

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE

SCIENTIFIQUE



CENTRE UNIVERSITAIRE SALHI AHMED -NAAMA-



Institut des Sciences et Technologies

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du Diplôme de

Master Académique en Sciences Biologiques

Spécialité « Microbiologie Appliquée »

Thème

Essai de mise en évidence des bactériocines isolées à partir de produits terroir de la wilaya de Naâma - cas de la Klila et du Jben

Présenté par :

M^{elle} DIFALLAH Soumia

M^{elle} KHIRI Zahia

Soutenu le 13/09/2020 devant le jury :

M^r . GHERIB Mohamed

Maitre de conférences (A)

Président

M^r . AMROUCHE Abdel-ilah

Professeur

Encadreur

M^{me} . LAGHA Nouria

Maitre de conférences (A)

Examinatrice

Année Universitaire : 2019-2020

Remerciements

Avant tout propos, nos remerciements infinis sont adressés à Dieu le tout puissant et miséricordieux de nous 'avoir donné la force et le courage de mener ce travail à terme.

A notre promoteur : Mr Amrouche Abdelilah., Professeur au CUN, qui a dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, pour ça bien vaillance, son aide moral et sa disponibilité pendant toute la période de travail. Nos profondes reconnaissances pour vos encouragements votre patience et vos conseils.

A Mr Gherib Mohamed., Maître de conférences (A) au CUN, pour nous' avoir fait l'honneur de présider le jury, qu'il trouve ici l'expression de nos respectueuses reconnaissances.

Nous' adressons également nos remerciements à Mme Lagha Nouria., Maître de conférences (A) au CUN, pour nous' avoir fait l'honneur de juger notre travail.

Merci pour toute aide, des ingénieurs de laboratoire de microbiologie de CUN.

Dédicaces

Je dédie ce travail,

A ma mère et mon père

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être, que Dieu les garde pour nous.

A mes chères sœurs et mes chers frères, sans vos encouragements ce travail n'aurait vu le jour.

A tous la famille DIFALLAH et la famille BOUKHALKHAL.

A mon binôme et chère amie ZAHIA

A mes chers amis

Et enfin à toutes les personnes qui comptent pour moi, intervenues dans ma vie à un moment ou à un autre et qui m'ont accompagné durant toutes mes études. Et tous ceux qui, par un mot m'ont donné la force de continuer.

Je dédie ce travail pour vous en espérant la réussite et le succès...Soumia

Dédicaces

Je dédie ce travail aux personnes les plus chers à mon cœur :

Ceux qui ont toujours été à mes côtés A Mes chers parents...

Qui m'ont toujours soutenu et cru en moi,

Maman, Papa que Dieu vous préserve ;

A mon frère et mes sœurs pour votre soutien et encouragements,

Vous occupez une place particulière dans mon cœur.

*Je vous dédie ce travail en vous souhaitant un avenir radieux, plein de
bonheur et de succès.*

A ma grand-mère, ceci est ma profonde gratitude pour ton éternel amour,

Que ce travail soit le meilleur cadeau que je puisse t'offrir.

*A mon binôme et ma très cher amie **SOUMIA** pour le travail que nous
avons fourni.*

A tout le membre de ma famille.

A tous ceux que j'aime et ceux qui m'aiment...Zahia

Abstract

Bacteriocins are antimicrobial peptides produced by bacteria naturally immunized against their own bacteriocins. The present contribution is an endeavour to the isolation of bacteriocins from local products characteristic of the region of Naama- Case of Klila and Jben.

To achieve this, an isolation and identification of enterococci; with antimicrobial effect; isolated from two artisanal cheeses made from ewe's milk, were carried out to prove the bacteriocinogenic capacity of these enterococci. Subsequently, a purification process was applied to the pure cultures in order to isolate bacteriocins.

In the third part of the manuscript, different conventional and alternative purification processes were presented; where ATPS seems to be the most promising alternative primary purification method. Also, a new scientific approach was presented to overcome the limitations of the use of bacteriocins in the food industry which is Bacteriocin-nanoconjugates.

In conclusion, suitable methods are crucial for the discovery of new bacteriocins. The selection of a method depends on the research objective and must take into consideration whether the presence of a bacteriocin has been confirmed, the quantity and characteristics of the bioactive substance, sensitivity requirements, and cost.

Keywords: Klila, Jben, Ewe's milk, Enterococci, Bactériocins.

ملخص

البكتريوسينات هي ببتيدات مضادة للميكروبات تنتجها بكتيريا محصنة بشكل طبيعي ضد البكتريوسينات الخاصة بها. تعتبر هذه الدراسة محاولة لعزل البكتريوسينات من المنتجات المحلية المميزة لمنطقة النعامة من نوع كليلا وجين.

لتحقيق ذلك، تم عزل وتحديد سلالات المكورات المعوية ذات تأثير مضاد للميكروبات معزولة من نوعين من الاجبان المحلية المصنوعة من حليب الأغنام، لإثبات قدرتها على إنتاج البكتريوسينات. ومنه تم تطبيق عملية التنقية على مستعمرات نقية من أجل عزل البكتريوسينات.

في المرحلة الثالثة من العمل، تم تقديم مختلف عمليات التنقية التقليدية والبديلة؛ حيث يبدو أن ATPS من أكثر طرق التنقية الأولية البديلة الواعدة. كما تم أيضا تقديم نهج علمي جديد للتغلب على قيود استخدام البكتريوسينات في صناعة المواد الغذائية وهو nanoconjugaison des bactériocines .

في الأخير، نستنتج أن الطرق المناسبة ضرورية لاكتشاف البكتريوسينات الجديدة. حيث يعتمد اختيار الطريقة على الهدف من البحث ويجب أيضا الأخذ بعين الاعتبار ما إذا كان قد تم تأكيد وجود البكتريوسين، كمية وخصائص المادة النشطة بيولوجيا، متطلبات الحساسية والتكلفة.

الكلمات المفتاحية: كليلا، جين، حليب الأغنام، المكورات المعوية، بكتريوسينات.

Résumé

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens produits par des bactéries naturellement immunisées contre leurs propres bactériocines. La présente contribution est un essai d'isolement des bactériocines à partir de produits de terroir caractéristique de la région de Naama- Cas de Klila et Jben.

Pour y parvenir, un isolement et une identification des entérocoques ; ayant un pouvoir antimicrobien ; isolée à partir des deux fromages artisanaux issus de lait de brebis, ont été mené pour prouver la capacité bactériocinogènes de ces entérocoques. Ensuite, un processus de purification a été appliqué sur les cultures pure afin d'isolé des bactériocines.

Dans la troisième partie du manuscrit, on a présenté les différents processus de purification conventionnelles et alternatives ; là o où l'ATPS semble être la méthode alternative de purification primaire la plus prometteuses. Également, on a présenté une nouvelle approche scientifique pour surmonter les limites d'utilisation des bactériocines dans l'industrie alimentaire qu'est la nanoconjugaison des bactériocines.

En conclusion, des méthodes appropriées sont cruciales pour la découverte de nouvelles bactériocines. Le choix d'une méthode dépend de l'objectif de la recherche et on doit prendre en considération aussi si la présence d'une bactériocine a été confirmée, la quantité et les caractéristiques de la substance bioactive, les exigences de sensibilité et le coût.

Mots clés : Klila, Jben, Lait de brebis, Entérocoques, Bactériocines.

Liste des abréviations

ADNr	Acide Désoxyribonucléique ribosomique
AMP	Antimicrobial peptide
API	Analytical Index Profil
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
ATPs	Aqueous two-phase system
BLIS	Bacteriocin-like inhibitory substance
CATC	Citrate Azide Tween Carbonate Agar
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholine
DMPE	Dimyristoylphosphoethanolamine
DMPG	Dimyristoylphosphatidylglycerol
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholine
EDTA	Éthylènediaminetétraacétique
G+C	Ratio guanine + cytosine
GFC	Chromatographie par Filtration dur Gel
GRAS	Generally Recognized As Safe
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IEC	Chromatographie d'échange d'ions
LAB	Lactique Acide Bactérie
LC-ESI-MS	Liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry
MALDI-TOF-MS	Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry
Man-PTS	Mannose phosphotransférase
MDR	Multidrug resistance
NCBI	National Center for Biotechnology Information
RIPPS	Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides
RP-HPLC	Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography
SDS-PAGE	Électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium
Transporteurs	Transporteurs à ATP Binding Cassette
ABC	
TRCDA	Diacetylene monomer 10,12-tricosadiy noic acid
US-FDA	Food and Drug Administration des États-Unis

Liste des figures

N°	Titre	Page
Figure 1	Photos de bactéries lactiques Observées au Microscope électronique [MET] :(a) forme Cocci, (b) forme bacille des bactéries lactiques [MEB]:(c) <i>Streptococcus thermophilus</i> . (d) <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus</i> .	6
Figure 2	Arbre consensus, basé sur l'analyse comparative des séquences ARNr, montrant les principaux groupes phylogénétiques de bactéries lactiques à faible % G+C et les genres Gram positifs non reliés <i>Bifidobacterium</i> et <i>Propionibacterium</i>	8
Figure 3	Régulation de la production, modifications post-traductionnelles et auto-immunité de la nisine	19
Figure 4	Organisation des déterminants génétiques impliqués dans la synthèse des bactériocines	20
Figure 5	Mécanisme d'action des bactériocines de classe I	22
Figure 6	Modèle de mécanisme d'action des bactériocines ciblant Man-PTS	23
Figure 7	Distribution centésimale moyenne des différents cheptels recensés dans la wilaya de Naama en 2019 selon DSA de Naama	29
Figure 8	Répartition du cheptel ovin par commune recensés en 2019 selon DSA de Naama	30
Figure 9	Photo de Chekoua	31
Figure 10	Photo du Klila, Produit laitiers traditionnel	32
Figure 11	Diagramme de fabrication artisanal du Klila	33
Figure 12	Photo du Jben, Produit laitiers traditionnel	34
Figure 13	Photo de 'El Hakka' (la présure)	35
Figure 14	Diagramme de fabrication artisanal du Jben	35
Figure 15	Diagramme schématique du processus possibles de purification des bactériocines	57
Figure 16	Diagramme schématique de la purification BLIS via ATPS	59
Figure 17	Différents types de liposomes et nanoliposomes en fonction de leur nombre de bicouches, de vésicules internalisées et de leurs taille	66

Figure 18	Représentation schématique de la synthèse des bactériocines encapsulées par des nanoliposomes :(a). Représentation schématique de l'encapsulation des bactériocines dans les nanoliposomes (b). Représentation schématique de la méthode d'hydratation en couches minces	67
Figure 19	Représentation schématique de la synthèse des bactériocines encapsulées par des nanoparticules de chitosane : (a). Représentation schématique des bactériocines encapsulées dans des nanoparticules de chitosane. (b). Représentation schématique de la méthode de gélification ionique	68
Figure 20	Représentation schématique de la synthèse verte de bactériocine coiffées de nanoparticules d'argent	70

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
Tableau 1	LAB bactériocines et leurs espèces productrices signalées	17
Tableau 2	Répartition des échantillons au cours du temps	37
Tableau 3	Principales méthodes de purification utilisées pour la découverte de bactériocines au cours des 6 dernières années	53
Tableau 4	Efficacité de la bactériocine dans les aliments : facteurs limitants	61
Tableau 5	Mécanisme de développement de la résistance des bactéries aux différentes AMP	64

Sommaire	
Remerciements	i
Dédicaces	ii
Abstract	iv
ملخص	v
Résumé	vi
Liste des abréviations	vii
Liste des figures	viii
Liste des tableaux	x
Sommaire	xi
Introduction Générale	1
Partie I : Synthèse bibliographique	
	3
Chapitre I : Bactéries lactiques	
	4
1. Historique des bactéries lactiques	5
2. Définition et caractéristiques des bactéries lactiques	5
3. Identification des bactéries lactiques	5
3.1. Caractères morphologiques	5
3.2. Caractères physiologiques et biochimiques	6
3.3. Caractères immunologiques	7
4. Taxonomie et classification des bactéries lactiques	7
5. Intérêts technologiques des bactéries lactiques	9
5.1. Application industrielle des bactéries lactiques	9
5.2. Activité acidifiante	9
5.3. Pouvoir lipolytique	9
5.4. Activité protéolytique	10
5.5. Activité aromatisante	10
5.6. Activité antimicrobienne	10
Chapitre II : Activité antimicrobiennes Des bactéries lactiques	
	11
1. Phénomène d'antagonisme	12
2. Production de métabolites inhibiteurs	12

2.1. Acides organiques	12
2.2. Peroxyde d'hydrogène	12
2.3. Dioxyde de carbone	13
2.4. Diacétyl	13
2.5. Reutérine	13
2.6. Bactériocine	13
2.6.1. Classification des Bactériocines	14
2.6.2. Biosynthèse des bactériocines et régulation	16
2.6.3. Immunité	21
2.6.4. Mode d'action	21
2.6.4.1. Bactériocines de classe I (lantibiotiques)	21
2.6.4.2. Bactériocines de classe II (non lantibiotiques)	22
2.6.5. Spectre d'activité	23
2.6.6. Facteurs influençant la production	24
2.6.6.1. Souche bactérienne	24
2.6.6.2. Température et pH	24
2.6.6.3. Composition du milieu de culture	25
2.6.7. Applications des bactériocines	25
2.6.7.1. Application des bactériocines dans le secteur alimentaire	25
2.6.7.2. Applications des bactériocines dans le secteur médical	26
Chapitre III : Produits terroir de la wilaya de Naama	
1. Présentation de la wilaya de Naama	29
2. Produits laitiers de la wilaya	30
2.1. Laits fermentés	30
2.1.1. Rayeb	30
2.1.2. Lben	31
2.2. Dérivé laitiers traditionnels	31
2.2.1. Zebda	31
2.2.2. Smen	32
2.3. Fromage artisanale	32
2.3.1. Klila	32

2.3.2. Jben	34
Partie II : Matériel et méthodes	36
1. Echantillonnage	37
A. Etude microbiologique du Klila et Jben	38
1. Préparation des dilutions décimales	38
2. Dénombrement de la flore aérobie mésophile totale à 30 °C (FAMT)	38
3. Dénombrement des coliformes totaux et coliformes thermotolérants	39
4. Dénombrement des Streptocoques du groupe D	39
5. Recherche des Salmonelles	40
6. Recherche des Staphylocoques	40
7. Recherche des anaérobies sulfito-réducteurs	41
8. Dénombrement des moisissures et levures	41
B. Recherche et identification des bactéries productrices des bactériocines	42
1. Isolements des entérocoques	42
2. Purification des isolats	42
3. Conservation des souches	42
3.1. Conservation à court terme	42
3.2. Conservation à long terme	43
4. Identifications bactériennes	43
4.1. Identification phénotypique des isolats	43
4.2. Identification physiologique des isolats	43
4.2.1. Croissance à différentes températures	43
4.2.2. Croissance dans des conditions hostiles	43
4.2.3. Recherche de type fermentaire	43
4.3. Identification biochimique des isolats	44
4.3.1. Recherche de la catalase	44
4.3.2. Mannitol mobilité	44
4.3.3. Hydrolyse de l'esculine	44
4.3.4. Utilisation du Citrate	44
4.3.5. Tolérance au tellurite	45
4.3.6. Test d'hémolyse	45

4.3.7. Identification des isolats par la galerie API 20 STREP (Biomerieux)	45
5. Détection des bactéries potentiellement bactériocinogène	45
5.1. Méthode de disque	46
5.2. Méthode de diffusion par puits	46
C. Purification des bactériocines	47
1. Détection de l'activité bactériocinogène	47
1.1. Précipitation au sulfate d'ammonium	47
1.2. Test de l'activité bactériocinogène	47
Partie III : Nouvelles méthodes de détection des bactériocines :	48
Review bibliographique	
1. Criblage	49
1.1. Source de bactériocines	49
1.2. Méthodes typiques de criblage	49
1.3. Méthodes efficaces de criblage	50
2. Identification	51
3. Purification	52
3.1. Méthodes typiques de purification	56
3.2. Méthodes efficaces de purification	58
4. Caractérisation	59
5. Bactériocine-nanoconjugués	62
5.1. Bactériocine	62
5.1.1 Mécanisme d'action et le développement de la résistance	63
5.2. Interaction des bactériocines avec des nanoparticules pour une augmentation de l'efficacité antimicrobienne	65
5.2.1. Encapsulation des bactériocines dans des nanoliposomes	65
5.2.2. Conjugaison avec des nanoparticules de chitosane	67
5.2.3. Interaction des bactériocines avec des nanoparticules métalliques	69
Conclusion Générale	71
Références bibliographiques	74
Annexes	

Introduction Générale

Les produits alimentaires les plus anciennement connus par l'homme étaient le fromage, le pain et la bière. Ce sont des modèles de transformation résultant à la fois d'activités fermentaires et enzymatiques. Les aliments traditionnels font partie du patrimoine de chaque peuple (**Fox, 2011**).

Depuis des siècles, dans les villages les plus reculés du milieu rural, les éleveurs produisent du lait en abondance pendant les périodes de haute lactation. Faute de moyens de conservation, ils se trouvent parfois obligés de jeter l'excès du lait (**Claps & Morone, 2011**). Pour éviter tout gaspillage, étant donné que le lait est une denrée rapidement périssable, l'essentiel de la production doit être transformé (**Bencharif, 2001**). La méthode de conservation la plus simple est de le transformer en fromage (**Fox, 2011 ; Chamba, 2008**).

Nous rencontrons et vivons chaque jour, des recettes, entourées d'un savoir-faire ancestral transmises de génération en génération. Le fromage est le groupe le plus important et diversifié de produits laitiers. Il utilise environ 35% de la production totale mondiale de lait et est disponible dans au moins 1000 variétés (**Chamba, 2008**).

En Algérie, les fromages traditionnels sont peu nombreux, non entièrement recensés et aussi peu étudiés ; environ dix types de fromage sont connus dans les différentes régions du pays (**Aissaoui et al., 2011**). Parmi ces fromages, on rencontre Bouhezza qui fabriqué dans la région des Chaouia (Nord-est), Takammèrite dans le sud, La Klila et Jben sont connus dans plus d'une région en Algérie. Ces fromages restent encore non labellisés, leur fabrication est destinée à l'autoconsommation au niveau familial. Certains d'entre eux sont plus ou moins commercialisés d'une manière artisanale (**Aissaoui, 2004**).

La bio-conservation ou bien la technologie dite « douce » de conservation des aliments est une conservation naturelle qui préserve les propriétés organoleptiques et nutritionnelles de l'aliment, par l'utilisation de microorganismes vivants (**Gálvez et al., 2007 ; Settanni & Corsetti, 2008**). Ceci résulte en une réduction logique du recours aux conservateurs "chimiques", dont certains ont montré des effets indésirables sur la santé de l'Homme, ainsi qu'aux traitements thermiques souvent préjudiciables aux propriétés organoleptiques et nutritionnelles des aliments. La bio-conservation par les bactéries lactiques est due à leurs capacités à produire plusieurs métabolites antimicrobiens, tels que

les acides organiques (acide lactique, acide acétique, ...), le peroxyde d'hydrogène, l'éthanol, le diacétyle, la reutéline, le dioxyde de carbone et les bactériocines (**Klaenhammer, 1988 ; Abee et al., 1995**). Ces dernières, font depuis quelques décennies, l'objet d'innombrables études notamment dans l'objectif d'applications alimentaires.

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens synthétisés par voie ribosomique, produits par des bactéries naturellement immunisées à leurs propres bactériocines (**Cotter et al., 2005 ; Cotter et al., 2013**). Elles ont un spectre d'activité plus ou moins large (**Cotter et al., 2005**), qui, souvent, inclut des bactéries pathogènes. Certaines bactériocines ont une activité antimicrobienne qui s'étale jusqu'aux protozoaires, levures, champignons et virus (**Reddy et al., 2004**). Leur dégradation par les enzymes protéolytiques, en particulier les protéases du tractus gastro-intestinal des mammifères, ainsi que l'absence de toxicité pour l'Homme, rendent leur consommation sans danger (**Zacharof & Lovittb, 2012**). Le spectre d'activité des bactériocines, leur capacité à inhiber des bactéries pathogènes, leur thermostabilité et leur résistance aux variations de pH, sont les principales caractéristiques qui doivent être prises en compte lors de la sélection des souches productrices pour des applications dans l'industrie agroalimentaire (**Gálvez et al., 2007**).

Notre travail a pour objectif, l'étude de l'activité antibactérienne de certaines souches de bactéries lactiques vis à vis des souches pathogènes. Ces souches ont été isolées de fromages artisanaux, purifiées et identifiées par des tests biochimiques.

Ce travail comprend trois parties : une partie bibliographique qui résume des généralités sur les bactéries lactiques et leur activité antibactérienne. Une deuxième partie est consacrée à l'essai de recherche et mise en évidence de bactériocines produites par les bactéries lactiques isolées à partir du Jben et de la Klila et une troisième partie qui englobe les différents processus de purification conventionnelles et alternatives utilisé au cours de ces six dernières années.

Partie I : Synthèse Bibliographique

Chapitre I : Bactéries lactiques

Chapitre II : Activités antimicrobiennes

Des bactéries lactiques

Chapitre III : Produits terroir de la wilaya
de Naama

Chapitre I : Bactéries Lactiques

Les bactéries lactiques sont 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, la viande, les végétaux et les céréales et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale. Elles sont impliquées dans un grand nombre de fermentations spontanées de produits alimentaires (Stiles et al., 1997).

1. Historique des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques ont été utilisées pour la fermentation des aliments depuis plus de 4000 ans, sans les connaître et sans comprendre la base scientifique de leur utilisation, tout en essayant de produire des aliments de meilleure conservation et de meilleure qualité (Sallofe, 1994). Ce n'est qu'à la fin du 19^{ème} siècle, que Lister avait isolé la première bactérie lactique qu'il a dénommée alors *Bacterium lactis* et il s'agissait de *Lactococcus lactis* selon Axelsson, (2004). La production de cultures des bactéries et l'emploi des ferments se développent au début du 20^{ème} siècle (Dridier & Prevost, 2009).

