et al*., 1999).** Il a même suggéré que des conditions de croissance défavorables permettent de stimuler leur production **(Verluyten *et al*., 2004).**

3.4.4.1 Effet de la température d'incubation

La température d'incubation est un paramètre qui doit être maitrisé pour la croissance et la production de la bactériocine. Ce paramètre a fait l'objet de plusieurs études, qui ont montré que la température de production des bactériocines est souvent inferieure à la température optimale de croissance **(Krier *et al*., 1998).** A cet effet la souche productrice de

bactériocine (LbC3) testés à différentes températures (25, 30, 35, 40 et 45°C), les cultures ont été réalisées pendant 24h dans le milieu MRS.

L'effet de la température d'incubation sur la croissance de *L. brevis* (LbC3) et la production de bactériocine après 24h d'incubation est montré sur **la Figure 19**.

Sous ces conditions de culture, on enregistre un pouvoir inhibiteur optimal (15 mm) à une température de 30°C. Ce résultat a été observée par plusieurs chercheurs étudiants l'effet du paramètre de température d'incubation sur la production de bactériocine, tel produite par d'autre souche, exemple le cas de *Lactobacillus plantarum* KC21 motrant une activité antagoniste très active à 30°C mais n'a détecté aucune activité de la bactériocine produite par *L. plantarum* KC21 à 45°C d'incubation (**Lim , 2010)**.

Pour expliquer ce phénomène **Messens *et al*., 2003** ont suggéré qu'a une température d'incubation élevée, des protéases sont activées en réponse au stress thermique. Aussi, **Juarez Tomas *et al*., (2002),** ont supposé qu'a des températures supérieurs à 44°C, les cellules de *Lactobacillus salivarius* CRL1328 ont été incapable de synthétiser ou sécréter des bactériocines alors que la croissance n'est pas affectée par cette température.

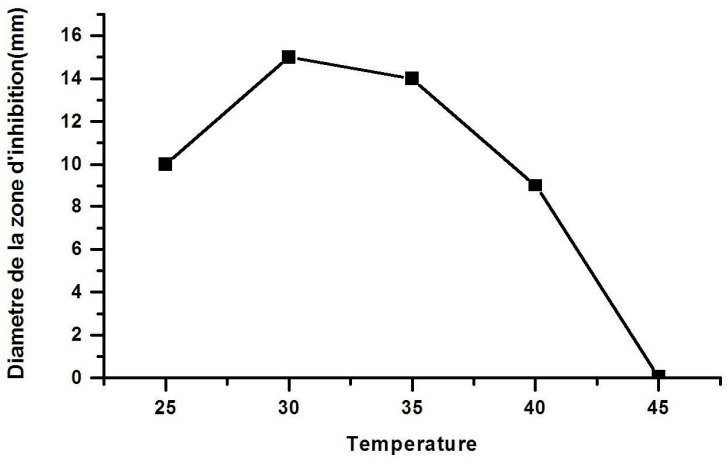


Figure 19 : L'effet de la température d'incubation sur la production de la bactériocine.

3.4.4.2 L'effet du pH

Plusieurs auteurs étudient les facteurs intrinsèques du milieu influençant l'efficacité de la diffusion de la bactériocines, surtout si elle fait l'objet d'une application agro-alimentaire **(Blom *et al*., 1997)**, parmi eux, le pH du milieu.

Dans le but d'explorer le pH optimum de la souche productrice de bactériocines (LbC3) vis-à-vis *E.coli* ATCC25922. La souche inhibitrice est incubée dans différents concentration de pH (4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5) du milieu MRS et l'activité antagoniste est évaluée par la mesures des diamètres des zones d'inhibition formés **(Figure 20).**

Une réduction de l'activité antagoniste de la bactériocine *de L.brevis* (LbC3) vis-à-vis d' *E.coli* ATCC25922 est observée à des valeurs de pH comprise entre 4.5 et 7.5. A noter qu'un optimum reste observable à un pH égal à 6.

Des résultats similaires ont étés rapportés par Mahrous *et al* (2013), justifié par le fait que la production de bactériocine est souvent régulée par le pH et la température de croissance, comme cela a été corroborer dans plusieurs études impliquant la pédicothérapie AcH **(Biswas *et al*., 1991)**.

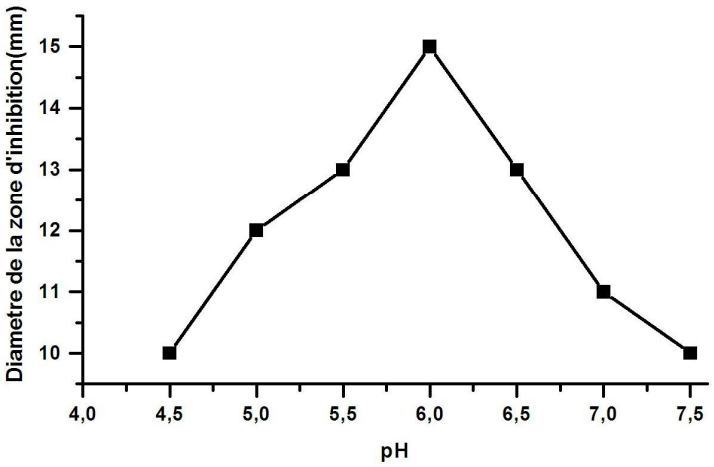


Figure 20 : Effet du pH sur l'activité antagoniste de *L.brevis* (LbC3) vis-à-vis d'*E.coli* ATCC25922.

Les conditions de culture et la composition du milieu de croissance sont très importantes pour la production de bactériocines (**Tagg *et al*., 1976)**. Les températures et pH optimaux de production sont souvent inférieurs à ceux optimaux pour la croissance. C'est par exemple le cas pour la production de bactériocines par *L.curvatus* LTH1174 **(Messens *et al*., 2003)**, *Leuconostoc mesenteroides* L124 et *L.curvatus* L442 **(Mataragas *et al*., 2003)**.

3.5 Mode d'action des bactériocines

L'estimation de la croissance bactérienne en fonction du temps est basée sur deux critères, la masse cellulaire et le nombre de bactéries qui augmentent dans des proportions variables au cours de la croissance. L'interprétation des courbes de croissance obtenue par spectrophotométrie n'est cependant pas immédiate pour deux raisons : la densité optique permet de mesurer la biomasse de la culture et non directement sa concentration en cellules

viables et cette densité n'est mesurable que lorsque la concentration de la culture atteint un certain seuil qui varie de 10^5 -10^7 cellules par ml en fonction du microorganisme étudié. La masse cellulaire est mesurée selon la densité optique du milieu, ceci permet de décrire la courbe de croissance de la bactérie. Tandis que le nombre de bactéries viables devrait être estimé d'après le nombre d'unité en séries. La détermination de la cinétique bactérienne est effectuée sur milieu de culture liquide par mesure de la densité optique d'une suspension bactérienne, inoculée, incubée à une température de 37°C pendant 18-24h à une longueur d'onde de 600nm.

Afin d'explorer l'activité de la bactériocine produite par *L.brevis* (LbC3) vis-à-vis de la souche témoin de l'activité antagoniste, des cultures de *E.coli* ATCC25922 sont inoculées dans un bouillon nutritif, incubées avec agitation à une température de 30°C. Un volume de 1ml de surnagent de *L.brevis* (LbC3) est ajouté à la culture de *E.coli* ATCC25922 après la 6eme heures d'incubation. Des prélèvements stériles sont effectués à des intervalles de temps réguliers afin d'évaluer la production de la biomasse bactérienne, mesurée à une longueur d'onde de 600nm.

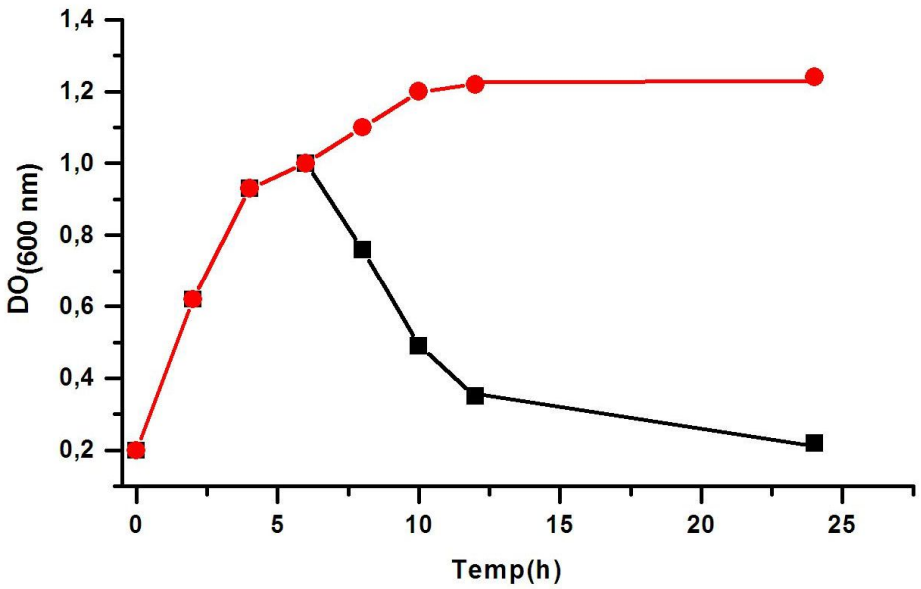


Figure 21: Cinétique de croissance *d'Escherichia coli* ATCC25922 en présence et en absence de surnagent de *L. brevis* (LbC3).

La Figure 21, illustre la cinétique de croissance *d'E.coli* ATCC25922 en présence et en absence de la bactériocine produite par *L.brevis* (LbC3). La courbe de croissance d*'E. coli* a montré que la biomasse bactérienne a nettement diminué après l'ajout des bactériocines, due à la lyse des cellules bactériennes. A l' opposé, en absence de l'ajout de bactériocine, l'allure de la courbe de croissance reste inchangée du fait d'une biomasse bactérienne d'*E.coli* inaffectée.

3.6 Caractérisation technologique des isolats de bactérie lactique

3.6.1 Pouvoir acidifiant

L'activité acidifiante est l'une des principales fonctions des bactéries lactiques, elle demeure l'une de leur propriétés métaboliques les plus recherchées vu son intérêt en technologie laitière. La production de l'acide lactique est le paramètre majeur pour la sélection des souches lactiques capables de s'exploiter en industrie alimentaire. Sa production à partir du lactose du lait, sert à coaguler le lait, ainsi qu'elle provoque un abaissement du pH, en conséquence de pH bas va rendre le milieu défavorable à la croissance des pathogènes.

Les résultats obtenus sont illustrés dans les graphiques ci-dessous **(Figure 22, Figure 23, Figure 24)**.