2. Définition et caractéristiques des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des microorganismes ubiquitaires qui se retrouvent dans différents types d'habitat (Dellagio et al., 1994 ; Matamoros, 2008). Ce sont des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophe constitué de Cocci et de bacilles (Badis et al., 2005). Elles jouent un rôle important dans de nombreux procédés laitiers et produisant de l'acide lactique. Elles colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, la viande, les végétaux et les céréales et font partie de la flore qui permet la fermentation spontanée de produits alimentaires (Stiles et al., 1997). Les principaux genres qui constituent le groupe des bactéries lactiques sont : *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* et le genre *Bifidobacterium* est actuellement considéré comme un genre de bactéries lactiques (Guteriani, 2007).

3. Identification des bactéries lactiques

3.1. Caractères morphologiques

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes, immobiles, non sporulés et hétérotrophes (Yann, 2003). Elles sont à Gram positif, peuvent avoir des formes coccoïdes, coccobacillaires, ou bacillaires (Klein et al., 1998 ; Badis et al., 2005).

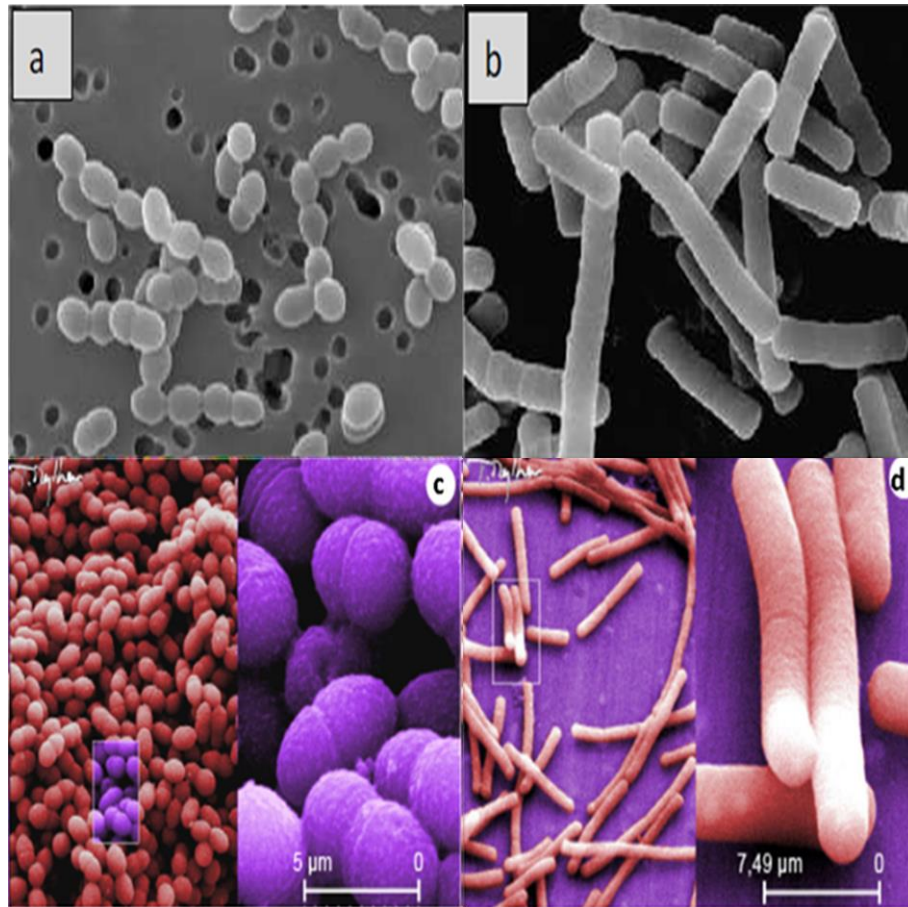


Figure 1 : Photos de bactéries lactiques Observées au Microscope électronique [MET] :(a) forme Cocci, (b) forme bacille des bactéries lactiques (Makhloufi, 2011). [MEB] :(c) *Streptococcus thermophilus* (barre= 5,00µm ; agrandissement 6000 fois. (d) *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (barre = 7,49µm ; agrandissement 4010 fois, (Collection/INRA MIMA2 /T Meylheuc, 2019).

3.2. Caractères physiologiques et biochimiques

Les bactéries lactiques ne possèdent pas de catalase et possèdent un métabolisme anaérobie strict ou aéro-tolérant (Hardie & Whiley, 1997). De trop grandes teneurs en oxygène peuvent leur être néfastes en raison de l'absence de chaîne respiratoire. Ces bactéries sont mésophiles avec une croissance de 10 °C à 40 °C et un optimum entre 25 et 35 °C, mais certaines sont capables de se développer à 5 °C ou 45 °C, elles supportent des pH de 4 à 8 (exceptionnellement de pH 3.2 à 9.6), il s'agit d'un groupe de bactéries à Gram-positif sous forme Cocci ou bâtonnet (Ratisbonne, 2009).

La plupart des bactéries lactiques sont équipées génétiquement pour avoir un métabolisme respiratoire, mais elles sont incapables de respirer si l'hème, n'est pas présent dans le milieu (Lechardeur et al., 2011). L'hème est un cofacteur indispensable au cytochrome C-oxydase le dernier accepteur d'électrons de la chaîne respiratoire.

Elles sont chimiotrophes et ont un métabolisme fermentaire strictement saccharolytiques, c'est à dire elles trouvent l'énergie nécessaire à partir d'une réaction de l'oxydation des sucres (Meziani, 2011).

La conversion des sucres en acide lactique utilise deux voies :

- La voie homofermentaire ou glycolyse qui donne deux molécules de lactate par molécules de glucose.

- La voie hétérofermentaire ou voie des pentoses phosphates donnant un lactate, un acétate et une molécule de CO₂ par molécule de glucose (Savadogo, 2004).

3.3. Caractères immunologiques

Les bactéries lactiques peuvent être sensibles à leurs propres substances de défense comme la bactériocine, elles se prémunissent à l'aide d'une protéine qualifiée « d'immunité » (Abee et al., 1995).

C'est une lipoprotéine d'immunité codée par le gène LanI : Cette protéine s'attache à la surface externe de la membrane et interagit avec la bactériocine afin d'empêcher son insertion dans la membrane et ainsi former des pores. La structure de ces protéines est très variable (Dortu, 2008 ; Mameche, 2008).

4. Taxonomie et classification des bactéries lactiques

La classification phénotypique des bactéries lactiques est largement basée sur la morphologie, le mode de fermentation de glucose, la croissance à différentes températures, la capacité de croissance à de hautes concentrations de sel (6.5%, 18%), la tolérance aux pH acides, alcalins et à l'éthanol, la configuration de l'acide lactique produit à partir de glucose, l'hydrolyse de l'arginine, la formation d'acétoïne, etc. Les marqueurs chimio-taxonomiques comme la composition en acides gras et les constituants de la paroi cellulaire peuvent aussi être utiles dans la classification (König & Fröhlich, 2009).

Selon la seconde édition de *Bergey's manual of systematic bacteriology*, les bactéries lactiques sont classées dans le phylum des *Firmicutes*, la Classe des *Bacilli* et l'Ordre des *Lactobacillales* renfermant trente-cinq genres répartis en six familles : *Aerococcaceae*, *Carynobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* et *Streptococcaceae* (Vos et al., 2009).

Seuls douze genres sont utilisés en technologie alimentaire, il s'agit de : *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus* et *Weissella* (Vandamme et al.,

1996). Alors que seulement cinq genres répondent aux caractéristiques générales d'une bactérie lactique typique *Aerococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* (Salminen et al., 2004).

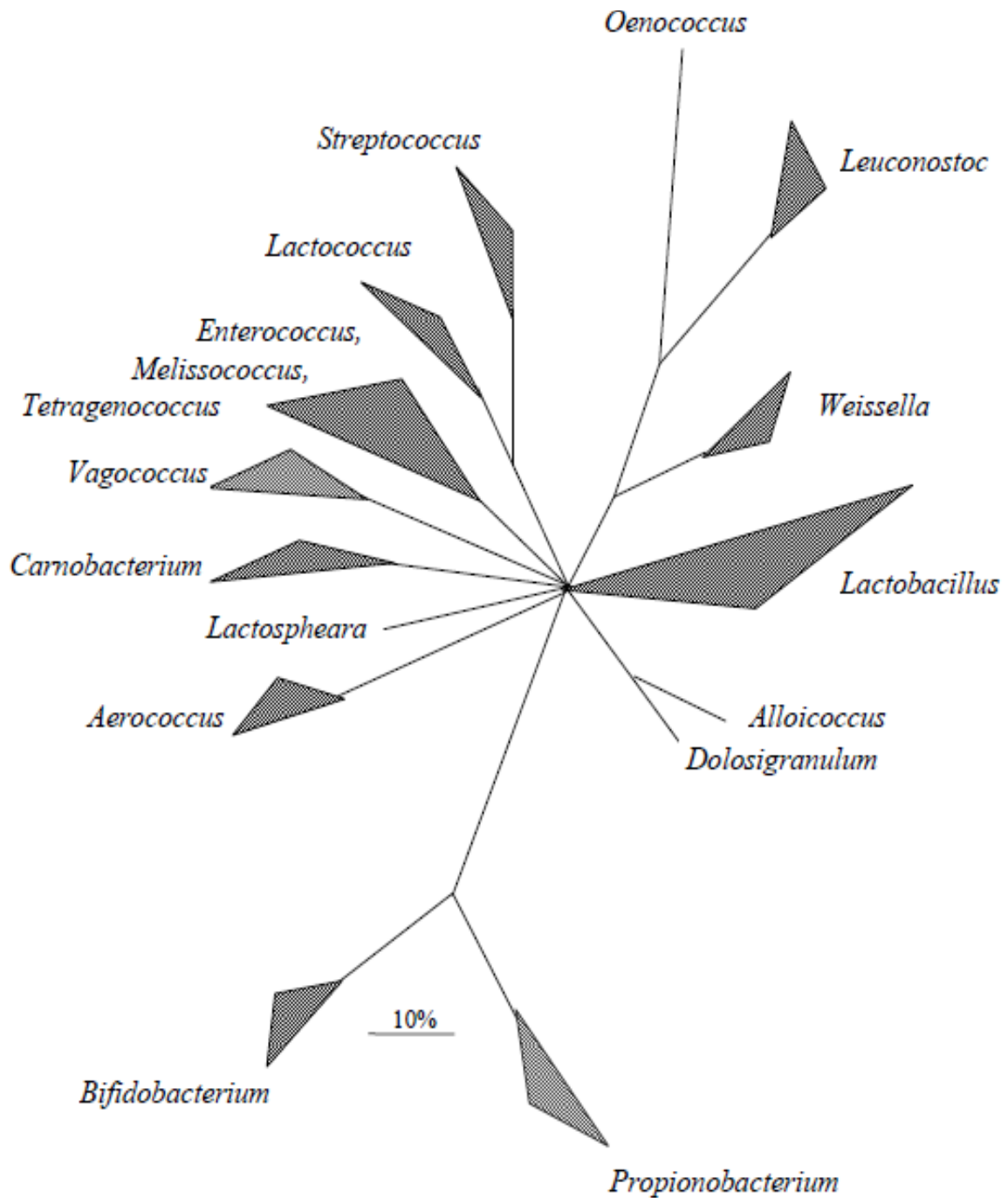


Figure 2 : Arbre consensus, basé sur l'analyse comparative des séquences ARNr, montrant les principaux groupes phylogénétiques de bactéries lactiques à faible % G+C et les genres Gram positifs non reliés *Bifidobacterium* et *Propionibacterium* (Holzapfel et al., 2001).

5. Intérêts technologiques des bactéries lactiques

5.1. Application industrielle des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont impliquées dans la fermentation et la bioconservation de différents aliments. Ainsi, les souches de *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* sont utilisées pour la production du yaourt, des fromages et des laits fermentés (Yateem et al., 2008). Le vin, les poissons, les viandes, les charcuteries, le pain au levain entre autres sont aussi des produits de fermentation par des bactéries lactiques (Badis et al., 2005). L'utilisation de ces dernières a pour but l'amélioration des caractéristiques organoleptiques des produits fermentés et l'augmentation de leur durée de conservation sans l'utilisation de conservateurs chimiques grâce aux substances antimicrobiennes qu'elles secrètent (Dortu & Thonart, 2009). Les souches utilisées en industrie alimentaire doivent répondre à certains critères : absence de pathogénicité ou activité toxique, capacité d'améliorer les caractéristiques organoleptiques, capacité de dominance, facilité de culture et de conservation, et maintenance des propriétés désirables durant le stockage (Marth & Steele, 2001).

5.2. Activité acidifiante

La fonction acidifiante constitue la propriété métabolique la plus recherchée des bactéries lactiques utilisées dans les industries alimentaires. Elle se manifeste par la production de l'acide lactique à partir de la fermentation des hydrates de carbone au cours de la croissance bactérienne (Mäyrä-Mäkinen & Bigret, 2004 ; Monnet et al., 2008).

5.3. Pouvoir lipolytique

Les propriétés lipolytiques sont généralement faibles chez les bactéries lactiques, les lactocoques sont considérés comme plus lipolytiques que *Streptococcus thermophilus* et les lactobacilles. Elles peuvent cependant présenter un intérêt pour certaines applications fromagères (Béal et al., 2008). D'une manière générale on distingue les estérases qui hydrolysent de façon préférentielle les esters formés avec les acides gras à chaîne courte (C2-C8) et les lipases qui sont actives sur des substrats émulsifiés contenant des acides gras à chaîne longue (>C8), ces enzymes sont impliquées dans l'hydrolyse de mono, di, et triglycérides (Béal et al., 2008 ; Serhan et al., 2009).

5.4. Activité protéolytique

Les bactéries lactiques possèdent des protéinases, et des peptidases nécessaires à la dégradation des protéines du lait en peptides et en acides aminés. Ceux-ci peuvent alors être transformés en alcools et en acides. Cette activité protéolytique intervient de se fait sur le rendement fromager, la texture et la saveur typique du fromage et par conséquent sur les caractéristiques du produit final (**Schirch et al., 1985**).

5.5. Activité aromatisante

La production de composés aromatiques est liée à l'activité microbienne. Plusieurs espèces de bactéries lactiques, telles que *L. lactis sp lactis biovar diacetylactis* et *L. mesenteroides sp cremoris* sont capables de synthétiser, à partir du citrate notamment, divers composés tels que le diacétyle, l'acétoïne, l'acétate, principaux composés responsables de l'arôme des produits laitiers fermentés (**Leveau & Bouix, 1993**).

D'autres travaux ont montré la capacité de certaines bactéries lactiques à convertir les acides aminés en molécules aromatiques, ce qui permet de diversifier les arômes des produits dans lesquels se développent ces bactéries (**Tanous et al., 2005 ; Tanous et al., 2006**).

5.6. Activité antimicrobienne

On reconnaît depuis longtemps, aux bactéries lactiques, la propriété de produire des substances antimicrobiennes leur permettant de se développer préférentiellement dans divers écosystèmes. L'activité antagoniste des bactéries lactiques est due aux métabolites excrétés : l'acide lactique et autre acide organique, peroxyde d'hydrogène, diacétyle, et les bactériocines (**Leveau et al., 1991, Klaenhammer et al., 1994**). Nous nous étalerons de manière plus explicite sur cette partie dans le chapitre suivant.

*Chapitre II : Activités antimicrobiennes
Des bactéries lactiques*

1. Phénomène d'antagonisme

Le phénomène d'antagonisme est considéré comme des interactions néfastes entre les microorganismes, on parlera alors de phénomène d'inhibitions (**Djidel, 2007 ; Tabak & Bensoltane, 2012**).

Comme évoqué précédemment, l'effet antagoniste des bactéries lactiques est principalement lié à la compétition pour les sources nutritionnelles, cet effet se traduit par la production de différentes substances de bas poids moléculaire tel que le diacétyle, dioxyde de Carbone, le peroxyde d'hydrogène, des bactériocines et les différents acides organiques qui limitent la croissance de certains germes pathogènes (**Kermanshahi & Qamsari, 2015**).

2. Production de métabolites inhibiteurs

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 (**Smaoui, 2010**).

2.1.Acides organiques

Qu'elles soient homofermentaires ou hétérofermentaire, les bactéries lactiques produisent différents types d'acides organiques. Grace à cette production, le pH du milieu dans lequel les bactéries lactiques se multiplient diminue, permettant ainsi l'inhibition d'une partie de la flore qui s'y développe et qui pourrait être indésirable dans l'aliment sur le plan hygiénique (**Hammi, 2016**).

2.2.Peroxyde d'hydrogène

La catalase, enzyme nécessaire à la dégradation du peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau, est absente chez les bactéries lactiques. Il en résulte une accumulation de ce composé qui peut être inhibiteur de différents micro-organismes. En effet, son action peut se manifester aussi bien sur les germes indésirables que sur ceux indispensables au bon déroulement de la fermentation. L'inhibition, se fait par l'oxydation des lipides membranaires des souches cibles et/ou par la destruction des structures protéiques cellulaires (**Zalan et al., 2005**).

Certaines bactéries lactiques synthétisent la catalase hexamérique ou tétramérique, on parle de pseudocatalases. Celles-ci contiennent du manganèse, ce qui permet de protéger ces bactéries contre leur propre peroxyde d'hydrogène (**Strus et al., 2006**).

2.3. Dioxyde de carbone

Il est formé essentiellement, au cours de la fermentation hétérolactique. En créant un environnement anaérobie, il inhibe les microorganismes aérobies. Son accumulation dans la bicouche lipidique peut causer un dysfonctionnement de la perméabilité membranaire (**Ammor et al., 2006**).

2.4. Diacétyl

Le diacétyl est un composé aromatique essentiel. Plusieurs bactéries des genres *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* et *Pediococcus*, peuvent le synthétiser (**Leveau et al., 1991**). Sa capacité inhibitrice se manifeste vis-à-vis des levures, des bactéries à Gram négatif, les bactéries à Gram positif non lactiques sont quant à elles moins sensibles (**El-Ziney et al., 1998**).

2.5. Reutéline

La reutéline (ou 3-hydroxypropionaldéhyde) est un métabolite intermédiaire qui possède un effet antimicrobien. Il est produit lors de 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**). La reutéline possède un large spectre d'activité et a des applications aussi bien dans le domaine médical que dans le domaine alimentaire (**Vollenweider, 2004**). Elle interfère avec la réplication de l'ADN chez les procaryotes (Gram positif ou Gram négatif), les eucaryotes, les virus, les champignons et les protozoaires.

2.6. Bactériocine

Les bactériocines sont communément appelées peptides antimicrobiens de synthèse ribosomique qui affichent généralement un degré élevé de spécificité de cible contre les souches de bactéries étroitement apparentées et / ou large gamme activité antimicrobienne. En général, diverses bactéries à Gram positif sont capables de produire des bactériocines. Pourtant, les bactériocines des bactéries lactiques (LAB) sont très étudiées en raison du fait que la plupart des LAB productrices de bactériocine sont isolés à partir des aliments et sont considérés comme des bactéries GRAS. LAB bactériocines devraient également être en sécurité (**Deegan et al., 2006 ; Zendo, 2013**). LAB bactériocines présentent des caractéristiques propres à être utilisés comme agents de conservation des aliments. Les peptides présentent une activité antimicrobienne à une concentration aussi faible que picomolaire à nanomolaire. En plus d'être non toxique, les LAB bactériocines peuvent être digérées par des protéases, ayant ainsi peu, ou pas d'influence sur le microbiote intestinal. Les peptides sont des métabolites primaires avec

de simples mécanismes biosynthétiques ; ainsi, leur activité antimicrobienne et spécifique peut facilement être améliorée grâce à la génie génétique (Cleveland *et al.*, 2001 ; Deegan *et al.*, 2006 ; Gálvez *et al.*, 2007 ; Perez *et al.*, 2014 ; Zendo, 2013).

2.6.1. Classification des Bactériocines

Les bactériocines de bactéries lactiques ont été classées par Klaenhammer, (1993) en 4 classes sur la base des caractéristiques communes, notamment structurales. La plupart des bactériocines isolées ces derniers années appartiennent aux classes I ou II (Batdorj *et al.*, 2006).

Classe I : RIPPS (< de 5 kDa) Cette classe comprend tous les peptides qui subissent une modification enzymatique pendant la biosynthèse, qui fournit des molécules avec des acides aminés rares et des structures qui influent sur leurs propriétés (par exemple, lanthionine, hétérocycles, cyclisation tête-à-queue, glycosylation). Ils sont constitués d'un peptide leader qui sert à la reconnaissance d'enzyme, le transport, et en maintenant le peptide inactif, qui est fusionné à un peptide de noyau (Arnison *et al.*, 2013). Les signatures clés pour une définition appropriée et systématique de nouveaux membres de cette classe ont été récemment suggéré (Alvarez-Sieiro *et al.*, 2016). Sur la base des caractéristiques structurales et le mode d'action, les lantibiotiques ont été subdivisés en deux sous-groupes : A et B.

- Lantibiotiques de Type A** inhibent les cellules sensibles par dépolarisation de la membrane cytoplasmique (Van Belkum *et al.*, 1989). Ces bactériocines sont de taille plus grande que les lantibiotiques de type B et varie entre 21 et 38 acides aminés. Elles sont les plus étudiées des bactériocines des bactéries à Gram positif (Gross & Morell, 1971).

- Lantibiotiques de type B** sont de structure secondaire plus globulaire et de taille ne dépassant pas les 19 acides aminés. Les lantibiotiques type B fonctionnent par inhibition de l'enzyme. Par exemple, la mersacidine, qui interfère avec la biosynthèse de la paroi cellulaire (Brotz *et al.*, 1995). L'autre lantibiotique bien étudié, la lacticine 3147, consiste en deux peptides qui affichent une activité antimicrobienne synergique (Ryan *et al.*, 1998 ; Wiedemann *et al.*, 2006).