D'après ces résultats, ont remarqué que la moitié des bactéries lactiques identifiées présentent une production progressive en acide lactique. Cette dernière est accompagnée d'un abaissement du pH du milieu. Après 24h d'incubation le pH observé se situe entre 6.33(LbC2) et 4.35 (LbC6) chez *Lactobacillus plantarum*.

Lactobacilus brevis, donnent des valeurs d'acidification moyennes, après 24h d'incubation, la quantité d'acide lactique la plus élevée a été enregistrée chez la souche (LbC3) : pH=4.89 et la plus faible est enregistrée chez la souche (LbC21) : pH= 6.25. La production de l'acide lactique était parallèlement accompagnée avec l'abaissement progressif en valeurs de pH.

Parmi les entérocoques testés sur leur pouvoir acidifiant, la souche LbL15 se révèle comme la meilleure souche acidifiante 4.89. ces résultats sont en accord avec de nombreuses études et rejoignent ceux de **(Zadi Karam, 1998 ; Mannu *et al* ., 2000 ; Alonso- Calleja *et al*., 2002 ; Idoui *et al.,* 2009)**.

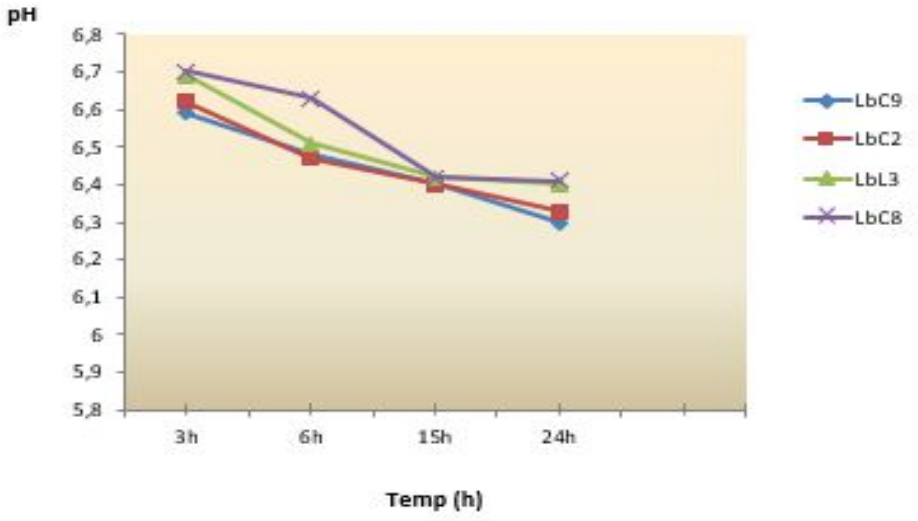


Figure 22 : Variation de pH des souches isolées faiblement acidifiés.

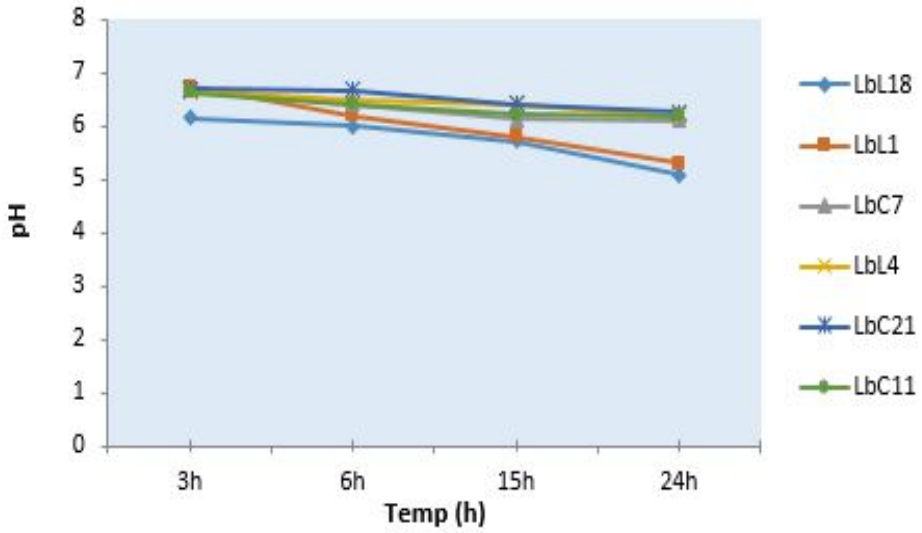


Figure 23 : Variation de pH des souches isolées moyennement acidifiées.

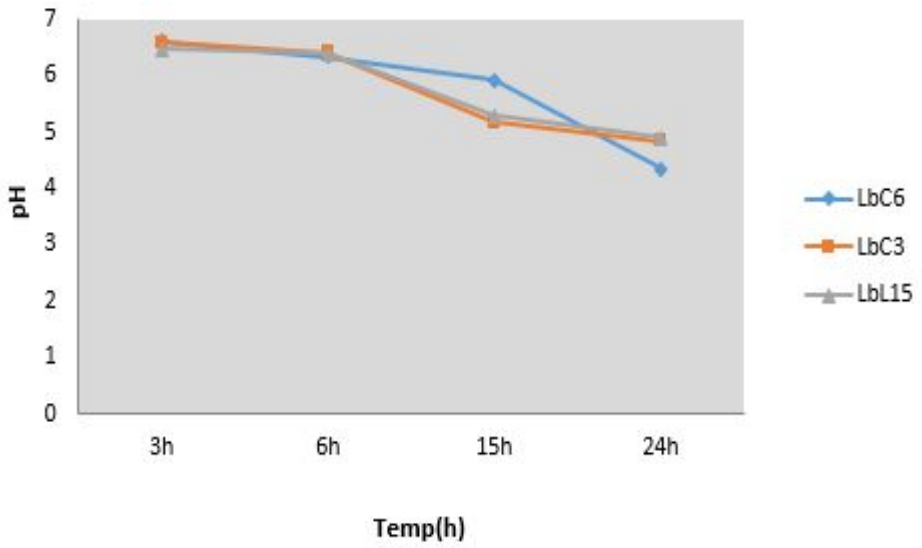


Figure 24 : Variation de pH des souches isolées fortement acidifiées.

Les résultats obtenus après 24h d'incubation, ont permis de classer presque la totalité des souche testées dans la catégories des bactéries lactiques moyennement acidifiantes 6.25(LbC21) et 5.08(LbL18), à l'exception des souches qui s'avèrent fortement acidifiantes 4.89(LbL15) et 4.35 (LbC6), et les souches qui se révèlent faiblement acidifiantes entre 6.30(LbC2) – 6.41 (LbC8).

3.6.2 Pouvoir protéolytique

L'étude de l'activité protéolytique est effectuée sur milieu PCA additionné de 1% de lait écrémé. La présence de cette activité est mise en évidence par l'utilisation de la caséine du lait écrémé comme substrat. Les résultats obtenus ont montré que huit isolats ont manifesté une activité protéolytique **(Figure 25).**

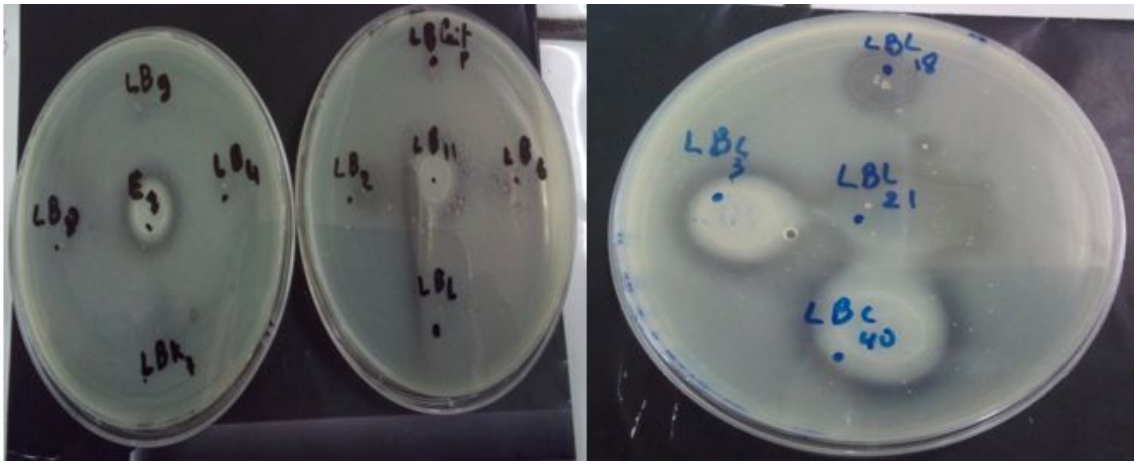


Figure 25 : Recherche d'activité protéolytique des bactéries lactiques isolées sélectionnés antagonistes sur milieu PCA.

Selon Vuillemard (1986), la souche est dite protéolytique si elle présente une zone de lyse de diamètre compris entre 5 et 15 mm. Par comparaison à cette donnée, il apparait que l'espèce *L.brevis* (LbC21) est fortement protéolytique comparativement aux autres espèces avec un diamétre de 15mm. Les souches (LbL18, LbC2, LbC8, LbC3 et LbL3) sont révélées protéolytiques moyennement, vue que leurs diamètre des zones de protéolyse étaient compris entre9 et 12 mm, et les 04 autres (LbL4, LbC6, LbC7 et LbL1) sont reconnues non protéolytiques vue que la zone claire ne dépasse pas les 3mm.

L'activité protéolytique est un caractère très important de la plupart des fromages, car il affect à la fois la texture et la flaveur **(Fox, 1989)**. Or les levains lactiques, s'ils abaissent le pH du milieu en transformant le lactose en acide lactique, contribuent également aux caractères organoleptiques des fromages en libérant des systèmes enzymatiques, en particulier protéolytiques, qui participent aux principaux phénomènes de l'affinage **(Thomas et Pritchard, 1987).**

3.6.3 Pouvoir lipolytique

Les résultats de l'activité lipolytique des souches lactiques sont reportés dans ci-après **(Tableau 15)**.

Tableau 15 : Activité protéolytique et lipolytiques des bactéries lactiques étudiées.

Souches	Pouvoir lipolytique	Pouvoir protéolytique
LbC_{11}	-	+
LbC_{3}	-	+
LbC_{8}	-	-
LbC_{9}	-	-
LbL_{3}	-	+
LbL_{4}	-	-
LbC_{2}	-	+
LbC_{6}	-	-
LbC_{7}	-	-
LbL_{1}	-	+
LbL_{18}	-	+
LbL_{15}	-	+
LbC_{21}	-	+

D'après ces résultats, il apparait que l'ensemble des bactéries lactiques ne présente aucune activité lipolytique importante en formant des dépôts autour des disques de croissance. Ces résultats sont en accords avec ceux obtenus par **Ammor (2006)** et **papamaloni (2003)**. Cependant, les résultats de **Karam (2012)** ont montré que les Lactocoques et les Entérocoque ont une activité lipolytique significative en présence de 1% d'huile d'olive en comparaison avec les substrats lipidiques artificiels.

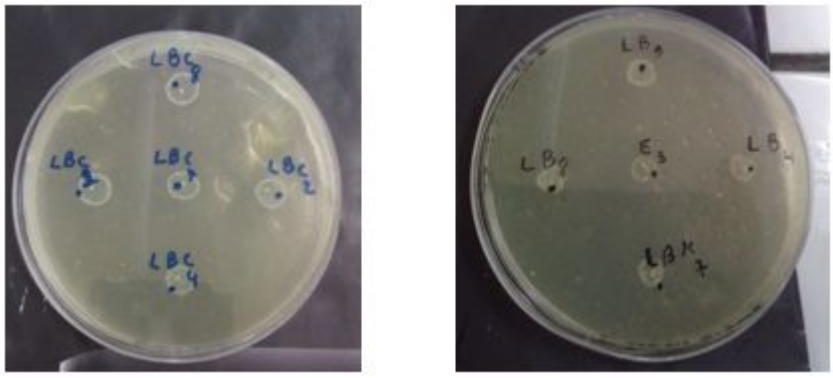


Figure 26 : Teste d'activité lipolytique des bactéries lactiques isolées séléctionnées antagonistes.

3.7 Détermination des profils de sensibilité aux antibiotiques des bactéries lactiques étudiés

Les résultats de ce test sont présentés dans **la Figure 27**et **le Tableau 16**, ce dernier montre les diamètres obtenus avec chaque antibiotique et chaque souche. Après l'application des recommandations du comité d'antibiogramme (2012). Ce dernier renseigne sur les antibiotypes des souches testées (**R**, bactérie résistante, **S** bactérie sensible et **I**, intermédiaire.

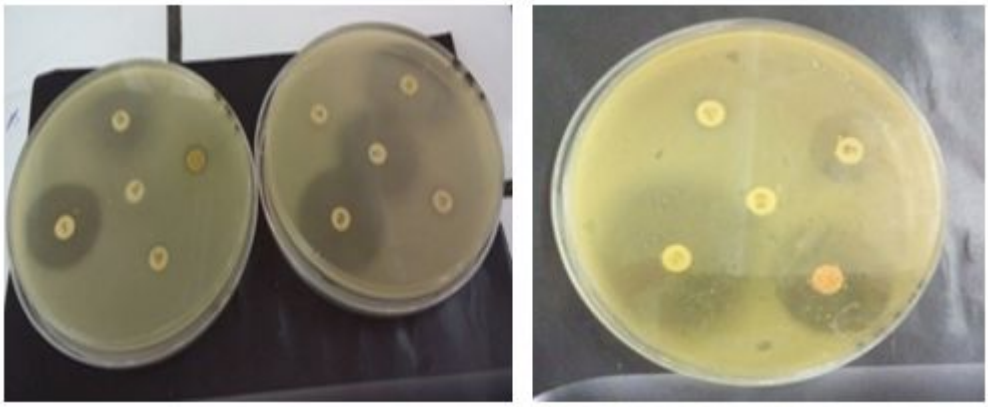


Figure 27 : Quelques résultats du test de l'étude de la sensibilité des souches isolées sélectionnés antagonistes aux antibiotiques.

En analysant les résultats du test d'antibiorésistance, ont constaté que :

Toutes les souches ont une résistance aux antibiotiques suivants : oxacilline, vancomycine, acide nalidixique, nitroxoline, tobramycine. Les Lactobacilles sont habituellement résistants à la plus part des inhibiteurs de la synthèse d'acide nucléique, acide nalidixique et métronidazole fluroquinolones. Ces bactéries ont aussi des résistantes

intrinsèques aux aminoglycosides, glycopeptides **(Coppola *et al*., 2005)**. Par contre elles étaient sensibles aux : pénicilline, la pristinamycine.

La sensibilité à l'érythromycine est notée chez les souches LbC8, LbC7, LbL4, LbL18, LbL1, LbC2, LbC3, LbC21, LbC11. Un phénotype intermédiaire est noté pour les souches LbC6, LbC11, LbL3, LbL15.

Toutes les souches sont sensibles au chloramphénicol sauf LbL1 qui est intermédiaire.

Les souches LbL18, LbC11, LbL3, LbL15 présente un phénotype intermédiaire a la spiramycine, les autres souches sont sensible à cet antibiotique **(Tableau 16).**

Tableau 16 : Résultats de la résistance et la sensibilité aux antibiotiques des bactéries lactiques étudient.

Souches	P	OX	SP	E	PT	TOB	VA	C	NA	NI
L plantarum										
LbC8	35 S	0 R	30 S	27 S	40 S	9 R	0 R	22 S	0 R	7 R
LbC6	25 S	0 R	30 S	20 I	32 S	9 R	0 R	26 S	0 R	10 R
LbC7	33 S	0 R	33 S	30 S	30 S	12 R	0 R	30 S	0 R	6 R
LbL18	40 S	14 R	20 I	30 S	29 S	0 R	0 R	35 S	0 R	0 R
LbL1	30 S	0 R	30 S	27 S	40 S	9 R	0 R	20 I	0 R	6 R
LbC2	35 S	0 R	30 S	26 S	30 S	0 R	0 R	21 S	0 R	10 R
L brevis										
LbC3	30 S	0 R	31 S	25 S	33 S	10 R	0 R	27 S	0 R	0 R
LbC11	30 S	0 R	20 I	20 I	29 S	0 R	0 R	25 S	0 R	6 R
LbL3	35 S	0 R	20 I	20 I	29 S	12 R	0 R	25	0 R	0 R
LbC21	35 S	0 R	31 S	26 S	30 S	0 R	0 R	30 S	0 R	7 R
L. sakei										
LbL4	30 S	0 R	38 S	27 S	35 S	12 R	0 R	33 S	0 R	7 R
En feacuim										
LbC11	30	0 R	35 S	26 S	39 S	8 R	0 R	22 S	0 R	7 R
LbL15	30 S	0 R	20 I	20 I	32 S	9 R	0 R	26 S	0 R	0 R

S:sensible; R:resistant; I : intermédiaire ; P: penicilline; OX: oxacilline; SP: spiramicine; E: erythromycine; PT: pristinamycine; GN: gentamicine; TOB: tobramicine; VA: vancomycine; C: chloramphenicole; NI: nitroxoline; NA: acide nalidixique

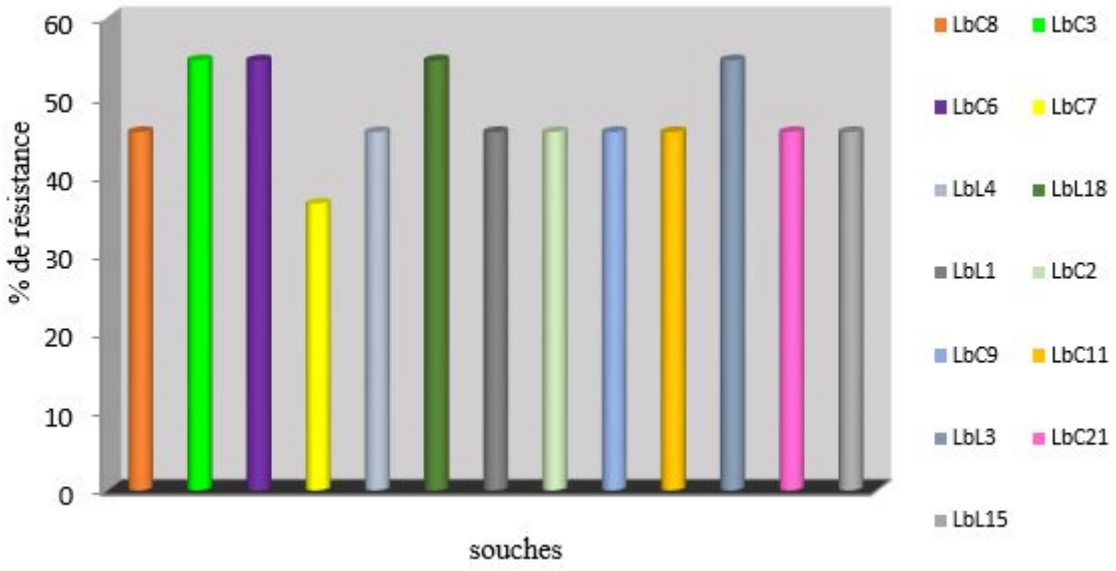


Figure 28 : Pourcentage de la résistance de chaque souche isolée sélectionné antagoniste vis à vis les dix antibiotiques.

Selon **la Figure 28** ont constaté que les souches LbL3, LbC11, LbC7 sont les souches les plus résistants aux antibiotique avec un pourcentage de 54.54%, tandis que la souche LbC7 est la moins résistant avec un pourcentage de 36.36% de résistance.

Nous avons également mis en évidence le comportement de chaque souche isolé vis-à-vis de chaque antibiotique testé **(Figure 29)** : une résistance totale de 100% à l'oxacilline, vancomycine, acide nalidixique, nitroxoline, tobramycine. Aucune résistance n'a été notée chez les antibiotiques suivans : pénicilline, la pristinamycine, érythromycine, chloramphénicol.

Les Lactobacilles sont généralement sensibles aux antibiotiques qui inhibent la synthèse des protéines (érythromycine, chloramphénicol) **(Charteris *et al*, 1998 , Rojo-Bezares *et al* , 2006)**. En ce qui concerne les inhibiteurs de synthèse de la paroi cellulaire, plusieurs études indiquent que les espèces de Lactobacilles ont présenté une sensibilité à la quasi-totalité des pénicilines **(Charteris *et al*., 1998)**, de sorte que la résistance des souches aux oxacilline a été décrite dans d'autres études **(Coppola *et al*, 2005 ; Ammor *et al*, 2007)**.