Classe II : A la différence de classe I, bactériocine de classe II comprend un très grand groupe de petits peptides (<10 kDa) stables à la chaleur, qui ne subissent pas de modification post-traductionnelle (Perez *et al.*, 2014).

• **Classe IIa** ou bactériocines **pédiocine** peuvent être considérés comme le principale sous-groupe parmi tous les bactériocines caractérisés LAB. Ces bactériocines sont cationiques et affichent une activité anti *Listeria*. Toutefois, des rapports récents ont indiqué que de nombreuses espèces du genre *Enterococcus* sont capables de produire des bactériocines de type pédiocine qui sont hétérogènes dans la structure et diffèrent dans leurs spectres d'inhibition (Weerapong et al., 2016).

• **Classe IIb** : Les bactériocines de classe IIb ou à deux peptides, comme leur nom l'indique, se composent de deux peptides individus différents qui nécessitent un rapport peptidique égal de chaque peptide pour exercer une activité antimicrobienne optimal (Garneau et al., 2002), tandis que chaque peptide présente une très faible activité lorsqu'il testé individuellement. La Lactococcine G et la lactacine F produites par *Lactococcus lactis* et *Lactobacillus johnsonii* sont parmi les quinze premiers des bactériocines à deux peptides qui ont été signaler avec un spectre étroit d'inhibition contre *Clostridium*, *Enterococcus faecalis* et *lactobacillus*. Les systèmes à deux peptides les mieux caractérisés sont les plantaricines EF / JK et la plantaricine S produites par *Lactobacillus plantarum C11* et *Lactobacillus plantarum CO10*, respectivement (Anderssen et al., 1998 ; Jiménez-Díaz et al., 1995).

• **Classe IIc** : cette sous classe a été dédié aux bactériocines qui sont secrétées via la voie de sécrétion Sec et dont les extrémités N- et C-terminales sont reliées de manière covalente (Nes et al., 2007). L'entéroccine AS-48 produite par *Enterococcus faecalis ssp. liquefaciens* est la plus étudiée de ce groupe (Diep et al., 1995 ; Bastos et al., 2009). Une recherche génétique par PCR indique que les gènes codant pour cette bactériocine sont abondants chez les entérocoques (Joosten et al., 1997). Cette bactériocine agit non seulement sur un grand nombre des bactéries à Gram positif mais également sur certaines bactéries à Gram négatif (Galvez et al., 1989).

• **Classe IId** « linéaires et non pédiocine-like » est un groupe hétérogène de bactériocines peptides linéaires simples non reliés avec des différentes structures, mécanismes de sécrétion, et modes d'action tels que lactococcine 972, lactococcine A, B et enterocin (Franz et al., 2007). Lactococcine 972 est un peptide à pH stable, sensible à la chaleur, active contre les espèces des lactocoques étroitement apparentées (Martinez et al., 1999).

• **Classe IIe** : Glycocins sont des bactériocines contenant des résidus glycosylée (s) (Arnison et al., 2013). Glycocin F de *Lactobacillus plantarum* a été le premier Glycocin

décrit dans LAB (Stepper et al., 2011). Glycocin F est agencé sous forme de deux hélices alpha maintenues ensemble par des liaisons disulfure (Venugopal et al., 2011). Il possède une N-acétylglucosamine β -O-lié à la sérine et une N-acetylhexosamine S-lié à la C-terminal de cystéine, un type de glycosylation très peu fréquents (Alvarez-Sieiro et al., 2016). On sait peu sur le mécanisme d'action de Glycocins. Le O-lié N-acétylglucosamine peut interagir de manière réversible avec des cellules cibles (Stepper et al., 2011). En dehors de Glycocin F, Enterocine F4-9 de *Enterococcus faecium* a également été décrit (Maky et al., 2015).

Classe III : Protéines de taille supérieure à 30 kDa et sensibles à la chaleur. La structure et le mode d'action de ces bactériocines diffèrent complètement des autres bactériocines produites par les bactéries lactiques. Cette classe ne contient que quatre bactériocines : l'helveticin J produite par *Lactobacillus helveticus* A, l'enterolysin A produite par *Enterococcus faecium*, la zoocin A produite par *Spreptococcus zooepidemicus* et la millericin B produite par *Streptococcus milleri* (Nilsen et al., 2003 ; Papagianni, 2003 ; Nigutova et al., 2007).

Classe IV : se caractérisent par l'incorporation de groupes tels que des glucides ou des lipides dans la molécules active. On sait peu sur la structure et la fonction de cette classe, quelques exemples comprennent la leuconocine S (Bruno & Montville,1993) et la lactocine 27 (Upreti & Hinsdill,1975).

2.6.2. Biosynthèse des bactériocines et régulation

La synthèse des bactériocines est associée à la croissance : elle se déroule pendant toute la phase de croissance et s'arrête à la fin de la phase exponentielle (Parente et al., 1997 ; Lejeune et al., 1998). Le mécanisme de biosynthèse des bactériocines est relativement simple, car les peptides antibactériens sont des métabolites primaires (codés par le gène et synthétisés par le ribosome) alors que les antibiotiques classiques sont des métabolites secondaires (Rodney et al., 2015).

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 (Dortu & Thonart, 2009).

Tableau 1 : LAB bactériocines et leurs espèces productrices signalées (Weerapong et al., 2016).

Espèces de producteurs	Nombre de bactériocines rapporté dans chaque classe						
	I	IIa	IIb	IIc	IId	Non-classifié	Total
<i>Carnobacterium divergens</i>	-	-	-	-	-	2	2
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	-	-	-	1	-	2	3
<i>Carnobacterium piscicola</i>	-	5	-	-	-	1	6
<i>Enterococcus avium</i>	-	1	-	-	-	-	1
<i>Enterococcus durans</i>	-	-	-	-	1	-	1
<i>Enterococcus faecalis</i>	3	2	2	4	-	-	11
<i>Enterococcus faecium</i>	-	8	3	4	3	4	22
<i>Enterococcus mundtii</i>	-	2	-	-	-	2	4
<i>Enterococcus sp.</i>	-	-	-	-	-	1	1
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	-	-	-	-	-	6	6
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	-	-	-	-	-	1	1
<i>Lactobacillus casei</i>	-	-	-	-	-	2	2
<i>Lactobacillus crispatus</i>	-	-	-	-	-	1	1
<i>Lactobacillus curvatus</i>	-	-	-	-	-	3	3
<i>Lactobacillus gasseri</i>	-	-	-	1	-	-	1
<i>Lactobacillus helveticus</i>	-	-	-	-	-	2	2
<i>Lactobacillus paracasei</i>	-	-	-	-	-	4	4
<i>Lactobacillus pentosus</i>	-	-	-	-	-	1	1
<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	4	-	-	13	17
<i>Lactobacillus sake</i>	-	-	-	-	-	3	3
<i>Lactobacillus sakei</i>	-	2	-	-	-	7	9
<i>Lactococcus garvieae</i>	-	-	-	1	1	1	3
<i>Lactococcus lactis</i>	6	1	4	-	5	6	22
<i>Lactococcus sp.</i>	-	-	-	1	-	-	1
<i>Leuconostoc carnosum</i>	-	-	-	-	-	2	2
<i>Leuconostoc gelidum</i>	-	-	-	-	-	2	2
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-	-	-	1	-	4	5
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	-	1	-	-	2	-	3
<i>Pediococcus acidilactici</i>	-	3	-	-	-	1	4
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	-	-	-	-	-	2	4
<i>Streptococcus bovis</i>	1	-	-	-	-	1	2
<i>Streptococcus cremoris</i>	-	-	-	-	-	1	1
<i>Streptococcus macedonicus</i>	1	-	-	-	-	-	1
<i>Streptococcus mutans</i>	6	-	2	-	-	1	9
<i>Streptococcus pyogenes</i>	2	-	-	-	-	-	2
<i>Streptococcus rattus</i>	2	-	-	-	-	1	3
<i>Streptococcus salivarius</i>	3	-	-	-	-	1	4
<i>Streptococcus thermophilus</i>	-	-	2	-	-	2	4
<i>Streptococcus uberis</i>	1	1	-	1	-	-	3
<i>Weissella cibaria</i>	-	-	-	-	-	2	2
<i>Weissella hellenica</i>	-	-	-	-	3	3	6
<i>Weissella paramesenteroides</i>	-	-	-	-	-	1	1
Total	25	28	17	14	15	86	185

- Gène de structure code pour la pré-probactériocine, contenant un N-terminal reconnues par les transporteurs ABC pour le traitement de la séquence leader et sécrétion de la bactériocine mature dans le milieu extracellulaire.
- Gène d'immunité, code de petites protéines, avec des tailles d'environ 51 à 154 acides aminés, qui protègent la souche productrice de la bactériocine elle-même.
- Gènes codant pour des protéines responsables du traitement, du transport et de la sécrétion de la pré-probactériocine.
- Gènes codant pour les enzymes responsables des modifications post-traductionnelles de la probactériocine.
- Gènes codant des composants impliqués dans la régulation de la synthèse (**Lafuenterincon et al., 2016**).

Ces gènes associés à la biosynthèse des bactériocines sont regroupés en opérons. Ils sont souvent associés à des éléments transférables tels que des transposons et des plasmides. Toutefois, plusieurs bactériocines ont des systèmes de production situés sur des chromosomes, c'est le cas par exemple de l'helvéticine J (**Joerger & Klaenhammer, 1986**) de l'entérocin A, de la divercine V41, de la sakacine P, de la carnobactériocine B2, de la carnobactériocine BM1 et de la nisine (**Aymerich et al., 1996**).

Les bactériocines sont synthétisées sous forme de peptides précurseurs biologiquement inactifs qui contiennent des peptides leader N-terminal fixés aux pro-peptides C-terminal. Ces peptides inactifs (peptide leader) seront soumis à des processus enzymatiques pour donner des bactériocines actives (**Klaenhammer, 1993 ; Diep & Nes, 2002 ; Riley & Wertz, 2002**).

Les principales voies de biosynthèse des bactériocines de classe I (lantibiotiques) peuvent être décrites en utilisant la voie suivie par la nisine bien connue, bien qu'il existe de légères différences pour les non-lantibiotiques bactériocines car elles n'ont pas besoin d'incorporation d'acides aminés inhabituels. (1) Le gène nisA est traduit au pré-nisine A peptide ; (2) La pré-nisine A est convertie en nisine A précurseur par les produits du Gènes nisB et nisC. Plusieurs ponts disulfures sont réalisés et certains acides aminés sont convertis en insolites ; (3) Le précurseur nisine A est exporté hors de la cellule à l'aide du nisT et du nisP tandis que le peptide leader est simultanément clivé pour obtenir la nisine A (**Dimov et al., 2005**). L'expression de la bactériocine est régulée soit par des facteurs d'induction externes, généralement sécrétés par la souche productrice elle-même, soit constitutive tandis que la biosynthèse des bactériocines dépend des conditions environnementales telles que la température et pH (**Dimov et al., 2005 ; Guinane et al., 2015**).

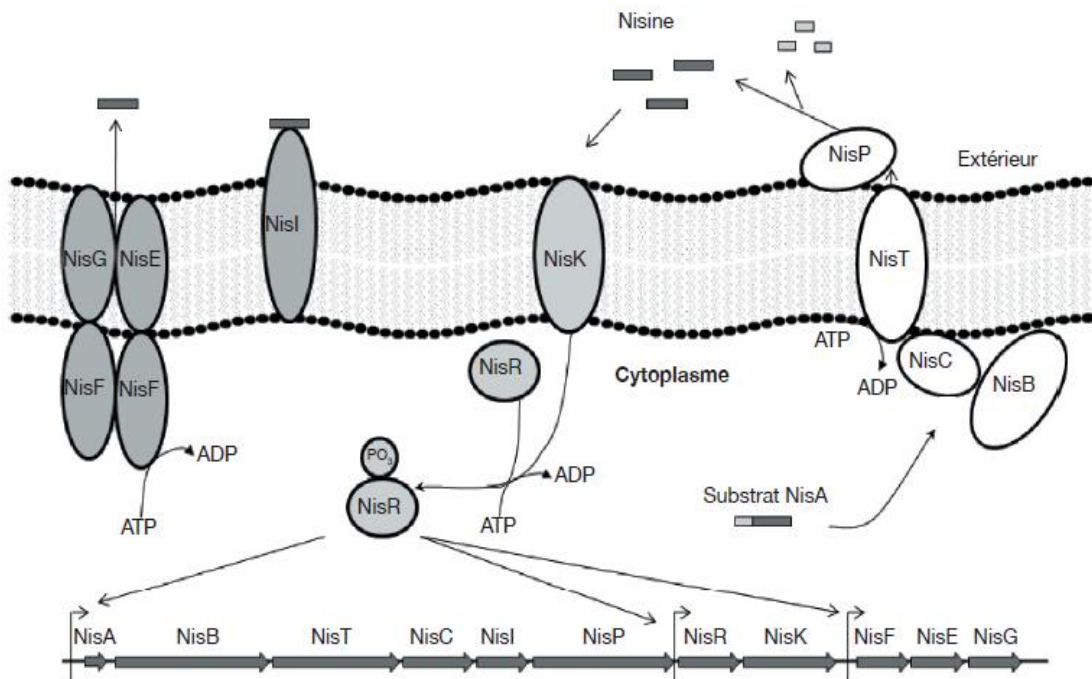


Figure 3 : Régulation de la production, modifications post-traductionnelles et auto-immunité de la nisine (Patton et al., 2005).

[Le substrat NisA est le prépeptide non biologiquement actif qui sera déshydraté par NisB et cyclisé par NisC avant sa translocation par l'ABC transporteur NisT et le clivage de la séquence signal par la protéase NisP. Ces modifications conduiront au peptide biologiquement actif. La nisine interagira avec l'histidine kinase NisK, ce qui induira la phosphorylation du régulateur de réponse NisR et l'activation de la transcription des gènes nécessaires à la production de la nisine. La protection de la cellule vis-à-vis de la nisine est réalisée par deux mécanismes : la lipoprotéine d'immunité NisI et l'ABC transporteur formé par NisG, NisE et NisF].

Les bactériocines de classe II telles que la plantaricine de *Lactobacillus plantarum*, peuvent être soit chromosomiques ou codé par un plasmide. La plantaricine 423 est codée par un plasmide, tandis que la plantaricine ST31 est chromosomiquement encodé. Cependant, lorsque plusieurs bactériocines sont produites, les bactériocines peuvent être encodé à la fois plasmidiquement et chromosomiquement. Les gènes codant pour la production de bactériocine de classe II sont organisés en opérons et consistent normalement en un gène structurel codant pour le prépeptide et gène d'immunité, gène transporteur ABC pour la translocation à travers la membrane et accessoire de gène de protéine pour exporter la bactériocine. Parfois, des gènes régulateurs sont également présents (Todorov, 2009). La majorité des bactériocines de classe II sont biosynthétisées sous forme de prépeptide inactif portant peptide leader N-terminal et un site distinct de traitement protéolytique à double glycine. Cependant, le premier et le plus étudiée représentative de cette classe est la pédiocine PA-1. Le groupe de gènes de pédiocine PA-1, comme la plupart des bactériocines IIa, est codé par un plasmide (Ennahar et al., 1999). L'opéron de la pédiocine PA-1 contient quatre gènes, à savoir la structure gène pedA ; le

déterminant de l'immunité pedB ; et pedC et pedD qui codent un transporteur ABC et l'accessoire protéine. L'opéron produit deux différents transcrits ; le plus petit et le plus abondant correspond aux gènes pedABC, tandis que le deuxième transcrit est plus grand et couvre le pedABCD (Nissen-Meyer *et al.*, 2009 ; Cui *et al.*, 2012). Le peptide leader sert de reconnaissance signal pour le traitement et la sécrétion de la bactériocine par un transporteur ABC dédié. Dans quelques cas, la bactériocine est sécrétée par le système de translocation (De Kwaadsteniet *et al.*, 2006).

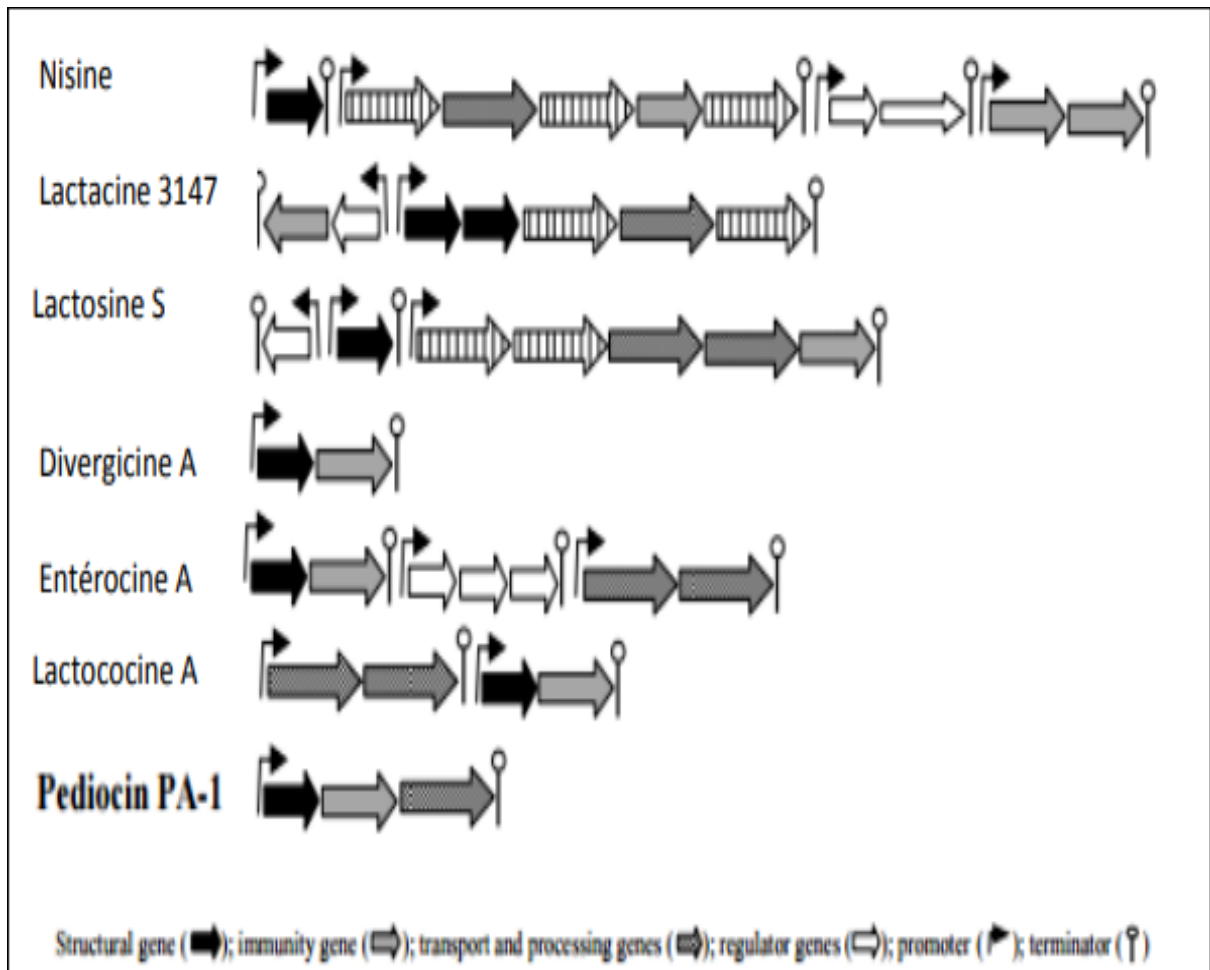


Figure 4 : Organisation des déterminants génétiques impliqués dans la synthèse des bactériocines d'après Skaugen *et al.*, (2003), Drider *et al.*, (2006) et Franz *et al.*, (2007).

2.6.3. Immunité

Les souches productrices de bactériocine se protègent de l'action hostile de leur propre bactériocine en produisant des protéines d'immunité spécifiques. Les gènes codant pour ces protéines sont à proximité génétique étroite aux gènes de structure et de traitement de bactériocine (**Todorov, 2009**). Le gène codant pour la production des protéines immunitaires est la plupart du temps co-transcrit avec le gène de structure de la bactériocine, les deux gènes faisant partie du même opéron (**Fimland et al., 2002**). Le Lan I et le Lan EFG (transporteur ABC à plusieurs composants) ont été décrits pour LAB. La protéine Lan I, en particulier, confère une immunité aux cellules productrices en empêchant la formation de pores par les molécules de bactériocine qui ont inséré dans la membrane en les repoussant, gardant ainsi la concentration de bactériocine dans la membrane sous contrôle (**Todorov, 2009 ; Zacharof & Lovitt, 2012**).

D'autres auteurs (**Abee et al., 1995 ; Jack et al., 1995 ; Allison & Klaenhammer, 1996**) suggèrent que l'immunité peut être assurée par des protéases intracellulaires qui dégradent la bactériocine.

2.6.4. Mode d'action

Bien que toutes les bactériocines partagent le même site d'action qui est la membrane cytoplasmique, leur mode d'action semble être différent (**Dortu & Thonart, 2009**).

2.6.4.1. Bactériocines de classe I (lantibiotiques)

Les lantibiotiques tel que la nisine, portant une structure cationique et amphiphile allongée, interagissent avec la membrane des cellules cibles soit en se liant au lipide II (un précurseur de peptidoglycanes). Cette liaison, empêche ainsi la synthèse de la paroi cellulaire et conduit à la mort de la cellule, soit en utilisant ce lipide comme une molécule d'appui pour s'insérer dans la membrane et y former des pores causant la destruction de la cellule suite à la dissipation du potentiel membranaire et l'efflux des petites molécules (ions, ATP, acides aminés, etc...). La mersacidine tue la cellule en interférant avec ses réactions enzymatiques comme la synthèse de la paroi (**Gillor et al., 2008 ; Dortu & Thonart, 2009**).