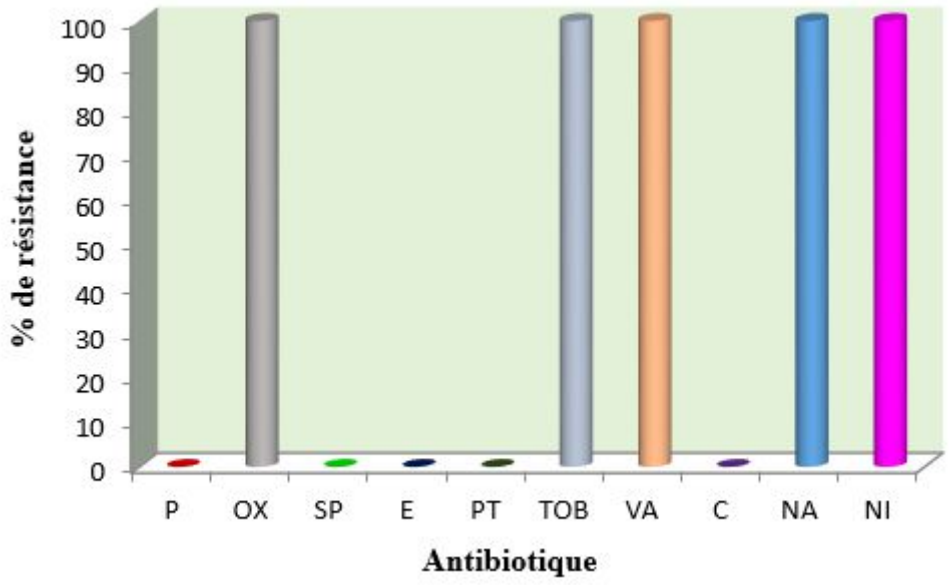


Figure 29 : Comportement des souches isolées sélectionnés antagonistes vis-à-vis de chaque antibiotique testé.

3.8 Cinétique de la croissance (Production de biomasse)

La Cinétique de croissance de chaque souche a été étudiée pour trouver le meilleur temps de culture pour la préparation d'un inoculum, c'est-à-dire le temps qu'il faut pour que chaque bactérie rentre en phase exponentielle. A cette phase toute les cellules se trouvent dans leur état physiologique maximal et peuvent se multiplier. La vitesse de production atteint son maximum et reste constant pendant toute cette phase **(Sechet, 2000)**.

Les quatre souches sélectionnés (LbL15, LbC11, LbC3, LbL4) ; les plus performant par leur activité antagoniste ; ont été suivies pendant 26h par la mesure de leur D.O à 600nm à température de 37°C, présente un comportement physiologique différent : la phase exponentiel de souche LbL4, LbL15, LbC11 est atteinte après 6h d'incubation et seulement après 3 heures chez la souche LbC3. Ce qui reflète que la phase latence de la souche LbC3 est plus courte que celui des souches LbL4, LbC11, LBL15, cela indique que la croissance de LbC3 est rapide que les autre souches. La phase stationnaire apparait chez les souches LbC3, LbC11, LbL15, tandis que la souche LbL4 a une phase exponentielle plus lente dépassant les 26 heures d'incubation **(Figure 30, Figure 31)**.

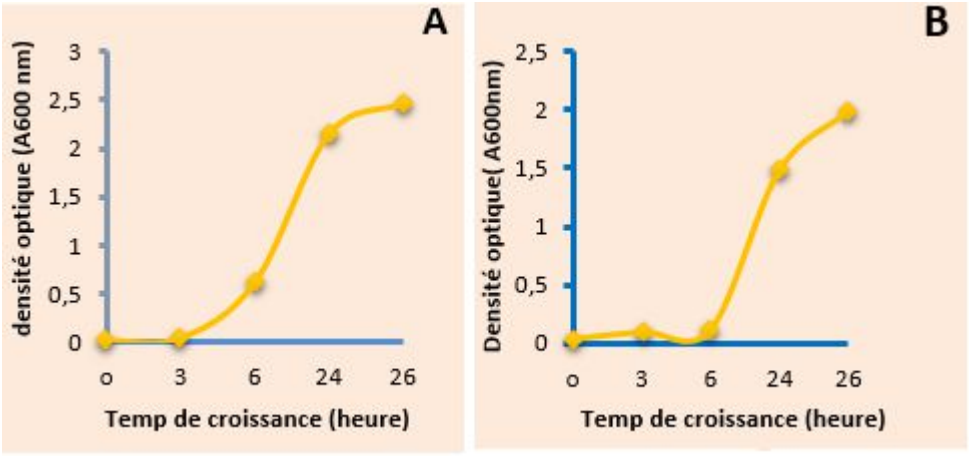


Figure 30 : Cinétique de croissance par les souches sélectionnés antagonistes A : LbC3 ; B : LbL4.

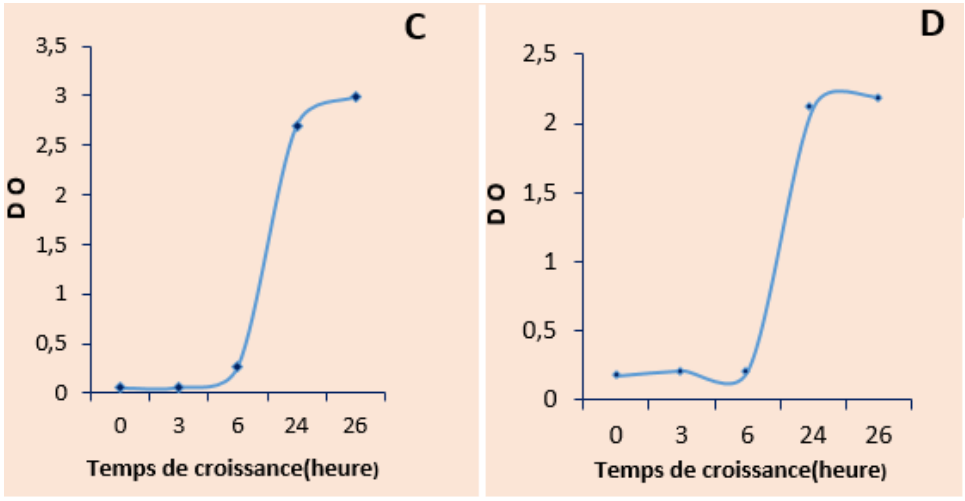


Figure 31 : Cinétique de croissance par les souches sélectionnés antagonistes C : LbL15 ; D :LbC11.

3.9 Identification génotypique

Après sélection des isolats les plus intéressants qui ont montré une plus grande capacité antibactérienne, nous avons choisis 04 souches qui sont LbL15, LbC11, LbC3, LbL4.

Après l'extraction, la purification et quantification de l'ADN selon le protocole décrit dans la section matériel et méthode, l'amplification par PCR correspondant à une région d'environ 1500 pb, une région du gène de L'ARNr 16S.

Pour bien sélectionner cette région, les amorces universelles d'amplification ont été utilisées :

fD1 (5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′)

rD1 (5′-AAGGAGGTGATCCAGCC-3′)

Les amplicons de PCR de chaque échantillon ont été visualisées sur un gel d'agarose. La Figure 32 montre qu'il existe une bande d'environ 1500pb correspondant à la taille attendue de la région à amplifier.

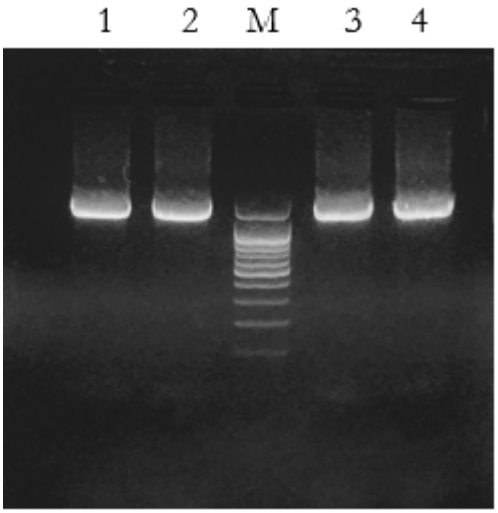


Figure 32 : Profile éléctrophorétique d'un fragment de 1500pb.

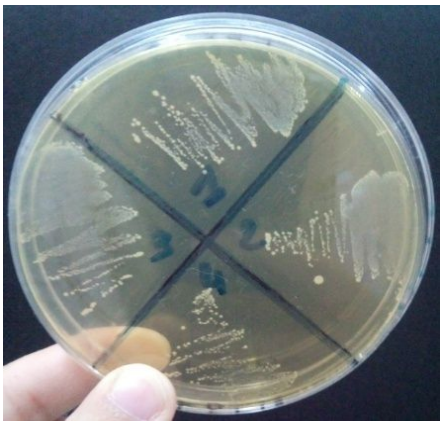


Figure 33 : Aspect morphologique des isolats les plus intéressants.

Une fois prouvée que l'amplification est correcte pour chaque échantillon, par l'éctrophorése, les amplicons de PCR ont été séquencés. Les mêmes amorces utilisées pour la PCR ont été également utilisées pour le séquençage.

Les résultats des chromatogrammes de séquençage ont été analysés avec le programme de bioinformatique Chromas Lite 2.0, qui nous a permis de passer l'information à partir du séquençage de chaque chaine au format FASTA, pour effectuer un alignement avec le programme Clustal X1.81 de chaque échantillon.

Les séquences de chaque échantillon examiné ont été comparées à d'autres souches de référence mises dans la base de données NCBI GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) à l'aide de l'outil BLAST. Ainsi, confirmer son identité, on a comparé le pourcentage maximum d'homologie des espèces avec la GenBank **(Tableau 17, Tableau 18, Tableau 19, Tableau 20)**.

Tableau 17 : Présentation d'un complet génome de la souche sélectionné antagoniste LbL15.

Séquence ID : gi|1112963313|CP018071.1	**% d'homologie**	**Souches**
CCTTAGGCGGCTGGCTCCAAAAAGGTTACCTCACC GACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGG GCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGC GGCGTGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTT CATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAACTGA GAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACT TCGCAACTCGTTGTACTTCCCATTGTAGCACGTGTG TAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGT CATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTCACCGGCAGTCT TGCTAGAGTGCCCAACTGAATGATGGCAACTAACA ATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAAC ATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCA CCTGTCACTTTGCCCCCGAAGGGGAAGCTCTATCTC TAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGT TCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCAC CGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTC AACCTTGCGGTCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTA ATGCGTTAGCTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCCT CCAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTA CCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTC GAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGCCGCC TTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATATCTACGCATTT CACCGCTACACATGGAATTCCACTCTCCTCTTCTGC ACTCAAGTCTCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGT TGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTANNAAACC GCCTGCGCTCGCTTTACGCCCAATAAATCCGGAAC AACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGC CCCGTAGTTAAGCCGTGGTCTTTCTGGTTANNNTAC CGTCCAGGGAAGTAACAGTTGACNNNNCATCCGTG TTTCTTCCCCGAACAACCANNNNTTTNACAAATCCG GAAAACNNTTCTTGCCTTCCGGCCGGCNTTTGCNNN GAGGGAGACTTTTCGGTCCATTTGTCAAAGAAATG TCCTAACTGTNTGGCTGCCGGATAG	99%	*E. faecium*

La Séquence d'ADN, codant la région ARN 16S de la souche LbL15 a montré une similarité de 99% avec *Enterococcus faecium* strain VRE001 (Probiotic).