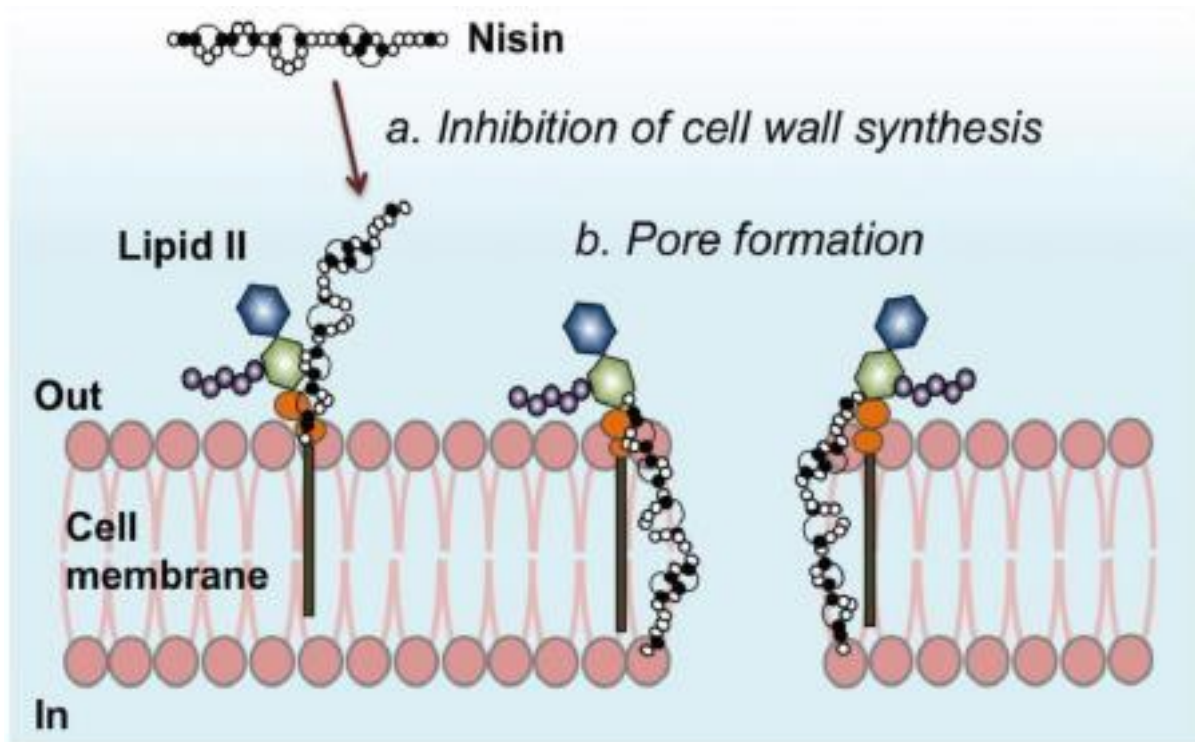


Figure 5 : Mécanisme d'action des bactériocines de classe I (Rodney et al.,2015).

[Classe I les bactériocines, comme la nisine, ont un double mécanisme pour tuer leur cible cellules par (a) l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire et (b) la formation de pores. Les deux mécanismes sont facilités par la liaison de la molécule de nisine au lipide II, qui est le principal transporteur des sous-unités. À des concentrations plus faibles, la nisine empêche la bonne synthèse de la paroi cellulaire, ce qui conduit à la mort cellulaire. Aux plus hautes concentrations, la nisine se lie au lipide II qui initie l'insertion de la membrane et la formation de pores, ce qui entraîne la fuite de composants cellulaires tels que ions et ATP]

2.6.4.2. Bactériocines de classe II (non lantibiotiques)

Les non-lantibiotiques sont les bactériocines les plus courantes. L'insertion de ces bactériocines dans la membrane est conférée par la structure α -hélice amphiphile, cette insertion induit la perméabilisation de la membrane qui conduit par la suite à une fuite de cytoplasmique molécules, provoquant la mort cellulaire des bactéries cibles. Les mécanismes de l'action antimicrobienne des bactériocines de classe II diffère selon les sous-classes (Perez et al.,2014).

Il a été démontré que les bactériocines de la Classe II se lient au système de la mannose phosphotransférase (Man-PTS), système d'absorption de sucre des bactéries cibles, comme molécule d'amarrage pour leur mécanisme d'action. La séquence conservée d'acide aminé YGNGV dans la région N-terminale des bactériocines de classe IIa est responsable de l'activité

antimicrobienne anti-listérienne, alors que le domaine C-terminal le moins conservé est responsable de leur activité antimicrobienne contre d'autres souches cibles (**Fimland et al., 2005 ; Johnsen et al., 2005**).

De grosses protéines ou bactériolytiques (bactériolysines bactériocines de classe III) tels que la lysostaphine peut agir directement sur la paroi cellulaire des cellules cibles Gram positives, ce qui conduit à la mort et la lyse cellulaire (**Cotter et al., 2005**).

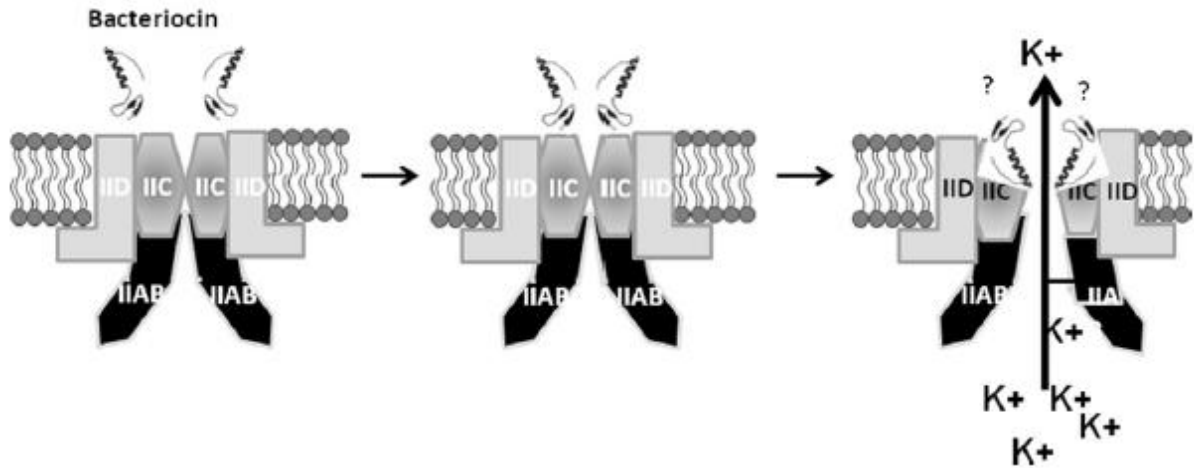


Figure 6 : *Modèle de mécanisme d'action des bactériocines ciblant Man-PTS. (Ingolf et al., 2013)*

[Montré ici est la liaison d'une bactériocine de classe IIa à son récepteur et à la membrane composant embarqué ManCD (IIC et IID) du transporteur Man-PTS. Cette liaison ouvre irréversiblement les pores du transporteur et permet la libre diffusion des ions (tels que les ions potassium) de la bactérie ciblée. Les sous-unités IIA et IIB, qui sont des domaines associés de façon réversible à leur des partenaires localisés sur la membrane du côté cytosolique sont nécessaires pour la fonction de transport du sucre mais pas pour la fonction de récepteur de la bactériocine].

2.6.5. Spectre d'activité

Les bactériocines sont connues pour leur très grande puissance contre leurs souches cibles. En général, l'activité de la bactériocine est limitée aux souches qui sont étroitement liées à la souche productrice (bioactivité à spectre étroit), bien que récemment, des bactériocines ont montré une activité antimicrobienne contre un large éventail de genres (bioactivité à large spectre). De plus, la nature cationique générale des bactériocines joue un rôle très important dans leur interaction initiale avec la membrane cellulaire de leurs souches cibles. La charge négative des membranes cellulaires bactériennes et la charge positive des molécules de bactériocine créent une interaction électrostatique, facilitant ainsi l'approche des molécules aux membranes. Cependant, cette interaction, sous des conditions normales, est également responsable de l'inactivité de la plupart des bactériocines vers des souches bactériennes à Gram négatif.

La composition de la membrane bactérienne à Gram négatif diffère de celle à Gram positif en ce que la première contient une membrane externe lipopolysaccharide. Bactériocines de LAB ne deviennent actifs contre les bactéries à Gram négatif que lorsqu'ils sont combinés avec d'autres agents qui compromettent l'intégrité de la membrane externe comme les tensioactifs (Stevens *et al.*, 1991 ; Zhang & Mustapha, 1999) l'EDTA (Tu & Mustapha, 2002), ou des acides organiques (Mustapha *et al.*, 2002).

2.6.6. Facteurs influençant la production

L'utilisation des bactériocines à l'échelle industrielle en nécessite de grandes quantités. Ceci ne peut être atteint qu'en connaissant et optimisant les facteurs influençant leur production tels que : la température, le pH, le milieu utilisé et bien d'autres. Ces conditions de culture affectent fortement la production de bactériocines.

2.6.6.1. Souche bactérienne

Une bactériocine donnée peut être produite par plusieurs souches ou espèces (Bhunja *et al.*, 1994 ; Jack *et al.*, 1995 ; Rodriguez *et al.*, 1995). Moretro *et al.*, 2000 ont montré que pour la production de sakacine P par *Lactobacillus sakei*, une même bactériocine peut être produite par des souches ou espèces différentes dont la capacité de production peut être variable. Les conditions de culture influencent fortement la production de bactériocines. En effet, l'optimisation de la croissance ne résulte pas nécessairement de l'optimisation de la production de bactériocines (Parente *et al.*, 1997). Il a même été suggéré que des conditions de croissance défavorables permettent de stimuler leur production (Verluyten *et al.*, 2004). Les températures et pH optimaux de production sont souvent inférieurs à ceux optimaux de la croissance.

2.6.6.2. Température et pH

La température et le pH sont des facteurs importants qu'on doit prendre en considération quant à la production de bactériocines. Celle-ci est généralement optimale à des températures et des pH inférieurs à ceux optimaux pour la croissance (Héquet *et al.*, 2007 ; Dortu & Thonart, 2009 ; Sharma *et al.*, 2010).

L'effet de ces deux facteurs a fait l'objet de plusieurs études. Elayaraja *et al.*, (2014) ont constaté que le 35° C et le pH 6,0 étaient idéaux pour la production de bactériocine de *Lactobacillus murinus* AU06 isolé de sédiments marins. De même, des conditions optimales pour la production de bactériocine par *Lactobacillus acidophilus* était de pH 6,0, 34° C, avec

4% de phénylacétamide (Mahrous et al., 2013). Les meilleures conditions de production de bactériocine par *Lactobacillus plantarum* LPCO10 étaient obtenus dans une étude antérieure avec des températures allant de 22° à 27° C, une concentration en NaCl de 2,3 à 2,5%, et un inoculum allant de $10^{7.3}$ à $10^{7.4}$ UFC / ml, tout en fixant la concentration de glucose à 2%, sans aération de la culture (Leal-Sánchez et al., 2002). Conditions optimisées pour la production de bactériocine par *Lactobacillus viridescence* NICM 2169 était une croissance dans un bouillon MRS à pH 7,0, incubé à 37 ° C pendant 48 h (Sure et al., 2016). *Enterococcus faecium* PC4.1 atteint son maximum de production à 30°C et à pH : 6 (Hadji- Sfaxi et al., 2011).

2.6.6.3. Composition du milieu de culture

La composition du milieu, tout particulièrement les concentrations des sources de carbone et d'azote, affecte fortement la production de bactériocines. Les bactéries lactiques productrices requièrent de nombreux nutriments pour leur croissance et des milieux riches contenant de l'extrait de viande, de levure et des hydrolysats de protéines sont nécessaires. Il a déjà été montré que l'augmentation des concentrations en extrait de levure, extrait de viande ou peptone peut permettre une augmentation de la production de bactériocines (Verluyten et al., 2004). D'autre part, quelques études ont montré que la source de carbone utilisée et sa concentration est un facteur important dans l'optimisation de la production de bactériocines (Chen et al., 2007).

2.6.7. Applications des bactériocines

Considérées en tant que « GRAS » (Generally Recognized As Safe) et vu leur abondance et leur pouvoir antimicrobien généralement bactéricide, les bactériocines des bactéries lactiques trouvent leur utilisation dans différents domaines où elles empêchent le développement de bactéries pathogènes et nuisibles (Albano et al., 2009).

2.6.7.1. Application des bactériocines dans le secteur alimentaire

Les bactériocines peuvent être appliquées sous une forme purifiée, semi-purifiée ou sous la forme d'un concentré obtenu après fermentation d'un substrat alimentaire. Les bactéries productrices peuvent également être appliquées dans les produits alimentaires, la bactériocine sera alors produite *in situ*. (Dortu & Thonart, 2009).

Les bactériocines peuvent également être appliquées sous la forme d'un concentré obtenu après fermentation par la souche productrice et atomisation d'un substrat alimentaire tel que le lait, par exemple. Cette préparation sera considérée comme un ingrédient fermenté. Elle contiendra la bactériocine mais également d'autres métabolites microbiens tels que l'acide lactique. (Deegan et al., 2006 ; Galvez et al., 2007).

Un autre mode d'application des bactériocines consiste en leur immobilisation sur les cellules productrices, dans des gels ou des films telle que l'alginate de calcium, la gélatine, la cellulose, les protéines de soja, des films de polysaccharides, etc. La bactériocine sera alors libérée dans le produit au cours de la conservation. Depuis peu, des emballages en polyéthylène ou d'autres films plastiques contenant des bactériocines ont été développés. Ces emballages permettent de réduire la croissance des microorganismes pathogènes ou indésirables pouvant se développer en surface durant la conservation du produit (**Luchansky et al., 2004 ; Deegan et al., 2006 ; Galvez et al., 2007**).

Dans la technologie alimentaire, la nisine est produite par *Lactococcus lactis* et était la première bactériocine trouvée dans LAB (**Rogers, 1928**). Il est également bactériocine commerciale utilisée comme conservateur d'aliments contre la contamination par micro-organisme, qui est commercialisé sous **Nisaplin®**. C'est la seule bactériocine approuvée pour une utilisation comme conservateur dans de nombreux aliments par la Food and Drug Administration des États-Unis (US-FDA), et autorisé comme additif alimentaire dans plus de 45 pays. Une autre bactériocine disponible dans le commerce est le pediocinPA-1, commercialisé sous le nom **d'Alta®2341**, qui inhibe la croissance de *Listeria monocytogenes* dans les produits à base de viande (**Settanni & Corsetti, 2008**).

2.6.7.2.Applications des bactériocines dans le secteur médical

L'émergence de la résistance aux antibiotiques conventionnels ces dernières années a orienté la recherche vers l'étude de nouveaux agents antimicrobiens tels que les bactériocines. On peut distinguer les applications potentielles suivantes :

- **Traitements d'infections cutanées :**

On utilise la mersacidine, la lacticine 3147, l'épidermine et la gallidermine (**Sass et al., 2008 ; Sutyak et al., 2008**).

- **Traitements de la gingivite :**

La nisine et la BLIS K12TM (BacteriocinLike Inhibitory Substances K12TM) sont utilisées (**Tagg, 2004**).

- **Traitements de la mastite :**

Administrée par voie intra-mammaire chez les vaches, la nisine A inhibe la prolifération des souches de *Staphylococcus* et *Streptococcus* à l'origine de cette infection (**Bradley, 2002 ; Cotter et al., 2005**).

- **Traitements de l'otite :**

On utilise dans son traitement la nisine ; La bactériocine ST4SA (**Knoetze et al., 2008**).

• **Traitements d'infections systémiques :**

La piscicoline 126, l'abp-118, la divercine V41 et la nisine sont les bactériocines recommandées (**Dicks et al., 2011**).

L'application de la colicine E2 sur les cathéters urinaires empêchent leur colonisation par d'autres souches pathogènes. De plus, la colicine E2 a une activité spécifique dirigée contre *Escherichia coli UPEC* responsable de la majorité des infections urinaires (**Trautner et al., 2005 ; Trivedi et al., 2014**).

*Chapitre III : Produits terroir de la wilaya
de Naama*

1. Présentation de la wilaya de Naama

La wilaya de Naama, se situe dans la partie occidentale des hauts plateaux, aux confins Algéro-Marocains. Elle se décompose en deux grandes zones : une zone steppique au Nord et une zone présaharienne au Sud. Elle couvre une superficie de 29514.14Km².

En raison des conditions environnementaux naturels et l'étendue de ses territoires, le premier secteur économique est l'agropastoralisme ; précisément le pastoralisme. Qui est constitué principalement par l'élevage ovins, bovins, caprins, équins et camelins où l'élevage ovin prédomine. La figure suivante illustre la distribution centésimale moyenne des différents cheptels recensés selon la DSA de Naama.

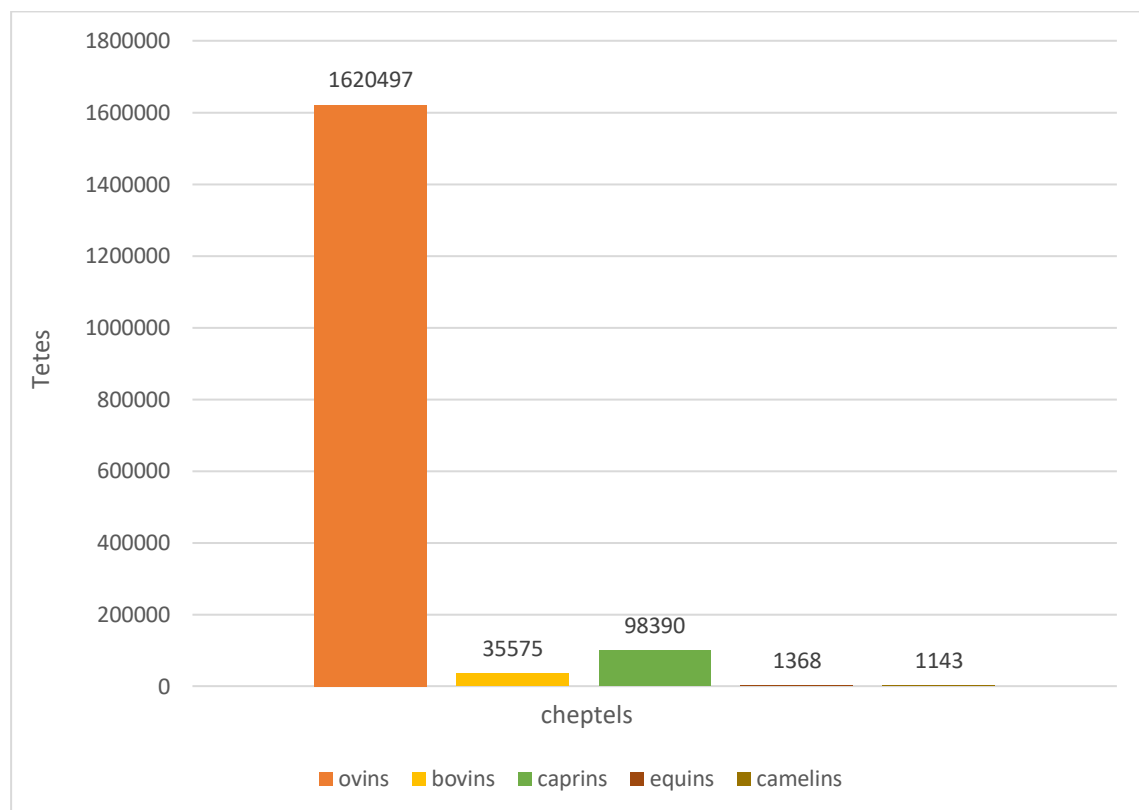


Figure 7 : Distribution centésimale moyenne des différents cheptels recensés dans la wilaya de Naama en 2019 selon DSA de Naama

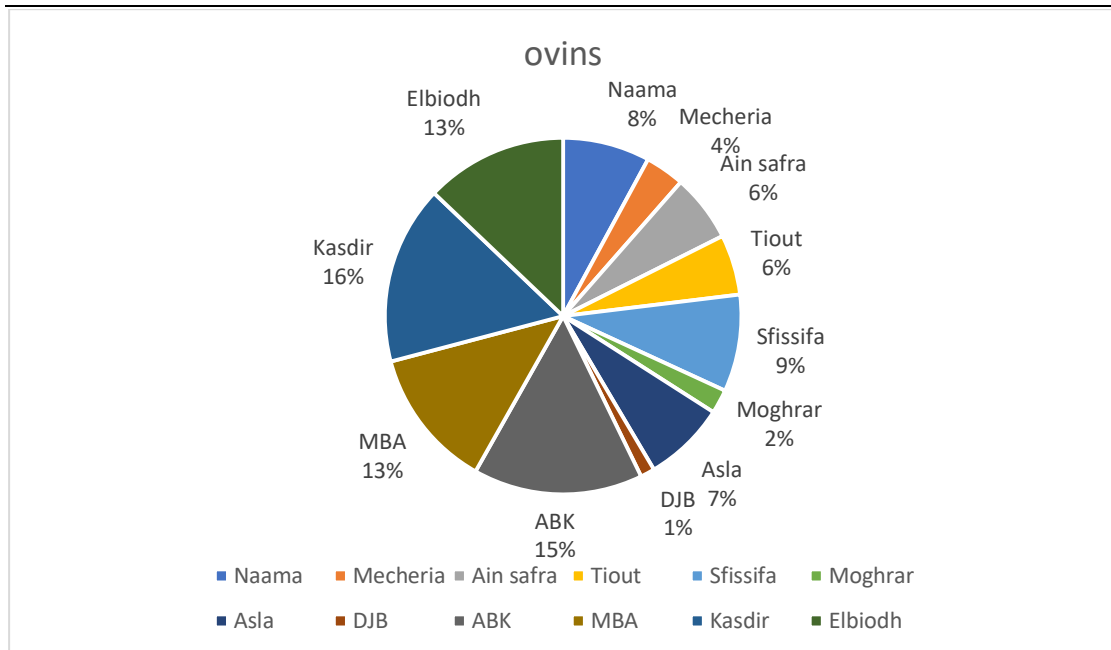


Figure 8 : Répartition du cheptel ovin par commune recensés en 2019 selon DSA de Naama

Parmi les ressources animales pourvoyeuses de denrées carnées, l’ovin est le plus prisé en Algérie et dans la wilaya de naama en particulier. Il l’est aussi pour sa laine qui est encore utilisé dans l’artisanat traditionnel et aussi son lait et ses dérivés.

2. Produits laitier de la wilaya

C’est l’augmentation de la production du lait durant certaines saisons et la difficulté de sa conservation sous la forme fraîche qui a conduit au développement des technologies de productions traditionnelles. La transformation du lait en produits laitiers traditionnels algériens fait partie intégrante de l’héritage et a une grande importance culturelle médicinale et économique (**Lahsaoui, 2009**)

2.1. Laits fermentés

2.1.1. Rayeb

Rayeb (ou *Raib*) est du lait caillé, traditionnellement obtenu après acidification spontanée à température ambiante de lait cru durant une période variant de 24 h à 72 h selon la saison. Le Rayeb est consommé tel quel ou transformé.

La fermentation traditionnelle est associée à des bactéries lactiques mésophiles appartenant aux *Leuconostocs* et aux *Lactococcus* présents naturellement dans les laits crus mis en œuvre, est remplacée par une fermentation plus rapide par des bactéries lactiques thermophiles apportés sous forme de levains (**Bendimerad, 2013**).

2.1.2. Lben

Lben est un produit rafraichissant cultivé obtenu par la fermentation spontanée du lait de vache ou de chèvre. Pour sa fabrication, on laisse le lait à température ambiante jusqu'à coagulation, le produit obtenu s'appelle Rayeb, et ce dernier peut être consommé tel qu'il est ou soumis à l'écémage pour l'obtention du Lben et du beurre frais. Le barattage est effectué manuellement dans une peau de chèvre ou de brebis appelé Chekoua (**Benkerroum & Tamime, 2004**).



Figure 9 : photo de Chekoua

2.2. Dérivé laitiers traditionnels

2.2.1. Zebda

C'est du beurre frais obtenu après barattage du lait fermenté appelé « Rayeb », une quantité d'eau tiède (40-50°C) est ajoutée à la fin du barattage pour favoriser l'agglomération des globules gras et l'augmentation du rendement. Au cours du barattage mécanique, les globules gras flottent à la surface du « Lben » ils sont séparés par une cuillère perforée, le beurre frais obtenu a une forte odeur du diacétyl, est possède une consistance molle à cause de la forte teneur en eau (**Tantaoui & Elmarakchi, 1987**).

2.2.2. Smen

Le Smen est la Zebda ou Dhen qui est lavé, salé et malaxé, puis conditionné dans des pots en terre cuite fermés hermétiquement et entreposés dans un endroit frais et obscur à température ambiante (Sakili & Issoual, 2003 ; Luquet & Corrieu, 2006). Smen dans la région de Naama prend la dénomination de Dhan sa spécificité locale se résume par l'addition de certain plante aromatique qui sont additionnés au moment de salage, les plus utilisé sont *Genévrier* (Araar) ou *Anacyclus* (Guertoufa).

2.3. Fromage artisanale

Selon la norme FAO/OMS A-6 (1978 modifiée en 1990), "Le fromage est le produit frais ou affiné, solide ou semi-solide, dans lequel le rapport protéines de lactosérum/caséine n'excède pas celui du lait".

2.3.1. Klila

Klila est un fromage traditionnel préparé empiriquement par les familles algériennes et marocaines. Il est produit pour éviter la dégradation du Lben durant la phase de stockage principalement en printemps et en été ou le lait est abondant (Benkerroum & Tamime, 2004). Consommé sous forme de fromage blanc frais, ou bien il est inséré dans des préparations culinaire après découpage et séchage au soleil pendant quelque jours (2-3 jours) (Mennane et al., 2007 ; Leksir & Chemmam, 2015).



Figure 10 : photo du Klila, Produit laitiers traditionnel.

La préparation de Klila débute par la coagulation du lait (de vache, de brebis, de chèvre) pendant 24h à 72 h (selon la saison) en Rayeb puis écrémé dans une Chekoua.

L'écémage est réalisé comme suit : la Chekoua est remplie à moitié de Rayeb puis tendue par gonflement, bien nouée et secouée vigoureusement durant une demi-heure. La formation des globules gras (beurre) est indiquée par le changement qui se produit à l'intérieur de la Chekoua ; pour aider l'agglomération des particules du beurre, l'eau froide est ajouté : le beurre obtenu est retiré manuellement en une seule motte appelé zebda bedouia ou beldia ou semnah, le petit lait restant est appelé « Lben » (Zad, 1998). Ce même produit est chauffé modérément (55°C à 75°C) jusqu'à séparation du lactosérum (10 à 15 min) ; la phase aqueuse (lactosérum) est séparée et le coagulum obtenu est appelé Klila qui est consommé frais ou séché au soleil pendant 03 jours pour obtenir un fromage dur (Mennane et al., 2007).

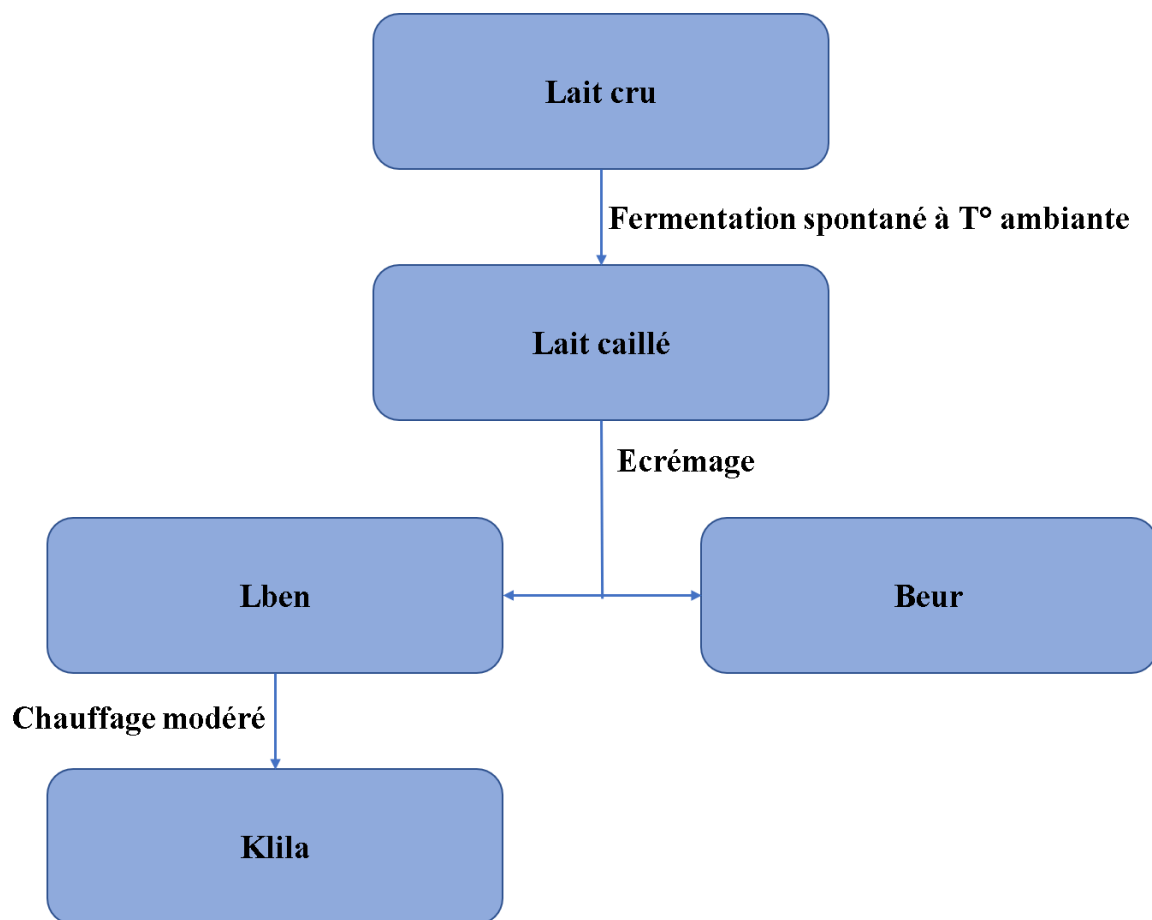


Figure 11 : Diagramme de fabrication artisanal du Klila

2.3.2. Jben

Le J'ben est un produit laitier connu et consommé en Algérie depuis fort longtemps au niveau des zones steppiques et sahariennes aussi bien en milieu rural qu'en milieu urbain. Ce fromage est le produit d'une transformation des laits d'un cheptel diversifié et d'une fermentation par une flore lactique indigène (**Ouadghiri et al., 2005**).



Figure 12 : photo du Jben, Produit laitiers traditionnel.

Ce fromage est généralement obtenu par macération de certaines plantes (fleurs de chardon ; *Cynara cardunculus L*, *Cynara scolymus*) dans le lait (de vache ou de brebis) pour assurer la coagulation ou par ajout de caillette séchée de jeunes ruminants ce que on appelle el Hakka au lait, et l'égouttage se fait dans une mousseline pendant 2 à 3 jours suivant la saison. Le coagulum obtenu après cette opération représente le j'ben (**Ouadghiri et al., 2005**). Après coagulation du lait, le caillé est collecté et enroulé dans un tissu propre puis pressé pour égouttage. Un fois égoutté, il peut être salé ou additionné de quelques épices ou de plantes aromatiques, le caillé est découpé en petits morceaux irréguliers (**Lahsaoui, 2009**).



Figure 13 : *photo de 'El Hakka' (la présure)*

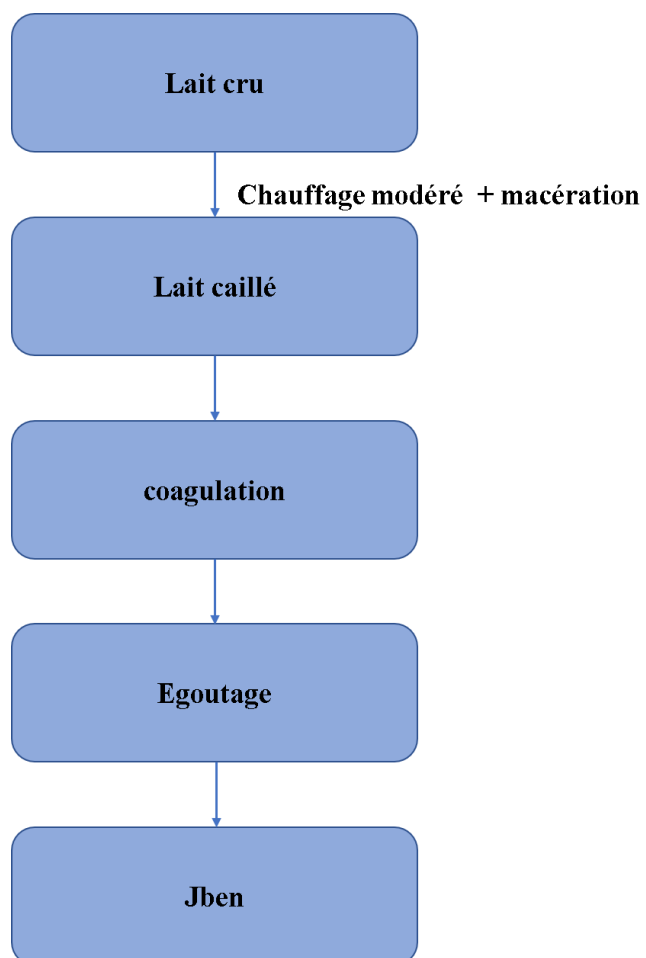


Figure 14 : *Diagramme de fabrication artisanal du Jben*

Partie II : Matériel et Méthodes

Les différentes analyses réalisées dans cette étude ont été menées aux laboratoires pédagogiques de Microbiologie du Centre Universitaire Salhi Ahmed Naama.

Les objectifs de cette étude s'articulent autour des points suivants :

- ▣ Isolement et purification des entérocoques producteurs des bactériocines à partir de fromages artisanaux Klila et Jben à base de lait de brebis,
- ▣ Identification phénotypique des isolats,
- ▣ Extraction et la purification des bactériocines,
- ▣ Tester la capacité antimicrobienne de ces bactériocines.

1. Echantillonnage

Six échantillons (06) décrits comme produits du terroir de la région de Naama ; trois de Jben et trois de Klila ; de fabrication artisanale à base de lait cru de brebis (diagramme de préparation traditionnelle présentés dans **les figures 11 et 14**) ; ont été collectés durant les mois de Février et Mars (la saison de printemps) de l'année 2020. La récolte a été réalisée au niveau d'une ferme privé d'élevage semi-intensif située dans la région de Sfissifa.

Tableau 2 : Répartition des échantillons au cours du temps

N° d'échantillon	Matière	Date du Prélèvement	Date de L'analyse
E1	Jben	16/02/2020	17/02/2020
E2	Klila	17/02/2020	18/02/2020
E3	Jben	02/03/2020	03/03/2020
E4	Klila	02/03/2020	03/03/2020
E5	Jben	08/03/2020	09/03/2020
E6	Klila	08/03/2020	09/03/2020

L'échantillonnage a été effectué selon les règles d'hygiène et d'asepsies recommandées en microbiologie, les échantillons ont été recueillis dans des sachets stériles, conservés dans une glacière et transportés au laboratoire pour analyse.

A. Etude microbiologique du Klila et Jben

Cette analyse va nous permettre d'avoir une idée sur la constitution microbiologique du fromage artisanal (Klila et Jben) à base de lait cru de brebis produit dans cette région. Elle comporte le dénombrement et/ou la recherche des flores suivantes :

- ▣ Flore aérobie mésophile totale,
- ▣ Coliformes et les coliformes thermotolérants,
- ▣ Salmonelles,
- ▣ Streptocoques (Entérocoques),
- ▣ Staphylocoques,
- ▣ Anaérobies Sulfite réducteurs,
- ▣ Levures et moisissures.

1. Préparation des dilutions décimales. Selon la norme (NF V 08-010,1996)

La réalisation des analyses microbiologiques nécessite d'effectuer une série de dilutions décimales allant de la dilution 10^{-1} jusqu'à la dilution voulue. La méthode de dilution consiste à introduire 10g de fromage artisanal dans un flacon contenant 90ml de TSE (Tryptone Sel Eau) suivi d'une bonne agitation, c'est la solution mère. Ensuite avec une pipette stérile on prélève 1 ml de la solution mère et on l'introduit dans un tube contenant 9ml du diluant avec une homogénéisation [Dilution 10^{-1}], jusqu'à l'obtention de la dernière dilution. Durant la réalisation des dilutions décimales, il faut respecter les règles d'asepsie et aussi changer la pipette après chaque utilisation.

2. Dénombrement de la flore aérobie mésophile totale à 30 °C (FAMT)

Cette flore est un bon indicateur de la qualité générale et de la stabilité des produits. Le dénombrement a été réalisé sur gélose PCA (Plat Count Agar), par ensemencement en masse d'1 ml de chacune de solution mère et la dilution décimales de 10^{-2} et 10^{-3} en double suivi d'une incubation à 30 °C pendant 72 h en aérobiose. On compte les colonies lenticulaires ayant poussé en masse. Le dénombrement a été effectué à l'aide d'un compteur de colonies, en tenant compte uniquement des boîtes contenant entre 30 et 300 colonies (**Boussouar, 2017**). On calcule le nombre de microorganismes par ml à l'aide de la formule suivante :

$$N = \frac{\Sigma C}{(n_1 + 0.1n_2)d}$$

Où

ΣC : La somme des colonies comptées sur toutes les boites retenues ;

n_1 : Le nombre de boites retenues à la première dilution ;

n_2 : Le nombre de boites retenues à la deuxième dilution ;

d : le taux de dilution correspondant à la première dilution.

3. Dénombrement des coliformes totaux et coliformes thermotolérants (NF V 08-050 et NF V 08-060)

Ce dénombrement consiste à ensemercer en profondeur, dans les mêmes conditions, une quantité déterminée (1ml) de la solution mère et des dilutions décimales 10^{-1} et 10^{-2} dans un milieu gélosé de Désoxycolate coulé dans une boîte de Pétri. Recouvrir les boites avec une couche du même milieu, et les incuber à 30 °C pendant 24 h pour les coliformes totaux et à 44°C pour les coliformes thermotolérants.

Le dénombrement repose sur le comptage des colonies caractéristiques qui sont violacées, d'un diamètre de 0,5 mm ou plus, et parfois sont entourées d'une zone rougeâtre due à la précipitation de la bile. Retenir les boîtes contenant moins de 150 colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques au niveau de deux dilutions successives. Il faut qu'une boîte renferme au moins 15 colonies caractéristiques. Calculer le nombre N de coliformes/coliformes thermotolérants par millilitre, en tant que moyenne pondérée, à l'aide de l'équation suivante :

$$N = \frac{\Sigma C}{1,1d}$$

Où

ΣC : la somme des colonies caractéristiques comptées sur les deux boîtes retenues ;

d : le taux de dilution correspondant à la première dilution comptée.

4. Dénombrement des Streptocoques du groupe D

Le dénombrement se fait en milieu liquide sélectif par la technique du nombre le plus probable (NPP), en deux étapes successives (**Guiraud, 2003**) :

4.1. Test présomptif : Le milieu (Rothe), un milieu d'enrichissement relativement sélectif, est ensemençé en triple, à partir de chaque dilution 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} . Après 24 h d'incubation à 37 °C, la présence d'un trouble microbien permet de conclure que dans les tubes correspondants ont cultivé au moins un Streptocoque fécal présumé provenant de l'inoculum.

4.2. Test confirmatif : Chaque tube positif du test de présomption a fait l'objet d'une confirmation. On utilise l'action de deux agents sélectifs, l'azide et l'éthyle-violet (ou violet hexaméthylé) en repiquant une anse des tubes positifs dans le milieu de Litsky. Après incubation à 37°C pendant 24 heures, l'apparition d'un trouble homogène avec parfois une pastille violette au fond du tube permet de dire qu'il y a au moins un *Streptocoque fécal* dans l'inoculum.

4.3. Dénombrement : le dénombrement est exprimé selon la table de **Mc Grady**.

5. Recherche des Salmonelles

Selon le **JORA n° 42 du 15 juin 2005** la recherche des salmonelles dans les produits laitiers implique les étapes suivantes :

5.1. Pré enrichissement en milieu liquide non sélectif

25 g du fromage artisanal à analyser sont introduits dans un flacon contenant 225 ml d'eau peptonée tamponnée préalablement stérilisé. Les préparations sont homogénéisées sur vortex et incubées à 37°C pendant 16 à 20 heures.

5.2. Enrichissement en milieux sélectifs liquides

A partir des cultures obtenues en pré enrichissement on ensemence un bouillon Rappaport Vassiliadis par un volume de 0,1 ml en double et sont incubés à 42°C, pendant 24 h.

5.3. Isolement

À partir des cultures obtenues en enrichissement, on ensemence avec une anse de platine en surface deux boîtes contenant le milieu Hecktoen. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 h. Seront considérées comme positif les boîtes présentant des colonies typiques ayant des aspects caractéristiques des Salmonelles

- Colonies vertes ou bleuâtres (absence de fermentation des sucres) indique la possibilité de *Shigella* ou *Salmonella* non productrices d' H_2S ;
- Colonies vertes à centre noir indique la possibilité de *Salmonella* ;
- Colonies saumon ou jaunes éliminent la possibilité de *Salmonella* ou *Shigella* (sauf *Shigella sonnei*).

6. Recherche des Staphylocoques (JORA n° 68 du 23 novembre 2014)

Consiste à ensemencer en surface un milieu de culture gélosé sélectif (100 ml de la gélose Baird Parker, 5 ml du surnageant de l'émulsion de jaune d'œuf, 1 ml de Tellurite de potassium) coulé dans une boîte de Pétri, avec 0,1 ml de la solution mère en double.

Après 24 à 48 heures d'incubation à 37 °C, les colonies noires (réduction de tellurite en tellure noire), brillantes et convexes (1,5 à 2,5 mm de diamètre après 48 heures d'incubation) entourées d'une auréole d'éclaircissement (hydrolyse des protéines de jaune d'œuf) avec un liseré blanc opaque (hydrolyse des lécithines) sont dénombrées.

Pour s'assurer qu'il s'agit bien de colonie de *Staphylococcus aureus*, une recherche de catalase est effectuée sur 2 à 3 colonies par boîtes Pétri (Lebres et al., 2002).

7. Recherche des anaérobies sulfito-réducteurs

Après destruction des formes végétatives, par chauffage à 80 °C pendant 10 minutes de 5 ml en double des dilutions 10^{-1} et 10^{-2} de l'échantillon, et refroidissement immédiat par l'eau de robinet pendant 10 minutes. Ces prélèvements sont incorporés dans des tubes à vis stériles contenant un milieu de base fondu, régénéré, additionné de sulfite de sodium et de sels de fer (le milieu viande foie). Après incubation à 37°C, les colonies noires ayant poussées en profondeur sont comptées après 18 h, 48 h et 72 h (Guiraud, 2003).

8. Dénombrement des moisissures et levures

Ensemencement en profondeur d'un milieu de base OGA, en double d'1 ml des dilutions 10^{-5} de l'échantillon. Les boîtes sont incubées pendant 5 jours à une température de 22 °C.