Tableau 18 : Présentation d'un complet génome de la souche sélectionné antagoniste LbC11.

Séquence ID : gi|1112963313|CP018071.1	**% d'homologie**	**Souches**
CNNNTNNNTNNCACCTTAGGCGGCTGGCTCCAAAAAGG TTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTG TGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCAC CGCGGCGTGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTT CATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAACTGAGAG AAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTCGCAAC TCGTTGTACTTCCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGT CATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCC TCCGGTTTGTCACCGGCAGTCTTGCTAGAGTGCCCAACT GAATGATGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCG GGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACA ACCATGCACCACCTGTCACTTTGCCCCCGAAGGGGAAGC TCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTA AGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCA CCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAAC CTTGCGGTCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTT AGCTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTA GCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAA TCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTT ACAGACCAGAGAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCA TATATCTACGCATTTCACCGCTACACATGGAATTCCACT CTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCCAGTTTCCAATGACCC TCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCATACTTAAAA AAACCGCCTGCNNCTCGCTTTACGCCCAATNAAATCCGG ACAACGCTTGCCCCCCTACGTATTACCCGCGGCTGCTGG CCANTAAGTTAAGCCGNGNCCTTTCTGGTTAAGAATCCG GCCANGGGATGAACAGTTTCCCCCCATCCCTTGTTCTTC CCCTAACAACAGAATTTTTACTAAACCGAAAAACCTTNN TTCCGTACCGGCGGGNNTTGGGTGCGGGGCGGAACTTTA CGTCCATTTGCCAGAAAAATTCCCTANCTGCTTGCCTCC CGTNNNGAGAT	99%	*E. faecium*

La Séquence d'ADN, codant la région ARN 16S de la souche LbL15 a montré une similarité de 99% avec *Enterococcus faecium* strain VRE001 (Probiotic).

Tableau 19 : Présentation d'une séquence partielle d'ADN de la souche productrice de la bactériocine LbC3.

Séquence ID : KP793167.1	**% d'homologie**	**Souches**
TACATTATCTTGTCCACCTTAGACGGCTGACTCC CGAAGGTTATCTCACCGGCTTTGGGTGTTACAAACT CTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGG GAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTA CTAGCGATTCCAACTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCC TACAATCCGAACTGAGAACGGCTTTAAGAGATTAG CTTAGCCTCACGACTTCGCAACTCGTTGTACCGTCC ATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGC ATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTT TGTCACCGGCAGTCTCACCAGAGTGCCCAACTGAA TGCTGGCAACTGATAATAAGGGTTGCGCTCGTTGC GGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGAC GACAACCATGCACCACCTGTCATTCTGTCCCCGAAG GGAACGTCTTATCTCTAAGATTGGCAGAAGATGTC AAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTAGCTTCGAATTA AACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCA ATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCGTACTCCCC AGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTGA AGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCACTCATCGT TTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTC GCTACCCATGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAG ACTAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTTCCAT ATATCTACGCATTCCACCGCTACACATGGAGTTCCA CTGTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCCAGTTTCCGA TGCACTTCTCCGGTTAAGCCGAAAGCTTTCACATCA GACATAAAAAACCGCCTGCGCTCGCTTTTACGCCC AATAAATCCCGACAACGCTTGCCACCTACGTTATTA ACCGCGGGCTGCTGGGCACGTAGATAAGCCGGCGG CTTTCTTGGTTAATTACCCGTCAACCCGTTGAACAG TTACTCCTCAAAGGTGATCTTCTTTGAACAAACAGG AGTTTTTATCTAGCCGAAGAGCCATCCTTCACTTCA CGGCAGGCCAGTGCTCCCATCCAGAACTATCATCC AATCGTGTGAAGGAATATCACTTACTGGCTTGCCCT CCCGTCTCAGGGAAGTAGGGGCCCGT	99%	*L. brevis*

La Séquence d'ADN, codant la région ARN 16S de la souche LbL15 a montré une similarité de 99% avec *Lactobacillus brevis* Lb2H (Probiotic).

Tableau 20 : Présentation d'une séquence partielle d'ADN de la souche sélectionné antagoniste LbL4.

Séquence ID : gi|449084368|KC416999.1	**% d'homologie**	**Souches**
GGCTGACTCCAGAGGTTATCTCACCGGCTTCTGG TGTTACAAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTA CAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGA TCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGTAAGCG AGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAGAATGGCTTT AAGGGATTAGCTTAACCTCCCGAGTTTGCAACCCCT TGTACCCTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTC ATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCCTCCCCACCTT CCTCCGGTTTGTCACCGGCAGTCTCCTTAAAGTGCC CAACTGAATGCTGGCAACTAATAATAAGGGTTGCG CTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACAC GAGCTGACGACGACCATGCACCACCTGTCACTTTGT CCCCGAAAAGAAAAACTTTTCTCCCAAGGGGGCCA AGATGTGGAAAAGCGGGGAAGGGTTTCTCCGATCC TTGAAAATAAACCCATGGTCCCCCCCCTGTGGGGG GCCCCCCCAAATTCTCTTTGATTTTACCCTTGGGGC CCACCCCCCCCGGGGAGAGATTTAAGTCTTTTATGC TGCGATGAAAGGTGCAAAACCCCCCACAACCTTCA CTCCTCTTTTACAGCGTGGA	83%	*L.sakei*

La Séquence d'ADN, codant la région ARN 16S de la souche LbL15 a montré une similarité de 83% avec *Lactobacillus sakei* souche PON10098 (Probiotic).

Conclusion et perspectives

L'un des intérêts de recherche sur les bactéries lactiques est de développer une stratégie permettant de limiter la croissance des germes indésirables, par l'exploitation des potentialités des bactéries lactiques qui sont capables d'assurer une qualité hygiénique et biopréservative désirable inhibant ainsi les germes nuisibles et toxinogénes dans les produits alimentaires. Elles produisent de nombreux métabolites ayant des propriétés antagonistes telles que les bactériocine.

L'objectif de ce présent travail est l'isolement, le criblage et la sélection des bactéries lactiques productrices de bactériocines à partir du lait maternel, ainsi que leurs identifications phénotypique (galerie Api 50CH) et génotypique par l'amplification du fragment d'ADN codant la région de l'ARN 16S.

Les résultats ont abouti à la sélection de 4 souches (LbL15, LbC11, LbL4, LbC3) ayant montré une excellente activité inhibitrice parmi les 28 souches de bactéries lactiques.

Dans le but d'améliorer le processus de production des bactériocines chez les quatre bactéries sélectionnés antagonistes, les paramètres suivants : la performance des souches, le pH de milieu de culture, la température d'incubation et l'action de l'effet d'acide organique et de peroxyde d'hydrogène ont été étudiés.

L'activité antagoniste des quatre bactéries lactiques sélectionnées est mise en évidence vis-à-vis de *S aureus* UT 602, *S.aureus* CECT 86T, *S.aureus* ATCC 25923, *S.aureus* ATCC 43300 et *E. coli* ATCC 25922.

Les résultats obtenus ont montrés que *Staphylococcus aureus* étaient sensibles aux substances produites chez quatre bactéries lactiques. Cependant *Escherichia coli* a manifesté une résistance à l'égard de la souche LbL4. En ayant éliminé les effets inhibiteurs relatives au pH et de H_2O_2, il est révélé que l'agent inhibiteur de *Lactobacillus brevis* (LbC3) a été déterminé comme substance de nature protéique (bactériocine).

De par leur thermorésistante, L'optimisation a permis d'aboutir a une meilleur production de bactériocines et une meilleur efficacité aux conditions de pH 6 et température 30°C.

La cinétique de croissance *d'E.coli* ATCC25922 en présence et en absence de la bactériocine produite par *L.brevis* (LbC3), a montré que la biomasse bactérienne a diminué progressivement après l'ajout des bactériocines.

Les résultats des tests technologiques de cette souche sont satisfaisants pour une utilisation industrielle : possède une activité protéolytique et un bon pouvoir acidifiant.

La sensibilité aux antibiotiques, montre que la souche *L.brevis* (LbC3) est sensible aux antibiotiques suivants : pénicilline, spiramicine, érythromycine, pristinamycine, chloramphénicol. Par contre elle est résistantes aux : Tobramicine, oxacilline, vancomycine, acide nalidixique, nitroxoline.

Le séquencage de l'ARN 16S des souches sélectionnés productrices de substances antagoniste (LbL15, LbC11, LbC3, LbL4) a permis l'identification de leur appartenance aux espèces suivantes : *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus sakei*, avec des degrés d'homologie de (99, 99, 99, 83%).

En perspective, des études approfondies doivent complémenter ce travail tels que :

- Purification de la bactériocine par méthodes chromatographiques telles que HPLC, FPLC.
- Caractérisation des gènes impliqués dans la production de bactériocine.
- Le développement d'un levain spécifique contenant *L.brevis* (LbC3), doté d'un pouvoir biopréservatif permettant d'augmenter la durée de conservation des produits laitiers et d'assurer une qualité sanitaire (permettant de contrôler et de limiter la croissance des germes indésirables).

Achemchem F et Abrini J. 1997. Production de bacteriocines par des bactéries lactiques à partir du jben de chévre du Nord du Maroc. Journal of applied Microbiology. 70 :66-669.

Adams M.R et Hall C.J. 1988. Growth inhibition of food borne pathogens by lactic and aceticacids and their mixtures. Int J Food SciTechnol. 23: 287-292.

Alonso-Calleja C., Capita R., Bernardo A et Garcia-Lopez M.L. 2002. Changes in the microflora of Valdeteja raw goats milk cheese throughout manufacturing and repening. Lebensmittel-Wissenschaft und- Technologie.35: 222-232.

Altena K., Guder A., Cramer C et Bierbaum G. 2000. Biosynthesis of the lantibiotic mersacidin: organization of a type B lantibiotic gene cluster. Appl Environ Microbiol. 66: 2565-2571.5.

Ammor M.S., Florez A.B., Mayo B. 2007. Antibotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. Food Microbiol. 24:559-570.

Ammor S., Tauveron G., Dufour E., et Chevallier I. 2006. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogens bacteria isolated from the same meat small-scale facility. Food Control. 17: 454-468.

Annan Prah A., Agyeman J.A. 1997. Nutrient content and survival of selected pathogenic bacteria in Kenkey used as weaning food in Ghana. Acta Trop. 65:33-42.

Avonts L et De Vuyst L. 2001. Antimicrobial potential of probiotic lactic acid bacteria. Mededelingen (Rijksuniversiteit te Gent. Fakulteit van de Landbouwkundigeen Toegepaste Biologische Wetenschappen)**.** 66 (3b):543-550.

Axelsson B.O., Saraf A., Larsson L. 1995. Determination of ergosterol in organic dust by gas chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr B Biomed Appl. 666(1):77–84.