B. Recherche et identification des bactéries productrices des bactériocines

1. Isolements des entérocoques

L'isolement des entérocoques a été réalisé en deux étapes, après dénombrement des *Streptocoques* du groupe D (fécaux), on a repiqué les tubes positifs du bouillon Litsky dans du bouillon BHIB, et en parallèle un milieu de culture sélectif solide CATC (Citate Azide Tween Carbonate) a été ensemencé en profondeur avec 1 ml de solution mère, et 1 ml de chaque dilution 10^{-1} et 10^{-2} . L'incubation s'est effectuée à 37°C et 42°C pendant 24 à 48h (Boussouar, 2017).

2. Purification des isolats

Des essais préliminaires ont été réalisés portant sur l'utilisation de plusieurs milieux (M17, MRS, CATC, BHIA) de culture afin de maintenir le milieu de culture le plus adéquat pour ce type de bactéries lactiques. Après une constatation visuelle des aspects culturels sur les différents milieux de culture solide, on a sélectionné les colonies distinctes. Ensuite nous les avons purifiés sur les mêmes milieux dont elles ont été issues en alternance entre milieu solide et milieu liquide (MRS et BHIB), et dans les mêmes conditions.

Après croissance des colonies en boîte, on prend de chaque boîte une colonie isolée sur laquelle seront effectuées une coloration de Gram ainsi que la recherche de la catalase. Les bactéries à Gram positif, et catalase négative sont retenues et repiquées sur bouillon MRS ou BHIB, puis incubées à 42°C pendant 18 h. Une dernière purification a été réalisée sur le milieu CATC où les entérocoques apparaissent sous forme de petites colonies, rose-rouge ou marron, lisses, légèrement bombées dont la pureté est estimée par observation microscopique après coloration de Gram (Balows et al., 1992 ; Domig, 2003 ; Heleni et al., 2006).

3. Conservation des souches

La conservation des souches pures a été faite selon deux méthodes : à court et à long terme.

3.1. Conservation à court terme

La conservation des isolats purifiés est réalisée par ensemencement sur bouillon BHI. Après incubation à 37°C pendant 18 heures, les tubes sont conservés à + 4°C, Le renouvellement des cultures se fera toutes les trois semaines (Saidi et al., 2002).

3.2. Conservation à long terme

Des jeunes cultures (18h) sont conservés dans milieu de culture de conservation. Le milieu de conservation contient du bouillon MRS ou BHI additionné de 30% de glycérol. Les cultures sont conservées en suspension dense et en cryotubes à -20°C. En cas de besoin, les cultures sont repiquées dans le bouillon BHI, avant utilisation (**Badis et al., 2004 ; Saidi et al., 2002**).

4. Identifications bactériennes

4.1. Identification phénotypique des isolats

Après purification, coloration de Gram et test de catalase, les isolats ; qui sont retenus ; seront caractérisés phénotypiquement, en recherchant plusieurs attributs physiologiques et biochimiques.

4.2. Identification physiologique des isolats

4.2.1. Croissance à différentes températures

Ce test est important, car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles. Ce teste a été réalisé par ensemencement d'une culture jeune à 18h dans un bouillon adéquat (MRS/M17). Les tubes sont incubés aux températures 10°C pendant sept à dix jours et à 45,50 °C pendant 24/ 48 heures, et pour thermo-résistance à 63°C pendant 30 min dans le bain marie et puis ré-incubation à 37°C. Au bout de ces délais, la croissance est appréciée par examen des milieux. (**Badis et al., 2005**).

4.2.2. Croissance dans des conditions hostiles

Ce test a pour but de voir la capacité des bactéries de croître dans différentes concentrations de NaCl : 4 % ; 6,5 % et 9 % et à des pH 4 et 9,6 sur bouillon MRS et incubé à 37 °C pendant 24 à 48h. la croissance est décelée par l'apparition d'un trouble (**Guessas et al., 2006**).

4.2.3. Recherche de type fermentaire

Ce test permet de différencier les bactéries lactiques homofermentaires de celles hétérofermentaires. Il consiste à mettre en évidence la production de gaz (CO₂) à partir du glucose. Pour se faire, le bouillon MRS est ensemencé par les pré-cultures bactériennes, puis un bouchon de la gélose blanche stérile est coulé en surface. Après incubation, les isolats hétérofermentaires producteurs de gaz poussent le bouchon de la gélose en haut (**Boussouar, 2017**).

4.3. Identification biochimique des isolats

4.3.1. Recherche de la catalase

Les bactéries lactiques sont aérobies anaérobies facultatives et ne possèdent pas l'enzyme catalase pour dégrader le peroxyde d'hydrogène en oxygène et eau. Pour ce test une goutte de H₂O₂ à 10% est déposée sur une lame en verre propre et une quantité de colonie prélevée à l'aide d'une anse stérile y est ajoutée, le résultat est positif lorsqu'il y a apparition de bulles représentant le dégagement d'O₂. Seules les colonies négatives au test de catalase ont été retenues pour la suite des analyses (**Larpen et al., 1990**).

Cette enzyme est capable de décomposer l'eau oxygénée selon la réaction :



4.3.2. Mannitol mobilité

Le mannitol est un produit de réduction du D-mannose. Il permet de rechercher simultanément la fermentation du mannitol et la mobilité. On a ensemencé les souches étudiées dans le milieu par piqûre centrale, et incubé à 37°C pendant 24h. Le virage au jaune du milieu indique la fermentation du mannitol, une diffusion dans la gélose indique la mobilité des bactéries (**Marchal et al, 1991**).

4.3.3. Hydrolyse de l'esculine

L'hydrolyse de cet hétéroside est mise en évidence sur le milieu gélosé à l'esculine (**Devoyode & Poullain, 1988 ; Larpen-Gourgau et al., 1997**), l'hydrolyse de l'esculine est un des critères usuels de l'identification au sein de nombreux groupes bactériens. L'esculine est un hétéroside. Son hydrolyse, catalysée par une β- glucosidase et l'esculinase, libère du glucose et l'aglycone : l'esculéine. Produite réagit avec les ions de fer III pour former un précipité noir dans le milieu. Le milieu utilisé est le bouillon à l'esculine. Après 24h-48h à 37°C d'incubation, le résultat se traduit par un noircissement du tube.

4.3.4. Utilisation du Citrate

Le milieu Citrate de Simmons coulé en tubes est utilisé pour l'étude de l'utilisation du citrate comme seule source de carbone par les germes. Il contient un indicateur de pH qui est le bleu de bromothymol, ce qui confère au milieu une coloration verte à l'état acide. Les germes sont ensemencés en stries sur les tubes qui contiennent le milieu de citrate de Simmons incliné, puis incubé à 37°C / 24h. Les germes qui utilisent le citrate comme seule source de carbone entraînent une alcalinisation du milieu, d'où le virage du vert au bleu (**Boussouar, 2017**).

4.3.5. Tolérance au tellurite

La tolérance au tellurite a été recherchée par ensemencement, en stries très serrées, sur une gélose à 0.04% de tellurite potassium par les souches lactique à tester. Après 24h d'incubation à 37°C, les souches résistantes donnent des colonies noires.

4.3.6. Test d'hémolyse

Le caractère hémolytique a été recherché par ensemencement en stries de la gélose au sang et gélose Columbia additionné de 5% du sang défibriné humain. Après incubation pendant une période de 24h à 37°C, le type d'hémolyse a été examiné.

Les entérocoques peuvent être α hémolytiques (couleur verte autour des colonies) ; β -hémolytiques (éclaircissement autour des colonies) ou γ hémolytiques (le milieu n'est pas modifié).

4.3.7. Identification des isolats par la galerie API 20 STREP (Biomerieux)

L'API 20 Strep est un système standardisé associant 20 tests biochimiques qui présentent un grand pouvoir discriminant. Il permet de faire un diagnostic de groupe ou d'espèce pour la plupart des streptocoques, entérocoques et pour les germes apparentés les plus courants.

Principe

La galerie API 20 STREP comporte 20 microtubes contenant les substrats déshydratés pour la mise en évidence d'activités enzymatiques ou de fermentation de sucres. Les tests enzymatiques sont inoculés avec une suspension dense, réalisée à partir d'une culture pure, qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests de fermentation sont inoculés avec un milieu enrichi (contenant un indicateur de pH) qui réhydrate les sucres. La fermentation des carbohydrates entraîne une acidification se traduisant par un virage spontané de l'indicateur coloré. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification (Boussouar, 2017).

5. Détection des bactéries potentiellement bactériocinogène

Les nombreuses méthodes décrites pour la détection de souches lactiques productrices de bactériocines sont basées sur le principe que ces substances protéiques peuvent diffuser dans un milieu de culture solide ou semi solide qu'on inocule préalablement avec une souche cible. La production de bactériocine est détectée par le pouvoir inhibiteur du filtrat du micro-organisme testé sur la croissance du germe cible (Benkerroum et al., 1993). On a utilisé six

souches bactériennes comme indicatrices après la confirmation de leurs puretés (coloration de Gram et test catalase) ; des bactéries Gram positif *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* et *Listeria monocytogenes* et des bactéries Gram négatif *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*.

5.1. Méthode de disque

Dans cette méthode, un tapis de la souche indicatrice est réalisé sur la surface d'un milieu Mueller Hinton (DO660 varie entre 0.08 et 0.1 correspondent à 0.5 McFarland), ensuite des disques stériles de papier Whatman imbibés avec 10 µl de la culture jeune à tester sont déposés sur ce tapis. Une fois les boîtes sont séchées à une température ambiante, elles sont incubées à 37°C pendant 24h, les boîtes sont examinées pour la présence des zones d'inhibition (Berecka et al., 2009).

5.2. Méthode de diffusion par puits (Barefoot et Klaenhammer, 1983)

Cette méthode a été modifiée par plusieurs auteurs comme Puizani et al., 1992.

Cette méthode consiste à :

On aensemencé des souches productrices de substances inhibitrices dans du milieu MRS liquide et incubées à 37°C pendant 16 à 24h en anaérobiose, ce qui évite la formation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Après incubation, le milieu est centrifugé (8000 tr/min, 10 min) et le surnageant est alors séparé du culot et filtré à l'aide d'un filtre Millipore de 0.45 µm et neutralisé avec du NAOH (N1) afin d'avoir un pH de 6,8-7 et il est conservé à 4°C.

Ensuite une boîte de Pétri contenant du Müller Hinton solide estensemencée par la souche test initialement préparée (DO = 0,08 - 0,1 à 660nm) par écouvillonnage. On laisse les boîtes sécher à température ambiante pendant 30minutes, des puits sont ensuite réalisés avec un emporte-pièce ou une cloche de durham stérile. Ces puits recevront 100 µl du surnageant brut de la culture à tester et les boîtes seront mises à 4°C pendant 2heures pour permettre une bonne diffusion du surnageant. Les boîtes sont ensuite incubées pendant 24 h à 37°C en anaérobiose, afin d'éviter la présence de l'air nécessaire à la formation du peroxyde d'hydrogène.

C. Purification des bactériocines

1. Détection de l'activité bactériocinogène

Afin de concentrer les bactériocines éventuellement produites par les souches lactiques, deux méthodes ont été choisies : la méthode d'adsorption-désorption et la méthode de précipitation au sulfate d'ammonium. Le bouillon MRS a été supplémenté par 2.5% d'extrait de levure dans le but de maximiser le rendement en bactériocines (**Benkerroum et al., 2000**).

1.1. Précipitation au sulfate d'ammonium

Dans cette méthode, une quantité de 200 ml de bouillon MRS fortifié par de l'extrait de levure comme précédemment a été inoculée par 1% d'une pré-culture de la souche test. Après incubation à 32°C pendant 24H, une centrifugation (12000 g, 15 min, 4°C) a été réalisée et le surnageant obtenu est saturé à 60% par ajout progressif de 36.1% (P/V) de sulfate d'ammonium en poudre avec agitation modérée à 4°C pendant 2H. Après une deuxième centrifugation, le culot résultant est dissout dans 4 ml du tampon phosphate de sodium (0.1M, pH : 6). La solution ainsi obtenue est soumise à une dialyse à 4°C contre de l'eau distillée pendant une nuit avec agitation pour éliminer le sel, stérilisée par filtration sur membrane (0.22 µm) puis conservée au congélateur jusqu'à son utilisation.

Après récupération des solutions dialysées, celles-ci ont été stérilisées par filtration sur membrane puis conservées au congélateur jusqu'à leur utilisation. Pour pallier au manque de membranes à dialyse, l'effet des acides organiques a été éliminé par ajustement du pH des solutions à 7 (**Ababsa, 2012**).

1.2. Test de l'activité bactériocinogène

Le spectre d'activité sur milieu solide des bactériocines purifiées a été déterminé sur des souches indicatrices. L'activité inhibitrice a été mise en évidence par la méthode des spots. Un aliquote de 10 µl de la bactériocine pure mise en solution dans de l'eau ultra-pure est utilisé pour le test et l'évaluation de l'activité est faite par l'observation et la mesure du diamètre d'inhibition. Le test est refait 4 à 5 fois afin de confirmer le résultat (**Hammi, 2016**).

C'était prévue d'appliquer les méthodes décrites ci-dessus, mais à cause de situation actuelle de confinement imposé au niveau national et international nous avons réalisé que l'étude microbiologique des quatre premiers échantillons avec la purification des entérocoques à partir de ces échantillons. Cependant, et vue de l'absence des résultats voulus nous avons intégré une troisième partie qui englobe à la fois les processus analytiques et la nanoconjugaison des bactériocines.

*Partie III : Nouvelles méthodes de
détection des bactériocines : Review
bibliographique*

L'accroissement de la demande pour des aliments salubres et aussi des dangers possibles associés aux aliments conservés chimiquement nécessitent la recherche des alternatives, par conséquent les bactériocines ; notamment celle qui sont produit par les bactéries lactiques ; ont attiré l'attention des scientifiques afin de réduire l'utilisation d'additifs alimentaires synthétiques et de renforcer la bioconservation.

Cette partie de travail couvre la diversité des sources des bactéries lactiques productrices des bactériocines, les méthodes de dépistage, purification et de la caractérisation des bactériocines au cours de ces dernières années, enfin elle couvre aussi une nouvelle approche qui a surmonté les limites d'utilisation des bactériocines dans l'industrie agroalimentaire qu'est l'association de la biotechnologie avec la nanotechnologie.

1. Criblage

1.1. Source de bactériocines

Les bactériocines découvertes au cours des six dernières années ont été isolées à partir des aliments, en particulier les aliments fermentés (**Rasheed et al., 2020 ; Sonbol et al., 2020**), les animaux, en particulier les intestins (**Lv et al., 2018**), les humains, en particulier les excréments humains (**Samson & Koshy., 2018 ; Maldonado-Barragán et al., 2016**) et l'environnement, en particulier le sol (**Lim & Balolong., 2016 ; Pierre et al., 2019**). Parce que les sources de bactériocine sont assez diverses, des ressources importantes doivent être investi dans les processus de leur criblage (**Jiong et al., 2018**)

1.2. Méthodes typiques de criblage

Lors de la recherche de nouvelles bactériocines dans les matrices alimentaires et non alimentaires, la première étape c'est l'évaluation de l'activité antimicrobienne des bactéries productrices isolé de ces matrices. Les tests les plus populaires dans ce cas sont l'essai « Spot-on-lawn », l'essai de diffusion sur disque, l'essai de diffusion sur puits d'agar et l'essai sur plaque de microtitrage (**Pingitore et al., 2007**)

Ces méthodes conventionnelles sont basées sur la réaction de la souche indicatrice au surnageant contenant la bactériocine. Tous les tests, à l'exception du test sur plaque de microtitration, sont destinés à mesurer la zone claire autour de la spot, disque immergé ou bien puit rempli avec le surnageant contenant la bactériocine (**Kaškonienė et al., 2017**). Alors que dans le test sur plaque de microtitrage, la turbidité de la solution de la souche indicatrice et de

la bactériocine est mesurée après 24 h à 600 nm. L'avantage du test sur plaque de microtitration est qu'il permet de mesurer la cinétique de la réaction (**Vijayakumar & Muriana, 2015**).

Les souches indicatrices couramment utilisées sont *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, mais *Listeria monocytogenes* et *Micrococcus luteus* sont également utilisés (**Jiong et al., 2018**).

1.3. Méthodes efficaces de criblage

Il existe plusieurs techniques utilisées pour la détection de l'activité antimicrobienne. Généralement ces techniques sont basées sur la diffusion à travers des milieux de culture solides ou semi-solides pour inhiber la croissance de micro-organismes sensibles (**Wannun et al., 2016**). L'utilisation de microorganismes indicateurs est limitée aux souches sensibles aux composés antimicrobiens alors que les souches qui sont résistantes à un composé particulier ne peuvent pas être utilisées pour la détection de l'activité antimicrobienne. Donc, alternativement, un test colorimétrique indépendant de l'indicateur a été utilisé pour déterminer l'activité antimicrobienne, il est à base de vésicules phospholipide/polydiacétylène utilisé pour la détection des peptides agissant sur les membranes. Les bactériocines et les halocines sont des peptides antimicrobiens connus pour tuer les cellules cibles par rupture de la membrane. L'essai consiste à synthétiser des vésicules à l'aide de quatre phospholipides différents : DPPC, DMPC, DMPE et DMPG en combinaison avec le diacétylène monomère 10,12- l'acide tricosadiynoic (TRCDA). Ces vésicules montrent une transition colorimétrique irréversible à 640 nm (du bleu vers le rouge) après interaction avec la nisine. Les vésicules DMPE/TRCDA ont présenté une pigmentation rose avec la réponse colorimétrique la plus élevée (CR %) après traitement avec 5 µM de la nisines en 5 minutes, ce qui suggère la sensibilité de l'analyse et, par conséquent, sélectionné pour le dépistage à haut débit (HTP) des bactériocines et des halocines produites par les bactéries lactiques et les *haloarchaea*, respectivement (**Yadav et al., 2017**).

L'essai a été appliqué par **Yadav et al., (2017)** sur 54 souches de bactéries lactiques et 53 *haloarchaea* pour le dépistage des bactériocines et halocines, respectivement. Parmi ces souches, trois souches de LAB et cinq souches de *haloarchaea* se sont révélées non productrices. Les autres souches ont démontré la présence de bactériocines et d'halocines.

Comparé à d'autres méthodes traditionnelles, s'est avéré que le test colorimétrique est rapide, spécifique et fiable pour le criblage à haut débit des peptides antimicrobiens tels que les bactériocines et les halocines provenant de souches de productrices isolées de diverses ressources naturelles (**Wang et al., 2019**).

Le criblage génétique est aussi largement utilisé ces dernières années pour prouver la présence des gènes codants aux bactériocines notamment la PCR array qui a démontré sa capacité.

La PCR array est une nouvelle méthode qui permet une identification aisée et rapide de la présence de gènes codant pour la bactériocine. Elle est basée sur les gènes connus des bactériocines apparentés aux entérocoques disponibles sur la base de données NCBI GenBank (**Jiong et al., 2018**)

Henning et al., (2015) ont utilisé cette méthode pour cribler 22 isolats d'*Enterococcus* obtenus à partir d'aliments et d'animaux pour leurs activités antimicrobienne contre *Listeria monocytogenes* tout en utilisant 16 séries d'amorces. De ces isolats, 15 contenait deux gènes de bactériocine, sept contenaient trois gènes différents et trois isolats contenaient quatre gènes de bactériocine différents. La présence de multiples gènes de bactériocine suggère un mélange antimicrobien puissant, cependant, cela ne signifie pas nécessairement qu'ils sont tous produits simultanément.

Cependant, les différentes souches de bactéries productrices de bactériocines contiennent différentes séquences de gènes liés aux bactériocines ; Par conséquent, ces nouvelles méthodes de dépistage exigent des paires d'amorces à concevoir pour chaque souche productrice de bactériocine (**Henning et al., 2015**)

Après avoir prouvé la capacité des souches de produire les bactériocines ces souches ont subi par la suite des tests d'identification.

2. Identification

Après le processus de sélection, les souches productrices de bactériocine doivent être identifiés. Typiquement, par des tests physiologiques, biochimiques et par le séquençage des gènes d'ADNr 16S (**Jiong et al., 2018**).

Des paramètres comme, l'effet du pH, le traitement thermique et l'action des enzymes protéolytiques sur les bactériocines sont également effectuées afin d'évaluer le comportement des bactériocines en vue d'une application ultérieure dans différentes matrices alimentaires, ces tests sont également utiles lors de la purification (**Gao et al., 2016 ; Kaškonienė et al., 2017**). Le surnageant de la culture de bactéries est ajusté à différents pH (2,0-12,0), additionné de différentes enzymes protéolytiques, par exemple la trypsine, α -chymotrypsine, ficine, papaïne

et protéinase K (Kaškonienė et al., 2017). L'évaluation de l'effet du NaCl sur la production de bactériocine, est également très précieuse (Castro et al., 2011).

L'activité antibactérienne est aussi évaluée après chauffage à haute température ou autoclavage (Zendo et al., 2005 ; Kabuki et al., 2007). La stabilité de la bactériocine après congélation peut également être évaluée (Castro et al., 2011). Les tests avec des enzymes non protéolytiques, catalase et α -amylase par exemple, sont également effectués (Sahoo et al., 2015).

3. Purification

Après criblage et identification de bactérie productrice de nouvelles bactériocines, l'étape la plus critique et complexe est la purification. Cette étape prend beaucoup de temps et demande beaucoup de travail. Actuellement, les méthodes de purification sont sélectionnées sur la base des propriétés de masse et de charge de la bactériocine. Les méthodes majeures de purification utilisées dans la découverte des bactériocines au cours des six dernières années sont résumées dans le **tableau 3 (Jiong et al., 2018)**.

Parmi les nouvelles bactériocines découvertes au cours de ces dernières années, la plupart ont été identifiées par précipitation au sulfate d'ammonium, chromatographie d'échange d'ions (IEC) ou RP-HPLC. Cependant, parce que la purification la plus appropriée dépend des caractéristiques de la bactériocine d'intérêt, il n'existe pas de méthode unique adaptée à toutes les bactériocines (Jiong et al., 2018).