Axelsson L.T.2004. Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In Lactic acid Bacteria- Microbiology and fuctional aspects. Edited by S.Salminen, A.v. Wright et A.Ouwehand. Marcel, Inc.1-66.

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.

Balows A., Truper H.G., Dworkin M., Harder W. et Schleifer K.H. 1992. The prokaryotes and Ed. Springer verlage, New York. 11.

Barefoot S.F et Klaenhammer T.R.1983. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocins produced by *Lactobacillus acidophillus*. App. Environ. Microbiol. 45:1808-1815.

Barrangou R., Lahtinen S.J., Ibrahim F et Ouwehand A.C. 2012. Genus *Lactibacillus*, Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects, Fourth edition. Taylor et Francis Group.13: 77-91.

Batt C.A. 2000. *Lactococcus* introduction. In Encyclopedia of Foud Microbiology, Eds. Acadimic press, San Diego.1164-1166.

Bauer J.H., Poon P.C., Glatt-Deeley H., Abrams J.M., Helfand S.L. 2005. Neuronal expression of p53 dominant-negative proteins in adult Drosophila melanogaster extends life span. Curr. Biol. 15(22) : 2063--2068.

Benabbou T.A. 2012. Antibiorésistance des bactéries lactiques isolées de produits artisanaux algériens. mémoire de magister. Université d'Oran.

Bendimerad N. 2013. Caractérisation phénotypique technologique et moléculaire d'isolats de bactéries lactiques de lait crus recuillis dans les regions de l'ouest Algérien. Essai de fabrication de fromage frais type (Jben). These de doctorat. Département de biologie, faculté des science. Université Tlemcen.

Benhammadi Triaa. 2009. Les déterminants du choix du mode d'allaitement ; Étude prospective auprès de 111 femmes À la maternité de Max Fourestier de Nanterre. These de Doctorat. Université de Nante.

Benmouna Z. 2012. Bactériocines des bactéries lactiques : étude biochimique et génétique. Thèse de Magister en biotechnologie. Université d'Oran.

Biavati B., Vescovo M., Torriani S., Bottazzi V. 2000. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. Ann. Microbiol. 50: 117-131.

Biswas S.R., Ray P, Johnson M.C et Ray B. 1991. Influ-ence of Growth Conditions on the Production of a Bacteriocin, Pediocin AcH by *Pediococcus acidilactici* H, Ap-plied and Environmental Microbiology. 57(4):1265-1267.

Blom H., Katla T., Holck A., Sletten K., Axelsson L et Holo H. 1999. Characterization, production, and purification of Leucocin H, a Two- Peptide Bacteriocin from *Leuconostoc* MF215B. springer- verlag.Current Microbiology. 39:43-48.

Bloom J.W1., Madanat M.S., Marriott D., Wong T., Chan S.Y. 1997. Intrachain disulfide bond in the core hinge region of human IgG4. Protein Sci. 6 (2) :407-15.

Boumhira A.Z., Mami A., Hamedi A.R., Henni J.E et kihal M. 2011. Identification and characterization of Functional and Technological *Lactobacillus plantarum* Strains Isolated from Raw Goat and camel milk Collected in Algeria.J. Pure. APPL.Microbiol.Vol.5(2): 553-566.

Bourgeois C.M et Larpent J.P., 1996. Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentation alimentaires. Technologie et Documentation, Lavoisier. Paris. 432-704.

Budde B.B., Hornbaek T., Jacobsen T., Barkholt V et Koch A.C. 2003. *Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for use as a protective culture for vacuum-packed meats: culture isolation, bacteriocin identification, and meat application experiment.Int. J. Food Microbiol. 83: 171-184.

Cabrera-Rubio R *et al.* 2012. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. Am J Clin Nutr. 96:544-5.

Cai H., Thompson R.., Budinich M.F., Broadbent J.R et Steele J. 2009. Genome sequence and comparative genome analysis of *Lactobacillus casei*: insights into their niche-associated evolution. Genome boil. Evol. 14:239-57.

Callon C., Millet L., Montel M.C. 2004. Deversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers Cheese. J.Dairy Res. 71(2) : 231-44.

Caplice E., et Fitzgerald G.F. (1999) Food fermentation: Role of microorganisms in food production and preservation. Int. J. Food microbial.50:131-149.

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

Cascales E., Buchanan S. K., Duche D., Kleanthous C., Lloubès R., Postle K., *et al.* 2007. Colicin biology. Microbiol Mol Biol. Rev.71:158–229.

Castellucci F. 2012. Outils de biologie moléculaire pour l'identification des bactéries lactiques du raisin et du vin. Résolution OIV-OENO 409.

Castilo I., Requena T., Fernandez P., Fontecha J et Gobbetti M. 1999. Isolation and caracterisation of an intracellular esterase from *Lactobacillus casei* subsp .*casei*. IFPL731. J.Appl.Microbiol. 8:653-9.

Charteris W.P., Kelly, P.M., Morelli L., Collins J.K. 1998. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. J. Food. Prot. 61:1636-1643.

Chentouf H.F. 2014. Effet des substances antimicrobiennes produites par *Leuconostoc mesenteroides* isolées à partir du lait de chamelle Algérien sur *Listeria* spp. Dans les produits alimentaires.

Chich J.F., Marchesseau K et Grippon J.C. 1997. Intracellular esterase from *Lactococcus lactis* subsp.lactis NCDO 763: purification and characterisation. Int. Dairy J. 7: 169-74.

Cintas L. M., Herranz C., Hernández P. E., Casaus M. P. et Nes L. F. 2001. Review: Bacteriocins of lactic acid bacteria. Food Sci. Tech. Int.7: 281-305.

Cleeveland J., Mantiville T. J., Ness, I. F et Chiknids M. L. 2001. Bacteriocins: safe antimicrobials for food preservation. International Journal of Food Microbiology.71:1-20.

Cogan M.T., Dowd O et Mellerick D. 1981. Effects of pH and sugar on acetoin production from citrate by *Leuconostoc lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 41: 1-8.

Condon S. 1987. Responses of lactic acid bacteria to oxygen.FEMS Microbiol. Rev. 46: 269-280.

Coppola R., Succ M., Tremonte P., Reale A., Salzano G., Sorrentino E. 2005. Antbotic susceptibility of *Lactobacllus rhamonosus* strains from Parmigano Reggiano cheese. Lait. 85: 193-204.

Cotter P. D., Hill C et Ross R. P. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol*. 3: 777-788.

Crittenden R., Bird A.R., Gopal P., Lee Y.K et Playn M.J. 2005. Probiotic research in Australia, New Zealand and the Asia-Pracific region. Curr. Pharm. Design, 11: 37.

Curk D. et Macphail A. 1996. Précision des mesures de vitesse de croissance des streptocoques lactiques dans le lait basées sur la méthode de dénombrement microbien par formation de colonies. Etude de référence avec *Lactococcus lactis*. Lait. 1989. 69 : 433-447.

Dalet K., Briand C., Cenatiempo Y et Héchard Y. 2000. The rpoN gene of *Enterococcus faecalis* directs sensitivity to subclass IIa bacteriocins. Curr Microbiol.41: 441-443.

De Roissart H.B. 1986. Bactéries lactiques. In Laits et produits laitiers: vache, brebis et chévre. Tome 3. Ed. Technique et documentation Lavoisier. Paris: 343-408.

De Vust L., et Vandamme E.J. 1994b. Nisin, a lantibiotic produced bay *Lactococcus lactic* subsp *lactis*. In De Vuyst L et vandamme E.J (Eds), Bacteriocins of lactic acid bacteria : microbiology, genetics and application. London and New York : Blakie. 151-221.

De Vuyst L., Leroy F. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 13(4): 194-199.

Deegan L.H., Cotter P.D., Hill C et Ross P. 2006. Bacteriocins :Biological tools for biopreservation and shelf-life extension. Int Dairy J. 16:1058-1071.

Delves-Broughton J. 1990. Nisin and its uses as a food preservative. Food Technol. 44**:**101-117.

Diep D. B., Skaugen M., Salehian Z., Holo H et Nes I. F. 2007. Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. Proc Natl Acad Sci US A.*104*: 2384-2389.

Dilek Ozgun et Hasibe Cingilli Vural. 2011. Identification of *Lactobacillus* strains isolated from faecal specimens of babies and human milk colostrums by API 50 CHL system. Journal of Medical Genetics and Genomics. 3(3), pp. 46 – 49.

Dobrogosz W.J., Lindgren S.E. 1990. Antagonistique activity of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. FEMS Microbiol Rev. 7(1-7) : 149-63.

Dortu C et Thonart P. 2008. Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intéréts pour la bioconservation des produits alimentaires. Biotechnol. Agron. Soc. Environ., 13(1) : 143-154.

Dortu C et Thonart P. 2009. Les bactériocines des bactéries lactiques : caractérsitiques etinterets pour la bioconservation des produits alimentaires. Biotechnol. Agron. Soc.Environ.13: 143-154.

El soda M., El Wahad H.A., Ezzat N., Desmazeaud M.J et Ismail A. 1986. The esterolytic and lipolytic activities of the lactobacilli 2. Detection of esterase system of *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis* and *Lactobacillus acidophilus*. Le lait 66: 431-43.

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 batchandcoutinuous cultures. Biotechnol. Lett. 20 (10): 913-916.

Fernández L et al. 2013. The human milk microbiota : Origin and potential roles in health and disease. Pharmacological Research 69 :1– 10.

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.

Fox P F. 1989. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. J Dairy Sci 72: 1379-1400.

Gevers D., Huys G., Swing J. 2001. Applicability of rep-PCRfingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. FEMS Microbiol Lett. 205(1) :31-6.

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.

Gillor O., Vriezen J.A., Riley M.A. 2008. The role of SOS boxes in enteric bacteriocin regulation. J of National Institutes of Health. 154(6):1783-92.

Gnoth M.J., Kunz C., Kinne-Saffran E., Rudloff S.2000. Human milk oligosaccharides are minimally digested in vitro. J Nutr. 130: 3014-20.

Guessas B. 2007. Les potentialités métaboliques des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre dans le biocontrole de *Staphylococcus aureus*. Thèse de Doctorat d'état. Université d'Oran. 148.

Guiraud J.P et Galzy P., (1980). L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Les éditions de l'usine nouvelle. 1-239.

Gunther H.L et White H.R. 1961. The cultural and physiological characters of the pediococci. J.Gen .Microbiol. 26: 185-97.

Hadadji M. 2007. Caractérisation technologique des bifidobactériues à intérêt thérapeutique. These de doctorat d'état ; Universitée d'oran .Algérie. 173p.

Hammes W.P et Hertel C. 2006. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. Chap.1.2.10 In prokaryotes. 4:320-403.

Hamosh M. 2000. Bioactive factors in human milk. Pediatr Clin North Am. 48: 69-86.

Harlander S.K., Hoover D.G. 1993. Screening methods for detecting bacteriocin activity. In Bacteriocins of lactic acid bacteria. San Diego: Academic Press.

Heikkila M.P. and Saris P.E.J. 2003. Inhibition of *Staphylococcus* aur*e*us by the commensal bacteria of human milk. Journal of Applied Microbiology. 95: 471-478.

Heleni S., Lefki P., Nikolaos T et Evanthia L.T. 2006. Populations, types and biochemical activities of aerobic bacteria and lactic acid bacteria from the air of cheese factories. Int. J. Dairy Technol. Vol. 59(3) :200-208.

Hirsch A., Grinsted E., Chapman H.R et Mattick A.T.R. 1951. A note on the inhibition of ananaerobic sporeformer in Swiss-type cheese by a nisin producing *Streptococcus*. J. Diary Res18:205-6.

Holzapfel W.H., Haberer P., Geisen R., Björkroth J. et Schillinger U. 2001.Taxonomy andimportant features of probiotic microorganisms in food and nutrition. Am. J. Clin. Nutr.73 (Suppl): 365-373.

Hosono A., Yastuki. Et Tokita F. 1977. Isolation and characteristion of an inhibitory substance against *E.coli* produced by *Lactobacillus acidophilus*. Milchwissenschaft .32:727-730.

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.

Institut des normes cliniques et de laboratoire. 2012. Normes de performance pour les tests de sensibilité aux antimicrobiens : Vingt-deuxième supplément d'information. Document CLSI M100-S22, Institut de normalisation des laboratoires cliniques, Wayne, PA. ISBN 1-56238-785-5, (imprimé) ; ISBN 1-56238-786-3 (électronique).

Ishibashi N et Yamazaki S. 2001. Probiotics and safety. American Journal Clinical Nutrition 73:465-470.

Jacobsen T., Budde B.B et cokh A.G. 2003. Application of *Leuconostoc carnosum* for biopreservation of cooked meat products. J Appl Microbiol. 95:242- 249.

Jara S ., Sáncheza M ., Veraa R ., Cofréa J., Castroa b. E .2011. The inhibitory activity of *Lactobacillus* spp. isolated from breast milk on gastrointestinal pathogenic bacteria of nosocomial origin. Clinical Microbiology. 17,474-477.

Jeurink P.V., Bergenhenegouwen J., Jiménez E., Knippels L.M.J., Fernández L., Garssen J., Knol J., Rodríguez J.M et Martín R. 2013. The bactéria in breast milk Beneficial Microbes. AM J Clin Nutri. 4(1): 17-30.

Jia H.P., Starner T., Ackermann M *et al*.2001. Abundant human β -defensin 1 expression in milk and mammary gland epithelium. J Pediatr. 138 : 109-12.

Jiménese E., Delagdo S., Fernandez L., Garcia N., Albujar M., Gomez A., Rodriguez J.M. 2008. Assessment of the bacterial diversity of human colostrums and screening of staphylococcal and enterococcal population for potential virulence factors. Research in Microbiology. 159: 595-601.

Juarez-Tomas M.S., Bru E., Wiese B., de Ruiz Holgado A.P et Nader-Macias M.E. 2002. Influence of pH, temperature and culture media on the growth and bactériocin production by vaginal *Lactobacillus salivarius* CRL 1328. J.Appl.Microbiol. 93:714-724.0

Juillard V., Spinnler M., Desmazeaud M.J. et Bouquien C.Y. 1987. Phénomene de coopération et d'inhibition entre les bactéries lactiques utilisées en industrie laitiére. Lait 67 :149- 172.

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.

Karam N.B., et Karam H. 1994. Isolement et caractérisation de bactéries lactiques de lait cru d'Algerie. In alimentation, Génitique et Santé de L'enfant. Ed.Desjeux JF et Touhami M., l'Harmattan.

Karam N.F., Dellali A et Karam Z.H., 2012. Activité lipolytique chez les bactéries lactiques. Renc. Rech. Ruminants, 19.

Kim. 2014. The genus *Lactococcus*, Lactic acid bacteria. Biodeversity and taxonomy. John Wiley et Sons Ltd. 430-443.

Klaenhammer T.R. 2000. Probiotic bacteria: Today and tomorrow. J Nutr .130: 415-416.

Klaenhammer TR. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev.12:39-85.

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

Kleerebezem M et Vaughan E.E. 2009. Probiotic and gut lactobacilli and bifidobactéria: Molecular approaches to study diversity and activity. Annu. Rev Microbiol. 63: 269-290.

Kouadri Boudjelthia Nacima. 2014. Elaboration de la flore du microbiote digetif de vollaille et identification de souches de lactobacilles par l'ADNr 16S. These de magister en biologie. Université d'Oran.

Kozak K., Charbonneau D., Sanozky-Dawes R et Klaenhammer T. 2015. Characterization bacterial isolates from the microbiota of mother's breast milk and their infants. Gut microbes. 6(6) :341-351.

Krier F., Revol-Junelles A.M. 1998. GermainInfluence of temperature and pH on production of two bacteriocins by *leuconostoc mesenteroides* subsp. *Mesenteroides* FR52 Dring batch fermentation. Appl.Microbiol Biotechnol. 50 :359-363.

Kubota H., Tsuji K., Matsuda K., Kurakawa T., Asahara T et Nojimoto K. 2010. Detection of human intestinal catalase negative Gram positif cocci by rRNA-targeted reverse transcription-PCR. Appl. Environ. Microbiol. 76: 5440-5451.

Kumar Tiwaria et Srivastavaa S. 2008. Statistical Optimisation of Culture Components for Enhanced Bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* LR/ 14. Food Biotechnology. 22: 64-77.

Kunz C, Rudloff S, Baier W *et al*. 2000. Oligosaccharides in human milk : structural, functionnal and metabolic aspects. Ann Rev Nutr. 20 : 699-722**.**

Labioui H., El Moualdi L., El Yachchioui M., Ouhssine M. 2005. Selection de souche de bactéries lactiques antibactériennes. Bull.Soc. Bordeaux. 144:237-250.

Lawrence R.A., Lawrence R.M. 1999. Breastfeeding. A guide for the medical profession. St. Louis, Mi:Mosby. 966 p.

Lim S.M. 2010. Cultural condition and nutritional components affecting the growth and bacteriocin production of *Lactobacillus plantarum* KC21. Foud Sci. Biotechnol. 19: 793-802.

Liu S. 2003. Practical implication of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bactéria in food and beverage fermentations. International Journal of food Microbiology. 83(2): 115-131.

Ludwig D.S., Kabat Zinn J. 2008. Mindfulness in medicine. Jama. 300: 11-1350.

Maldonado A., Ruiz-Barba J.L et Jiménez-Diaz R. 2003. Purification and Genetic Characterization of Plantaricin NC8, a Novel Coculture-Inducible Two-Peptide Bacteriocin from *Lacctobacillus plantarum* NC8.Appl.Environ.Microbiol. 69(1):383-389.

Mannu L., Comunian R et Scintu M.F. 2000. Mesophilic lactobacilli in flore sardo cheese: PCR-identification and evolution during cheese ripening. International Dairy journal.10 :383-389.

Maragkoudakis P.A., Zoumpopoulou G., Miaris C., Kalantzopoulos G., Pot B., Tsakalidou E. 2006. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. Int Dairy J. 16 (3): 189-199.

Martin R *et a*l. 2004. The commencal micloflora of human milk : new prespectives for food bacteriotherapy and probiotics. Trends Food Sci Tech.5 :121-27.

Martin R.S., Langa S., Reviriego C., Jiminez E., Marin M.L., Xaus J., Fernandez L et Rodriguez J.M. 2003. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. Journal of Pediatrics. 143: 754-758.

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

Matar C., Valdez M., Medina M., Rachid M and Perdigon G. 2001. Immunomodulating effects of milks fermented by *Lactobacillus helveticus* and its non proteolytic variant. J. Dairy Res. 68 (4):601-609.

Mataragas M., Metaxopoulos J., Galiotou M et Drosinos E.H. 2003. Influence of pH and temperature on bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *L.curvatus* L442.Meat SCi., 64:265-271.

Mattarelli Paola et Biavati Bruno. 2014. The genera *Bifidobacterium*, *Parascardovia* and *Scardovia*. Lactic acid bacteria, Biodiversity and taxonomy. John Wiley et Sons, LTd: 509-541. UK.

Mc Auliffe O., Ross R.P et Hill C. 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. FEMS Microbial. Rev. 25: 285-308.

Messens W., Verluyten J., Leroy F et De Vuyst L. 2003. Modelling growth and bactériocin production by *Lactobacillus curvatus* LTH1174 in response to temperature and pH value used for European sausage fermentation process.Int. J. Food Microbiol. 81: 41-52.

Morino I., Lerayer A.L.S et de Freitas Leitao M.F. 1999. Detection and characterization of bacteriocin-producing *Lactococcus Lactis* strains.Rev. Microbiol.30:2-19.

Nielsen M., Lundegaard C., Worning P., Lauemøller S.L., Lamberth K., Buus S., Brunak S., Lund O. 2003. Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations. Protein Sci 12: 1007–1017.

O'Sulvan L., Ross R.P et Hill C. 2003. Potential of bacteriocin- producing lactic acid bactéria for improvements in food safety and quality. Biochimie. 84: 593-604.

Orla Jenson . 1919. The lactiqueAcide Bacteria .Fred Host and Son , Copenhagen

Owen C.G., Whincup P.H., Odoki K et al. 2002. Infant feeding and blood cholesterol : a study in adolescents and a systematic review. Pediatrics. 110: 597-608.

Paik Y.K., Sung K.C., Choi Y. 1997. Continuing studies on chromosomal polymorphism in a Korean natural population of Drosophila melanogaster. Genetica. 101(3): 191--198.

Papagianni M., 2003. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function and applications. Biotechnol. Adv.21(6), 465-499.

Papamaloni E., Tzanetakis N et Kotzekidou P. 2003. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotique properties. Meat science. 65:859-867.

Parente E., Brienza C., Ricciardi A et Addario G. 1997. Growth and bacteriocin production by *Enterococcus faecium* DPC1146 in batch and continuous culture. *J Ind Microbiol Biotechnol*.***18***: 62-67.

Parente E., Ricciardi A et Addario G. 1994. Influence of pH on growth and bacteriocin production by *Lactococcus lactis* subsp.actis140NWC during batch fermentation. Appl Microbiol Biotechnol. 41: 388-394.

Parente E et Ricciardi A. 1999. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol**.** 52 :628-638.

Perez P.F *et al*. 2007. Bacterial imprinting of the neonatal immune system : lessons from maternal cells ? Pediatrics. 119 : 724-732.