Tableau 3 : Principales méthodes de purification utilisées pour la découverte de bactériocines au cours des 6 dernières années (**Jiong et al., 2018**)

Bactériocines	Bactérie	Gram	Source	Taille	Processus de purification
BLIS	<i>Pediococcus acidilactici</i> Kp10	+	Caillé de lait iranien sec	/	Précipitation de tensioactifs, extraction au solvant (Wong et al., 2017)
Acidocin	<i>Lactobacillus acidophilus</i> M1	+	Lait acidifié	Approximativement 6600 Da	Précipitation au sulfate d'ammonium, chromatographie sur gel (Mohammed et al., 2017)
Enterocin L11	<i>Enterococcus faecalis</i> L11	+	Traditionnel concombre Chinois fermenté	Approximativement 6800 Da	Extraction à l'éthanol, chromatographie sur glucosane réticulé (Gao et al., 2016)
A3	<i>Weissella confusa</i> A3	+	Produit létier	Approximativement 2700 Da	Précipitation au sulfate d'ammonium, chromatographie d'échange de cations, résine macroréticulaire, RP-HPLC (Goh & Phili, 2015)

Bifidocin A	<i>Bifidobacterium</i> <i>BB04</i>	+	Intestins des centenaires	1198.68 Da	Dialyse, chromatographie échange de cations, chromatographie par filtration sur gel, RP-HPLC (Liu et al., 2015)
Pentocin JL-1	<i>Lactobacillus pentosus</i>	+	Intestins de <i>Chiloscyllium punctatum</i>	2987.23Da	Absorption, élution, lyophilisation, chromatographie d'échange de cations, Chromatographie d'exclusion, HPLC (Jiang et al., 2017)
DY4-2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	<i>Trichiurus lepturus</i>	1465 Da	Extraction à l'acétate d'éthyle, ultrafiltration, Chromatographie d'exclusion, HPLC (Xinran et al., 2018)
SLG10	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>SLG10</i>	+	Kombucha (boisson fermentée traditionnelle dans le sud de la Chine)	1422 Da	Chromatographie sur colonne, élution contrôlée par spectrophotométrie, lyophilisée, RP-HPLC (Jinjin et al., 2019)

Enterocin TJUQ1	<i>Enterococcus faecium</i> TJUQ1	+	Céleri marinée	5520 Da	Précipitation au sulfate d'ammonium, chromatographie phase inversée, chromatographie d'échange de cations (Xiaoxiao et al., 2019)
LF-BZ532	<i>Lactobacillus fermentum</i> BZ532	+	Boisson chinoise aux céréales fermentée (bozai)	1105.563 Da	Précipitation au sulfate d'ammonium, chromatographie d'échange de cations, RP-HPLC (Hafiz et al., 2020)

3.1. Méthodes typiques de purification

Les méthodes de purification conventionnelles consistent généralement à une précipitation au sulfate d'ammonium ou à base de solvant et des techniques basées sur la chromatographie telles que la chromatographie d'échange d'ions, la chromatographie d'interaction hydrophobe, la chromatographie par filtration sur gel et la chromatographie liquide à haute pression en phase inversée (**De Vuyst & Leroy, 2007**).

La purification par précipitation en phase solide, en particulier celle au sulfate d'ammonium nécessite une précipitation graduelle pour obtenir des extraits purs. Toutefois, au cours de ce processus, des ions de sel sont introduits et l'élimination de ces ions complique le processus de purification. La précipitation à l'acétone et l'extraction à l'éthanol sont également utilisées pour l'extraction (**Saraniya & Jeevaratnam, 2014 ; Gao et al., 2016**) ; ces processus sont plus simples et ne nécessitent pas d'étape de dessalage. Alors qu'ils peuvent réduire la bioactivité de la bactériocine. Une autre méthode courante de purification utilise une résine macroporeuse (**Sawa et al., 2013 ; Zhu et al., 2014**).

La purification par résine macroporeuse implique l'utilisation d'isopropanol pour éluer les composés actifs. L'isopropanol doit ensuite être éliminé de la solution d'extraction par évaporation rotative. (**Jiong et al., 2018**).

Après que les composés actifs aient été concentrés lors de la purification du brut, d'autres étapes de purification sont généralement nécessaires dont IEC est l'une des méthodes courantes. Dans cette méthode, la bactériocine cible est séparée des autres impuretés sur la base de ses propriétés de charge. L'IEC est une méthode flexible et peut être optimisée en sélectionnant l'échangeur d'ions le plus approprié et en contrôlant le pH et la force ionique du tampon. Elle peut être utilisée avec un échange d'anions ou de cations. La chromatographie d'échange de cations est plus couramment utilisée pour la purification des bactériocines car la plupart des bactériocines portent des charges négatives. Pendant l'IEC, les tampons de phosphate et d'acétate sont utilisés pour l'élution. Une étape de dessalage est aussi nécessaire, parce que de nombreux sels ioniques sont introduits au cours de ce processus, (**Jiong et al., 2018**).

Parmi les méthodes de purification, on peut citer aussi la GFC, qui consiste à purifier les bactériocines en fonction de leur masse moléculaire. Selon (**Song et al., 2014 ; Jiang et al., 2017**), cette méthode est considérée comme étant l'une des plus largement utilisés. Elle est basée sur la masse moléculaire ou volume hydrodynamique (**Heitz, 1970**). Puisque les masses

moléculaires des bactériocines varient considérablement, diverses colonnes de gel (Sephadex et Sepharose) sont disponibles.

La RP-HPLC est typiquement l'étape finale du processus GFC ; tout comme la majorité des méthodes de purification des bactériocines ; pour confirmer la pureté de la solution (**Jiong et al., 2018**).

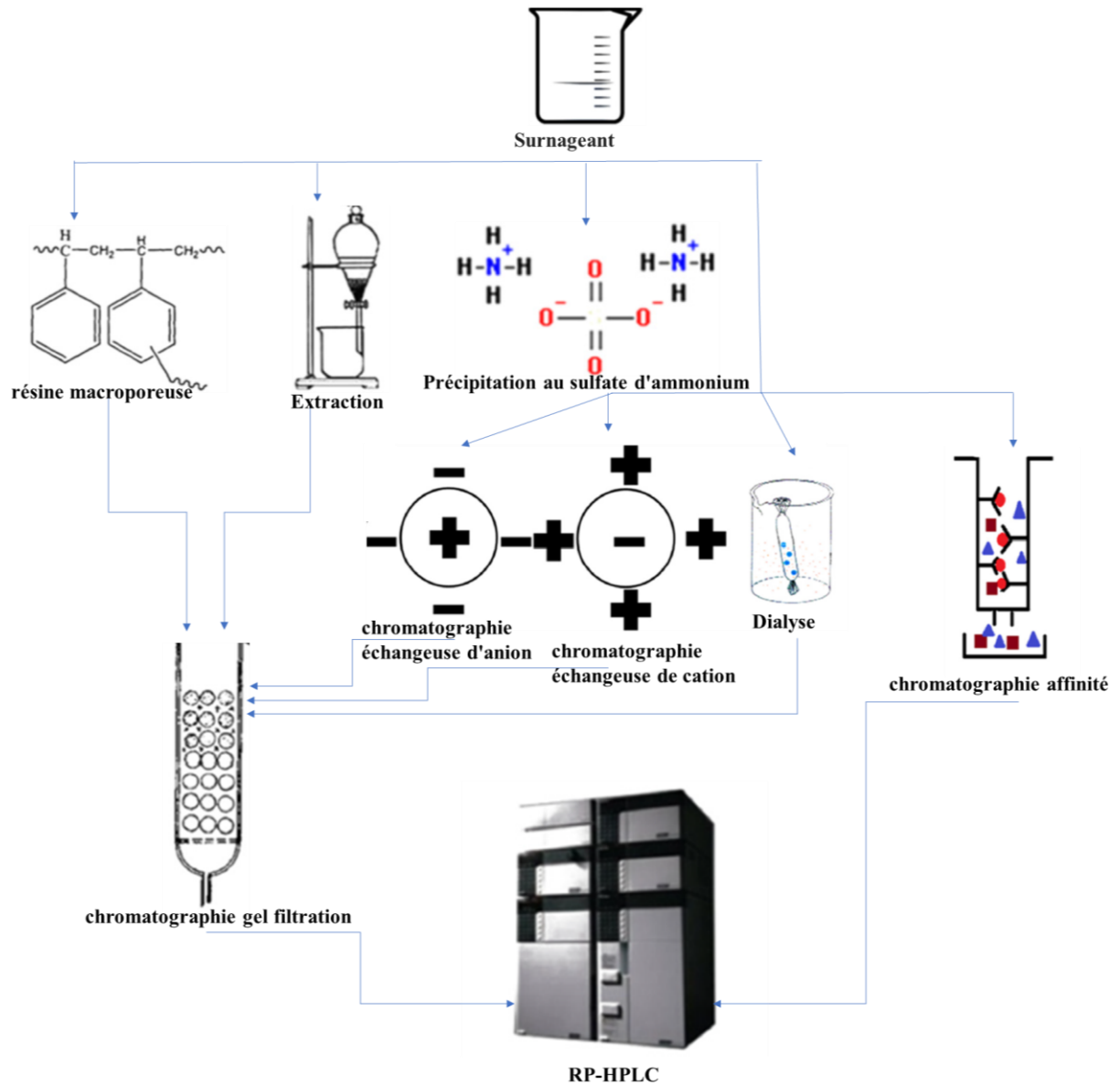


Figure 15 : Diagramme schématisé du processus possibles de purification des bactériocines (**Jiong et al., 2018**)

3.2. Méthodes efficaces de purification

La figure 15 montre que la purification des nouvelles bactériocines peut être un processus incertain et complexe. C'est pourquoi des efforts sont faits pour simplifier le processus de purification (Jiong et al., 2018).

Wong et al., (2017) ont utilisé la précipitation des tensioactifs dans une première tentative pour purifier la bactériocine BLIS du bouillon de fermentation de *Pediococcus acidilactici* Kp10. Dans cette technique, les protéines cibles sont solubilisées à l'intérieur du noyau polaire des micelles (piégeage), et sont stabilisées par l'enveloppe tensioactive qui les protège de la dénaturation par la phase organique. La récupération des protéines du précipité a été réalisée par extraction au solvant, et le type de solvant, la concentration de NaCl et la force ionique de la solution finale ont été optimisés. Les conditions optimales étaient les suivantes : 1,05 mM d'AOT à pH 4 pour la précipitation, et extraction à l'acétone (avec 1 mM de NaCl), ce qui a donné avec un rendement de 86,3 % et un facteur de purification de 53,8. Cette méthode est rapide, simple et rentable, car seules de petites quantités de surfactants sont nécessaires.

ATPs est considérée comme une bonne technique alternative de purification pour la séparation, l'extraction et la concentration des biomolécules en raison de sa productivité élevée, sa simplicité, son temps de traitement court, sa rentabilité, son évolutivité et de sa polyvalence (Norfariza et al., 2018). Deux phases se forment lorsque deux polymères ou sels polymères/inorganiques incompatibles sont mélangés dans l'eau au-dessus d'une certaine concentration critique qui se caractérise par une forte teneur en eau (80/ 90%) et une faible tension interfaciale (Lappe et al., 2012). En général, il existe deux types d'ATPS : un système à base de polymère et un système à base de polymère/sel, dont les exemples les plus courants sont des systèmes à base de polyéthylène glycol (PEG)/dextran et de PEG/phosphate de potassium (Przybycien et al., 2004).

Abbasiliasi et al., (2014) ont purifié aussi une BLIS à partir d'un bouillon de fermentation d'une *Pediococcus acidilactici* Kp10 en utilisant un ATPS composé de PEG et citrate de sodium ; la procédure détaillée est illustrée dans Figure 16. La purification enregistrée était de 8,43 fois avec un rendement de 81,18% atteint à 26,5% PEG (8000) / 11% citrate de sodium avec une longueur de trait (TLL) de 46,38% (p / p), rapport volumique des phases supérieure et inférieure (VR) de 1,8 et 1,8% charge brute à pH 7 sans ajout de NaCl. D'où le potentiel de l'ATPS comme méthode principale de récupération de la bactériocine à partir d'un bouillon de fermentation complexe est évident.

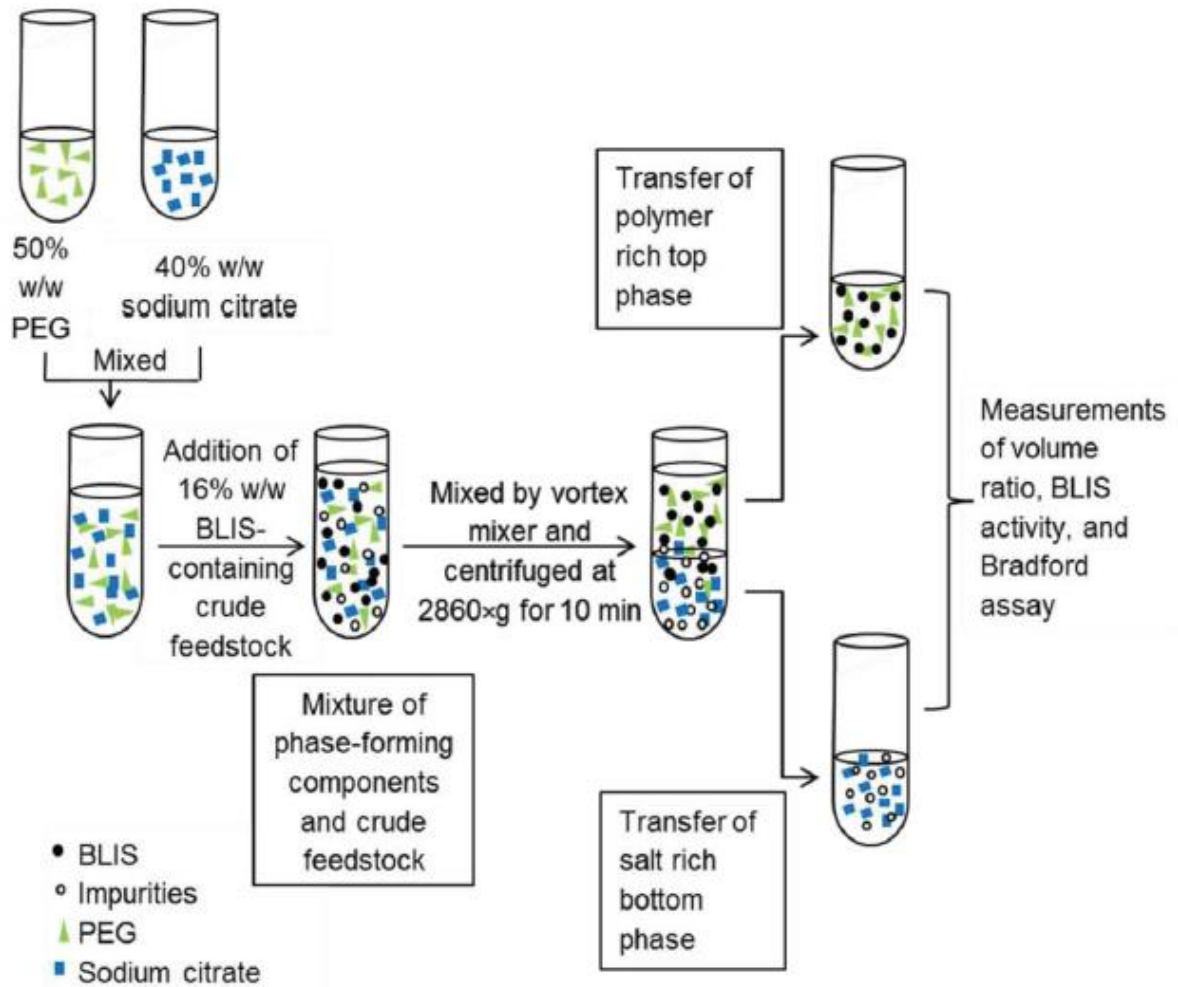


Figure 16 : Diagramme schématique de la purification BLIS via ATPS réalisée par **Abbasiliasi et al., (2014)**

En outre, les chercheurs ont maintenant détourné leur attention vers des programmes de purification de bactériocine qui sont plus simples en termes de conception et de fonctionnement des équipements, de coût et d'économie d'énergie, et des temps de traitement plus courts par rapport aux méthodes traditionnelles basées sur la chromatographie, tout en offrant une meilleure purification (**Norfariza et al., 2018**).

4. Caractérisation

La méthode SDS-PAGE est utilisée pour l'évaluation de la masse molaire approximative de bactériocines nouvellement isolées (**Gray et al., 2006 ; Gao et al., 2015**). Notons que la MALDI-TOF-MS est également un outil utile pour la caractérisation des bactériocines. Cette méthode peut être utilisée pour déterminer la masse moléculaire et la caractérisation structurale

des macromolécules rapidement et facilement avec une grande sensibilité sur une large gamme de masses détectables. Cependant, la présence inévitable de sodium et de potassium dans la solution de l'échantillon signifie que des agglomérats de cations adduits sont couramment détectés par les spectres, ce qui entraîne une sensibilité réduite (**Jiong et al., 2018**).

LC-ESI-MS est aussi utilisée pour déterminer la masse moléculaire et la séquence d'acides aminés des bactériocines. Cette technique a l'avantage d'être très spécifique et sensible et offre la possibilité d'applications à haut débit. Cependant, les composants de la matrice de co-élution facilement négligeables dans les chromatogrammes peuvent avoir des effets néfastes sur les analyses, car ils peuvent conduire à l'amélioration de l'analyte ou la suppression des ions (**Eeckhaut et al., 2010 ; Jiong et al., 2018**).

On peut voir que l'ensemble du processus analytique comprend plusieurs étapes : le criblage de l'activité antibactérienne, la purification et la concentration de la bactériocine et enfin la détection et la caractérisation. Donc le choix de la méthode appropriée doit être en fonction de l'objectif de la recherche (confirmation de la présence de bactériocine ou caractérisation et purification détaillées), de la quantité d'échantillons analysés, de la sensibilité de la méthode et le prix (**Norfariza et al., 2018 ; Kaškonienė et al., 2017**).

En plus des limites associées au processus analytique, il y'a aussi celles qui sont associées à utilisation des bactériocines comme conservateurs alimentaires naturels. Parmi ces limites citons à titre indicatif :

- ▣ Leur spectre d'activité restreint, qui ne permet d'éliminer que certaines bactéries étroitement apparentées qui altèrent les aliments.
- ▣ Leur besoin de dosage élevé pour inhiber les bactéries MDR présentes dans l'eau et les aliments (**Saravana & Annalakshmi, 2012**).
- ▣ Leur sensibilité aux enzymes protéolytiques (**Bradshaw, 2003**).
- ▣ Leur coût de production élevé et un faible rendement dû à une récupération inefficace par les méthodes de purification, ainsi que les limites illustrées dans le **tableau** ci-dessous.

Tableau 4 : Efficacité de la bactériocine dans les aliments : facteurs limitants (Gálvez et al., 2007)

Facteurs liés à l'aliment
<ul style="list-style-type: none">▪ Conditions de transformation des aliments▪ Température de stockage des aliments▪ pH alimentaire et instabilité de la bactériocine aux changements de pH▪ Inactivation par des enzymes alimentaires▪ Interaction avec les additifs / ingrédients alimentaires▪ Adsorption de bactériocine sur les composants d'aliment▪ Faible solubilité et répartition inégale dans la matrice alimentaire▪ Stabilité limitée de la bactériocine pendant la durée de conservation des aliments
Le microbiote alimentaire
<ul style="list-style-type: none">▪ Charge microbienne▪ Diversité microbienne▪ Sensibilité à la bactériocine▪ Interactions microbiennes dans le système alimentaire
Les bactéries cibles
<ul style="list-style-type: none">▪ Charge microbienne▪ Sensibilité à la bactériocine▪ Phase physiologique (croissance, repos, affamé ou viable mais non cultivable, cellules stressées ou sub-létales blessées, endospores ...)▪ Protection par barrières physico-chimiques (microcolonies, biofilms, slime)▪ Développement de la résistance / adaptation

Les scientifiques sont constamment à la recherche d'une manière efficace pour trouver des solutions à certaines de ces limitations. Dernièrement diverses études ont été menées pour optimiser les méthodes de purification et de production pour obtenir un rendement élevé en bactériocines (**Parada et al., 2007**). Cependant, un autre domaine qui offre un grand espoir pour surmonter de ces limites est l'utilisation de la nanotechnologie pour l'augmentation de la stabilité et la durée de conservation des aliments, pour améliorer le spectre antimicrobien des bactériocines et assurer la sécurité de l'emballage (**Parveen & Kiran, 2019**). Dans ce sens des méthodologies relativement nouvelles telles que la nano-encapsulation (nanoparticules métalliques, chitosane, nanofibres, et liposomes) sont envisagés pour protéger les bactériocines contre la dégradation, ainsi améliorant l'effet conservatrice (**Gobinath et al., 2019**)

5. Bactériocine-nanoconjugués

Selon le U.K. House of Lords Science & Technology Committee, la nanotechnologie est la manipulation de matériaux et de structures fonctionnels à l'échelle nanométrique avec des diamètres allant de 1 à <1000 nm (**Klaessig et al., 2011**). Il s'agit d'une technologie assez nouvelle qui a plusieurs applications dans divers domaines scientifiques en raison des caractéristiques uniques des nanoparticules synthétisées (**Chou et al., 2011**).

L'intégration de la nanotechnologie et de la biotechnologie ouvre la porte à des possibilités illimitées et à des perspectives pour résoudre les problèmes liés à la diversité des produits biologiques (**Fahim et al., 2016**). Grâce à cette intégration, il est possible d'assurer une distribution efficace, un ciblage, une protection contre la dégradation, en plus de l'amélioration de la puissance de la substance et de ses propriétés physico-chimiques (**Farokhzad & Langer, 2009**).

Les bactériocines sont l'un des nombreux exemples qui peuvent bénéficier de cette combinaison. Par exemple, la nanoencapsulation des bactériocines destinées à être utilisées comme bio-conservateurs, il pourrait les protéger de la dégradation par les enzymes protéolytiques, en plus de les sauver des interactions indésirables avec d'autres composants alimentaires, et donc, d'augmenter leur stabilité pour des plus longues périodes possibles (**Brandelli, 2012**).