Pfeiler E.A., Klaenhammer T.R. 2009. The genomics of lactic acid bacteria. Trends Microbiol. 15(12) : 546-53.

Prescott M., Nowakowski S., Gavin P., Nagley P., Whisstock J.C., Devenish R.J. 2003. Subunit gamma-green fluorescent protein fusions are functionally incorporated into mitochondrial F1F0-ATP synthase, arguing against a rigid cap structure at the top of F1. J Biol Chem. 278(1) :251-6.

Rauch P.J.G., Beerthuyzen M.M. et de Vos W.M. 1994. Distribution and evolution of nisinsucrose elements in *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 60: 1798-1804.

Richard, M., Grawe, F., Knust, E. 2006. DPATJ plays a role in retinal morphogenesis and protects against light-dependent degeneration of photoreceptor cells in the Drosophila eye. Dev. Dyn. 235(4): 895--907.

Ricour C., Ghisolf J., Putet G., Goulet O. 1993. Lamaturation protein-énergétique dans les pays en voie de développement. (ed.). Paris : éditions Maloine. 973-400.

Rodriguez J.M., Martinez M.I et Kok J. 2002. Pediocin Pa-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria.Crit. Rev.Food Sci.Nutr.42:91-121.

Rojo-Bezares B., Saenz B., Poeta Y., *et al*. 2006. Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolated from wine. Int J Food Microbiol. 111(3) :234-240.

Rotten D. 1991. Physiologie de la grossesse. 2ème éd. Paris : Masson.

Roux V et Rolain J.M. 2014. Identification des bactéries par biologie moléculaire. Journal maladies infectieuses. 13 : 25999-5.

Saavedra L. 2001. Clinical applications of probiotic agents. American Journal of Clinical Nutrition 73, 1147S– 1151S.

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 chévre des regions arides. J. Alg. Reg. Arides. 1 :1-11.

Saidi Nourdine. 1997. Caractérisation des bactéries lactiques isolées du lait cru de chévre des régions arides d'algérie. Thése de Magister.Université d'oran.

Schaafsma H. 1996. Reflections of a visiting co-op practitioner, Journal of Cooperative Education 31(2-3) :83-100.

Schilling U et Luckek 1989. Antimicrobial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Appl. Environ Microbiol. 55: 1901-1906.

Schillinger U., Geisen R. et Holzapfel W.H. 1996. Potential of antagonistic microorganismsand bacteriocins for the biological preservation of foods. Trends Food Sci. Technol. 7: 158-64.

Schillinger U.1., Lücke F.K. 1989. Antibacterial activity of lactobacillus sake isolated from meat. Appl Environ Microbiol. 55(8) : 1901-6.

Séchet R., David O., Quintin P. 2000. « Les familles monoparentales et la pauvreté », La Documentation française, Les Travaux de l'Observatoire national de la pauvreté et de l'exclusion. 247-290.

Skinner G.E., Solomon H.M and Fingerhut G.A. 1999. Prevention of *Clostriduim botilinum* type A, Proteolytic B and E toxin formation in refrigerated Peasoup by *Lactobacillus plantarum*, ATCC 8014. J. Foud Sci. 64 (4): 724-727.

Smaoui S. 2010. Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de doctorat de l'université de toulouse.

Sneath P.H.A. 2001. The Archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria Bacterial Nomenclature. In Bergey's manual of systematic bacteriology. Garrity G.M., Boone D.R., Castenholz R.W. 2e Ed. 721, 83 - 88.

Stiles M. E., and W. H. Holzapfel. 1996. Lactic acid bactéria of fouds and their current taxonomy. Int j foudMicrobiol .36 (1) :1-29.

Strus M., Gosiewski T., Kochan P et Heczko P.B. 2006. The in vitro effect of hydrogen peroxide on vaginal microbial communities. FEMS Immunology Medical and Microbiology. 48:56-63.

Svec P., Franz Charle M.A.P. 2014. The genus *Enterococcus*. Biodeversity and taxonomy. 340-346.

Tagg J.R, Dajani A.S and Wannamaker L.W. 1976. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria, Bacteriological Re-views. 40: (3)722-756.

Tamine A.Y., Marchall V.M.E. et Robinson R.K. 1995. Microbiological and technological aspect milks fermented by bifidobactéries. J.Dairy Res., 62:151-187.

Thomas T.O., Pritchard G.G. 1987. Proteolytic enzymes of dairy starter cultures. FEMS Micro-biol Rev. 46:245-268.

Todorov S.D., Nyati H., Meincken M et Dicks L.M.T. 2007. Partial characterisation of bacteriocin AMA-K, produced by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolated from naturaly fermented milk from Zimbabwe. Elsevier. Food Control. 18:656-664.

Todorov S.V., et Diks L.M.T. 2005. Production of bacteriocin ST33LD, produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. Mesenteroides, asrecorded in the presence of defferent medium components. World J.Microbiol. Biotechnol. 21 : 1585-1590.

Tou E.H., Guyot J.K., Mouquet R.C., Rochette I., Counil E., Traore A.S., Treche S., 2006. Study through surveys and fermentation kinetics of the traditional processing of pearl millet (Pennisetum glaucum) into ben-saalga, a fermented gruel from Burkina Faso. Int. J. Food Microbiol. 106 .: 52-60.

Vandamme P., Pot B., Gillis M., DeVos P., Kersters K et Swings J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiol. Rev. 60: 407.

Verluyten J., Leroy F. et De Vuyst L., 2004. Influence of complex nutrient source on growth of and curvacin A production by sausage isolated *L. curvatus* LTH 1174. *Appl. Environ. Microbiol*., 70, 5081-5088.

Vermeiren L., Devlieghere F et Debevere J. 2004. Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. Int. J. Food Microbiol. 96: 149-164.

Vilian A.C. 2010. Qu'est-ce que le lait ?, Revue françaises d'allergologie. 50 :124-127.

Vollenweider L., Zarazaga M., Saenz J., Ruiz-Larrea F et Torres C. 2000. Bacteriocin production by lactic acid isolated from rioja red wines. J. Appl. Microbiol. 21 :305-314.

Vuillemard J.C., 1986. Microbiologie des aliments. Evolution de l'activité protéolytique des bactéries lactiques. Technology et Documentation, Lavoisier. Paris. 3 : 1-65.

Whiley R.A et Hardie J.M. 2009. Genus *Streptococcus* Rosenbach 1884, 22AL. In: De Vos, P; Garrity G., Jones D *et al* .(eds), Bergey's Manual of Systimatic Bacteriology, 2 nd edn, Vol3. New York: Springer.655-711.

Wiedemann I., Breukink E., van Kraaij C., Kuipers O. P., Bierbaum G., de Kruijff, B etSahl H. G. 2001.Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid IIcombines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibioticactivity. *J Biol Chem*.***276***: 1772-1779.

Wright V.A. 2012. Genus *Lactococcus*, Lactic acid bacteria microbiological and functional aspects, Fourth edition. Taylor et Franci Group. 1: 63-73.

Yang J., Cao Y., et Terada. 2010. Natural populations of lactic acid bacteria isolated from vegetable residues and silage fermentation. J. Dairy Sci. 93 (7): 3136-3145.

Zadi H. 1998. Bactéries lactiques isolées de lait de Camelus dromedaruis : étude microbiologique et biochimique, caractéristiques technologiques, élaboration de ferments lactiques mésophiles et fabrication de fromages. Thése de Doctorat d'etat. Université de Constantine, Algérie.205.

Zalan Z., Barath A et Halasz A. 2005. Influence of growth medium on hydrogen peroxide and bacteriocin production of *Lactobacillus* strains. Food Technol. Biotech. 43(3): 219- 225.

Annexe 1 : Composition de milieu de culture et tampon

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
Kh2po4	2	g
Mgso4	0,25	g
Mnso4	0,05	g
Agar-agar	15	g
Cystéine-Hcl	0,5	g
Eau distillée	1000	ml

PH=6,8
Autoclavage : 120°C pendant 20 minutes

Milieu M17 (terzaghi et sandine, 1975)

Peptone de caséine	10	g
Peotone pepsique de viande	2,5	g
Peptone papaine de soja	5	g
Extrais de levure	2,5	g
Extrais de viande	5	g
B-glycérophosphate	19	g
MgSO4	0,25	g
Lactose	5	g
Acide ascorbique	0,5	g
Agar-agar	20	g
Eau distillée	1000	ml

pH=7.2
Autoclavage :120°C pendant 20 minutes

Milieu Mueller Hinton (Muller et Hinton, 1941)

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

pH=7,4

Milieu PCA

Peptone	5	g
Extrait de levures	2,5	g
Glucose	1	g
Agar-agar	15	g

pH=7,2

Milieu MRS tamponné (de Man Rogosa et Sharp, 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
Kh2po4	13,697	g
MgSo4	0,25	g
MnSo4	0,05	g
Na2HPO4	17,814	g
Agar-agar	15	g
Eau distillée	1000	ml

PH=7

Autoclavage : 120°C pendant 20 minutes

Tampon TBE (pH8)

Tris-Hcl	30	mM
Acide Borique	89	mM
EDTA	2	mM

Tampon TES

Sucrose	6,5	%
Trice Hcl	50	mM
EDTA	1	mM

Tampon STET

Sucrose	8	%
TritonX-100	5	%
Trice Hcl	50	mM
EDTA	50	mM

Annexe 2 : Antibiotique utilisée

Famille	Antibiotique	Sigle	Charge du disque/µg
Beta lactamine	pénicilline	P	6
	oxaciline	OX	5
Macrolide	érythromycine	E	15
	spiramycine	SP	100
Streptogramines	pristinamycine	PT	15
Phénicolés	chloramphénicol	C	30
Oxyquinoléines	nitroxoline	NI	5
Quinolones	acide nalidixique	AN	30
Glycopeptides	vancomycine	V	30
Aminosides	tobramycine	Tob	10

Annexe 3 : Questionnaire

Nom : Prénom :		
Age :		
Adresse :		
Niveau d'étude	Primaire	
	Moyenne	
	Secondaire	
	Universitaire	
	Autres	
Profession :		
Combien d'enfant avez-vous à part le bébé ?		
Avez-vous déjà allaité (oui/non) ?		
Combien de temps compter vous allaiter		
Avez-vous eu des difficultés à l'allaitement (Oui/Non) ?		
Mode d'accouchement	Voie basse :	
	Césarienne :	
Date de naissance du bébé		
Fille- Garçons ?		
Poid du bébé :		
Allaitez-vous ce bébé (oui/non) ?		
Le type de lait maternel a prélevé	Colostrum	
	Lait de transition	
	Lait mature	
Le jour de prélèvement du lait maternel		
Le nombre de prélèvement		