La nanoencapsulation de bactériocine a permis le développement de nouveaux emballages antimicrobiens pour la conservation des aliments, qui a non seulement augmenté le spectre antimicrobien des bactériocines, mais a également amélioré la durée de conservation des aliments sans provoquer d'altération des composants alimentaires (**Lopes & Brandelli, 2017 ; Parveen & Kiran, 2019**).

5.1. Bactériocine

Les deux formes de bactériocines les plus courantes sont la nisine et la pédiocine. La nisine a été signalée comme étant active contre les bactéries à Gram positif, dont *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes*, qui sont des micro-organismes hautement pathogènes altérant les aliments. Toutefois, elle s'est avérée peu efficace contre les bactéries à Gram négatif, levures et moisissures (**Zacharof & Lovitt, 2012**). La pédiocine PA-1 est également un antibactérien prometteur contre une importante bactérie qui altère les aliments, *Listeria monocytogenes*, mais son spectre d'activité est limité par rapport à la nisine (**Benmechernene et al., 2013 ; Ovchinnikov et al., 2016**). Comme il a été déjà signalé seul

ces deux bactériocines sont autorisées pour être utilisées comme conservateur alimentaire naturel.

5.1.1 Mécanisme d'action et le développement de la résistance

Le mécanisme d'action des bactériocines n'est pas encore complètement élucidé. Il a été initialement proposé que ces peptides jouent un rôle sur les membranes des cellules microbiennes, entraînant la formation de pores et l'effondrement des cellules. Néanmoins, des études récentes ont indiqué d'autres modes d'action possibles, notamment l'interaction avec des cibles intracellulaires spécifiques et perturbation du métabolisme bactérien, inhibition de la synthèse des acides nucléiques et des protéines, interférence avec la formation des composants cellulaires (par exemple, la paroi cellulaire) et inhibition de l'activité enzymatique (**Johnson et al., 2018**).

La première étape de l'interaction entre un peptide et une cellule bactérienne cible, quel que soit le mécanisme d'action, est l'attraction entre le peptide et la membrane cellulaire. Cela est dû à la propriété anionique de la surface des cellules bactériennes composée de phosphatidyléthanolamine (PE), phosphatidylglycérol (PG), lipopolysaccharide (LPS), acide lipoteichoïque (LTA) et cardiolipine (CL), qu'est la cible commune exploitée par les bactériocines cationiques. Les bactériocines prennent des configurations permettant aux groupes chargés positivement d'interagir avec la surface de la cellule bactérienne chargée négativement, tandis que les surfaces hydrophobes sont alignées vers la membrane et traversent la bicouche lipidique. Ensuite, les peptides s'associent ou se polymérisent pour former des complexes (**Rashmi et al., 2019**). Les bactériocines induisent la perméabilisation de la membrane cellulaire des bactéries cibles, probablement en formant des pores sélectifs aux ions qui provoquent la dissipation de la force motrice des protons et l'épuisement de l'ATP intracellulaire (**Christensen & Hutkins, 1992**), la fuite des substrats intracellulaires, et finalement la mort. L'entérocyne CRL35 ; une bactériocine de classe II synthétisée par *Enterococcus faecium* CRL35 ; crée des trous localisés dans la paroi cellulaire et la membrane de *Listeria monocytogenes*, et entraîne ainsi l'effondrement de la force protomotrice (**Minahk et al., 2000**).

Certaines bactériocines nécessitent la molécule d'ancrage telle que le lipide II ou le mannose perméase du système phosphotransférase pour interagir avec les membranes (**Hécharde & Sahl, 2002**). Cependant, une étude ultérieure sur la Garvicine ML, bactériocine circulaire de classe II c dérivée de *Lactococcus garvieae* DCC43, a suggéré que la Garvicine ML a un double mode d'action. Outre le mécanisme de destruction des interactions

électrostatique non récepteur, un maltose ABC- la protéine de transport sert de récepteur ciblé de la Garvicine ML, ce qui facilite l'efflux de solutés intracellulaires qui mène éventuellement à la mort cellulaire (**Gabrielsen et al., 2012**)

Comme la charge de la surface de la membrane bactérienne et la fluidité de la membrane sont les deux propriétés bactériennes exploitées par les bactériocines pendant l'attaque, la manipulation de ces propriétés rend les bactériocines inefficaces, ce qui entraîne une résistance aux bactériocines (**Rashmi et al., 2019**). Les bactéries cibles est acquise cette résistance par différents mécanismes qui sont résumés dans le **tableau 5**.

Tableau 5 : Mécanisme de développement de la résistance des bactéries aux différentes AMP (Rashmi et al., 2019)

AMPs	Bactéries	Raisons suggérées pour la résistance
Pediocine	<i>E. faecalis</i>	Modification de la composition en acides gras de la membrane ; augmentation de la teneur en D-alanine de l'acide teichoïque de la paroi ; augmentation de la teneur en L-lysine des phospholipides membranaires
Leucocine A	<i>L. monocytogenes</i>	
Nisine	<i>C. difficile</i> , <i>L. lactis</i> , <i>S. pneumoniae</i> et <i>E. faecalis</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>S. bovis</i> <i>S. aureus</i>	D-alanylation de l'acide teichoïque Changements de composition des lipides membranaires Plus de teneur en acide teichoïque Augmentation du nombre de copies de l'opéron <i>dlt</i>
Mesenterocin 52A	<i>Leuconostoc</i> et <i>Weissella</i>	Modification de la composition de la membrane en acides gras
Mundticine	<i>E. faecium</i>	

L'utilisation directe d'antibactériens ou d'antibiotiques étant limitée pour de nombreuses raisons, telles que la création de bactéries résistantes aux antibactériens ou les restrictions liées aux aliments, l'application de nanocarriers à base de lipides ; par exemple ; contenant des agents antibactériens joue un rôle remarquable dans la lutte contre les maladies d'origine alimentaire, en particulier les bactéries résistantes aux antibiotiques (**Rashmi et al., 2019**).

5.2. Interaction des bactériocines avec des nanoparticules pour une augmentation de l'efficacité antimicrobienne

L'intégration de la nanotechnologie et la biotechnologie peut être considérée comme un exemple plus récent pour surmonter les obstacles. La recherche dans le domaine de la nanotechnologie dans les deux dernières décennies a ouvert des portes à des opportunités illimitées pour résoudre plusieurs problèmes. Les nano-encapsulations des bactériocines lorsqu'elles sont utilisées dans la conservation des aliments, elles les protègent de la dégradation par les enzymes gastro-intestinales, et peuvent également augmenter leur rendement commercial et leur stabilité. Pour formation de nano-encapsulations, différentes approches ont été utilisées par différents scientifiques pour conjuguer des bactériocines avec nanoparticules (**Fahim et al., 2016**). Certains des approches communes comprennent (a) l'encapsulation des bactériocines dans les nanoliposomes (b) conjugaison de bactériocines avec des nanoparticules de chitosane et (c) l'interaction des bactériocines avec les nanoparticules métalliques.

5.2.1. Encapsulation des bactériocines dans des nanoliposomes

Les liposomes sont des transporteurs, contenant des lipides polaires (tels que la phosphatidyléthanolamine ou phosphatidylcholine) ou une combinaison de lipides polaire avec l'ergostérol ou le cholestérol, qui participent à la création de bicouche (**Ghorbanzade et al., 2017**).

De nombreuses études ont utilisé le cholestérol comme lipide et la phosphatidylcholine comme émulsifiant pour produire des liposomes qui ont des formes sphériques de nano à micro. Ces structures contiennent des membranes amphiphiles simples ou multiples. Nanoliposomes, possédant des membranes monocouches qui sont divisées en deux types de vésicules unilamellaires (SUV) avec des tailles inférieures à 30 nm et grandes vésicules unilamellaires (LUV) avec des tailles comprises entre 30 et 100 nm (**Khorasani et al., 2018**). En outre, les liposomes, ayant plusieurs membranes, ont deux types de vésicules multilamellaires (MLV) et vésicules multivesiculaires (MVV) (**Fu et al., 2016**).

Ces transporteurs peuvent piéger et libérer un large spectre de substances hydrophiles, hydrophobes et amphiphiles en raison de la présence des phases aqueuse et lipidique dans leurs structures. Dans les vésicules des liposomes, les groupes polaires de phospholipides se sont développés vers la phase aqueuse, existait à l'intérieur et à l'extérieur des liposomes, tandis que les chaînes aliphatiques d'hydrocarbures hydrophobes sont présentées dans les couches membranaires (Yousefi et al., 2019).

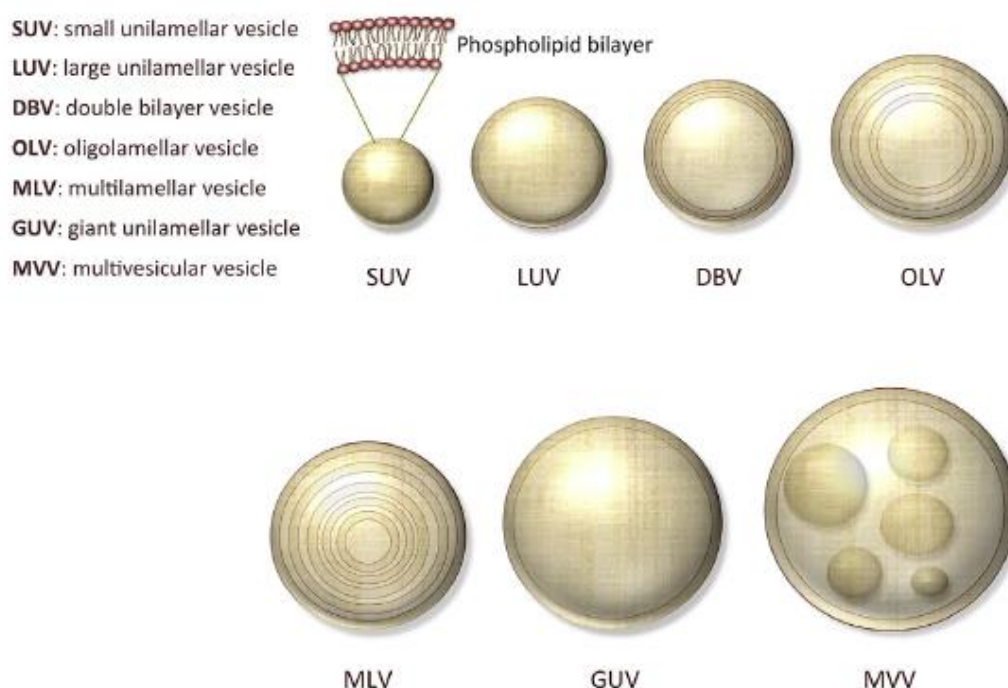


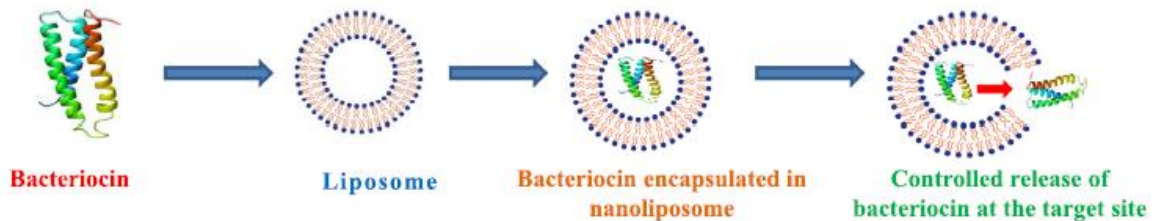
Figure 17 : Différents types de liposomes et nanoliposomes en fonction de leur nombre de bicouches, de vésicules internalisées et de leurs taille (Khorasani et al., 2018)

Encapsulation par les liposomes a montré qu'elle protège les composés encapsulés des altérations environnementales et physico-chimiques (Mozafari et al., 2008 a, b).

L'encapsulation des bactériocines par les liposomes est réalisée par une méthode courante connue sous le nom d'hydratation en couche mince (Figure 18). Dans cette méthode, le lipide synthétisé chimiquement est hydraté avec un tampon aqueux contenant de la bactériocine à une température supérieure à celle de la transition de la phase lipidique. Il en résulte une population hétérogène de vésicules multilamellaires d'environ > 400 nm dans lesquelles les bactériocines sont encapsulées ; celles-ci sont ensuite transformés en petits

vésicules homogènes unilamellaires d'environ 20 à 80 nm par sonication ou chauffage ou extrusion de membrane (Sharma & Sharma, 1997 ; Jesorka & Orwar, 2008).

a.



b.

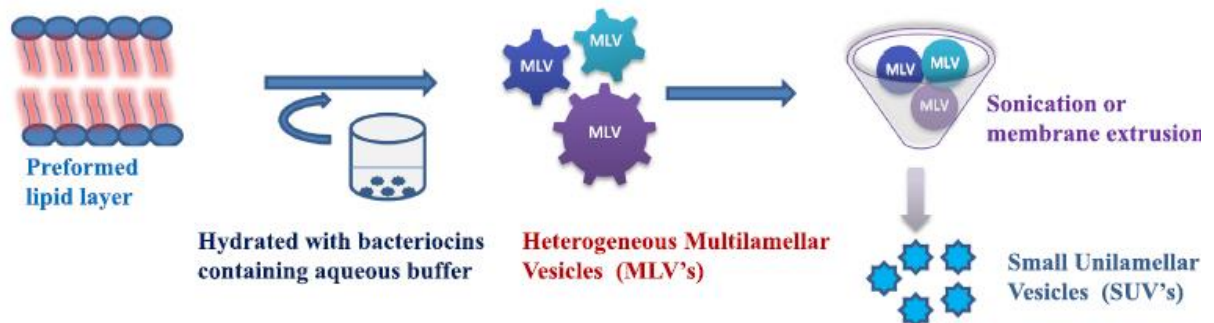


Figure 18 : Représentation schématique de la synthèse des bactériocines encapsulées par des nanoliposomes : (a). Représentation schématique de l'encapsulation des bactériocines dans les nanoliposomes (b). Représentation schématique de la méthode d'hydratation en couches minces (Parveen & Kiran, 2019)

L'encapsulation de la nisine dans la phosphatidylcholine aboutie à un matériau d'emballage actif prometteur qui présentait une forte activité inhibitrice contre la flore d'altération, *Listeria monocytogenes*, lorsqu'elle est incorporée dans des membranes à base de biopolymères de gélatine ou de cellulose (Boelter & Brandelli, 2016).

5.2.2. Conjugaison avec des nanoparticules de chitosane

Outre les nanoparticules à base de lipides, les nanoparticules polymériques ont également suscité beaucoup d'attention en raison de leurs immenses applications en matière de thérapeutique et de sécurité alimentaire (Parveen & Kiran, 2019). Le chitosane est un polymère biodégradable, biocompatible, bactéricide et non toxique. En plus de cela, le chitosane se caractérise par son activité antibactérienne, antifongiques, antiprotozoaires et anticancéreuses. Par conséquent, il a été utilisé dans le domaine de la médecine et de la

biotechnologie pour interagir avec différents composés (**Figure 19 a**). La conjugaison chitosane-bactériocine est généralement atteinte par la méthode de gélification ionique décrite par **Namasivayam et al. (2015)** (**figure 19 b**).

Dans cette méthode, le chitosane et la suspension de bactériocine sont mélangées dans de l'acide acétique à 1% et sont agitées à température ambiante avec l'ajout goutte à goutte de sodium tripolyphosphate (TPP). La préparation est centrifugée et les bactériocines incorporées au chitosane qui peuvent être lyophilisées pour une utilisation ultérieure.

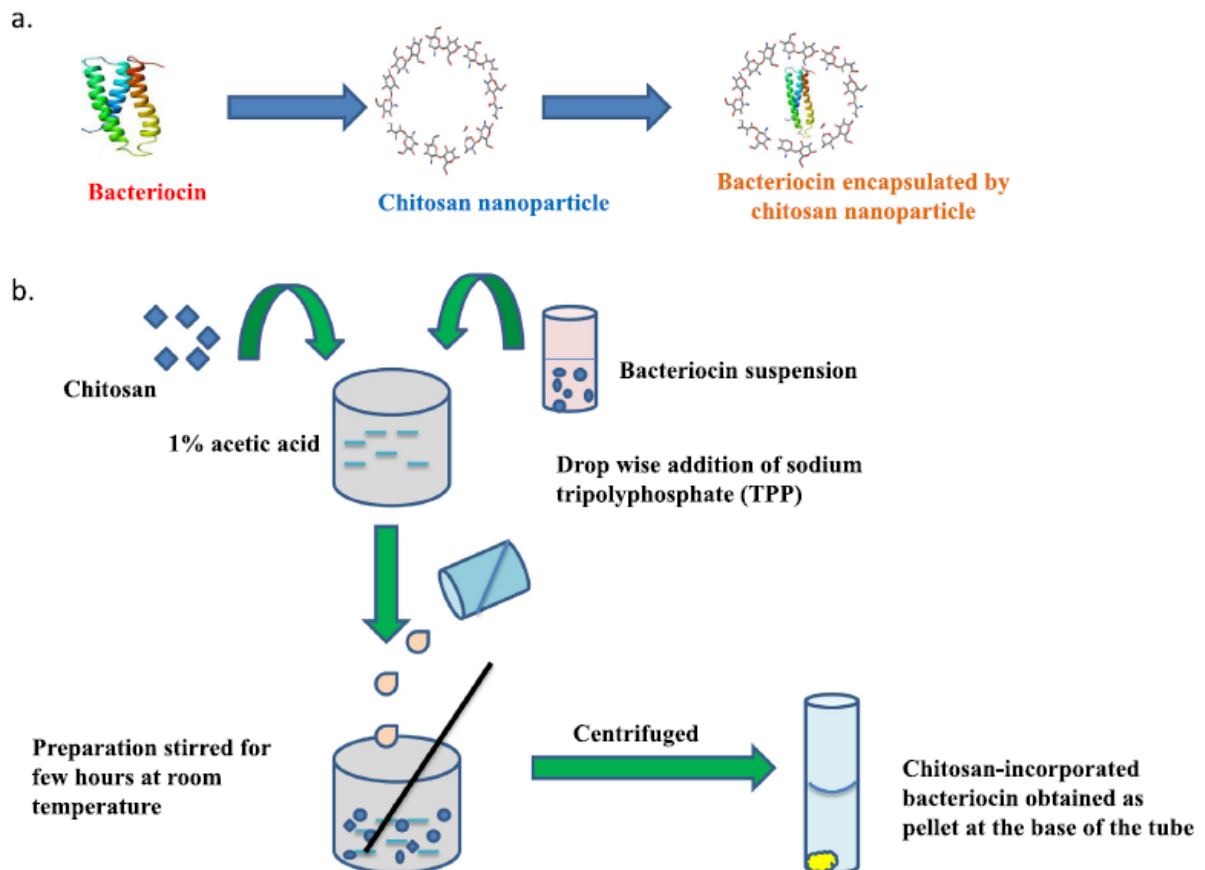


Figure 19 : Représentation schématique de la synthèse des bactériocines encapsulées par des nanoparticules de chitosane : (a). Représentation schématique des bactériocines encapsulées dans des nanoparticules de chitosane. (b). Représentation schématique de la méthode de gélification ionique (**Parveen & Kiran, 2019**)

Concernant son activité biologique, les nanoparticules de chitosane chargées de nisine ont révélé une activité antimicrobienne deux fois plus élevée que celle de la nisine seule, examinés contre *Staphylococcus aureus* ATCC 19 117 (**Zohri et al., 2010**).

Une étude similaire a été rapportée par **Namasivayam et al., (2015)**, le nanoconjugué de chitosane chargé de bactériocines a été testé pour son activité antimicrobienne contre *Listeria monocytogenes*, qui indiquait que tous les nanoconjugués a montré une activité

antimicrobienne accrue. L'augmentation de la zone d'inhibition était plus prometteuse dans le nanoconjugué que dans les bactériocines libres.

5.2.3. Interaction des bactériocines avec des nanoparticules métalliques

Les nanoparticules métalliques comme l'or, l'argent, le cuivre, le zinc ont montré une activité antimicrobienne puissante contre les bactéries pathogènes (**Yoon et al., 2007 ; Kuo et al., 2009 ; Raghupathi et al., 2011**). Généralement, cela est dû à la grande surface de ces nanoparticules chargées positivement, ce qui facilite leur liaison à la membrane bactérienne chargée négativement. Les bactéries ciblées sont ensuite tuées par le stress oxydatif induit par les espèces réactives d'oxygène générées, ainsi que par la toxicité des ions métalliques libres qui sont accumulés. (**Seil & Webster, 2012**). Ce mécanisme d'action proposé définit les nanoparticules métalliques comme une approche prometteuse pour résoudre le problème de résistance aux antimicrobiens (**Fahim et al., 2016**).

Récemment, quelques études ont signalé le développement d'outil antibiotique utilisant des bactériocines et des nanoparticules qui sont également non toxique pour l'homme et peut être synthétisé par une méthode plus sûre. L'une des nanoparticules les plus couramment utilisées, à savoir l'argent a longtemps été connu pour son activité antimicrobienne et pour l'induction de toxicité pour les micro-organismes. Les propriétés antimicrobiennes de l'argent nanoparticules peuvent être utilisées pour améliorer le spectre antimicrobien des bactériocines car elles ont elles-mêmes d'énormes potentiel antibactériens et promesse de cibler les espèces pathogènes d'origine alimentaire (**Fayaz et al., 2010 ; Duncan, 2011**). Par conséquent, ceux-ci ont été suggérés pour être le candidat le plus approprié pour la conjugaison avec des bactériocines. **Sharma et al., (2012)** ont signalé une méthode verte en une seule étape de synthèse de nanoparticules d'argent (**Figure 20**) conjuguées à un peptide antibactérien provenant de bactéries lactiques.

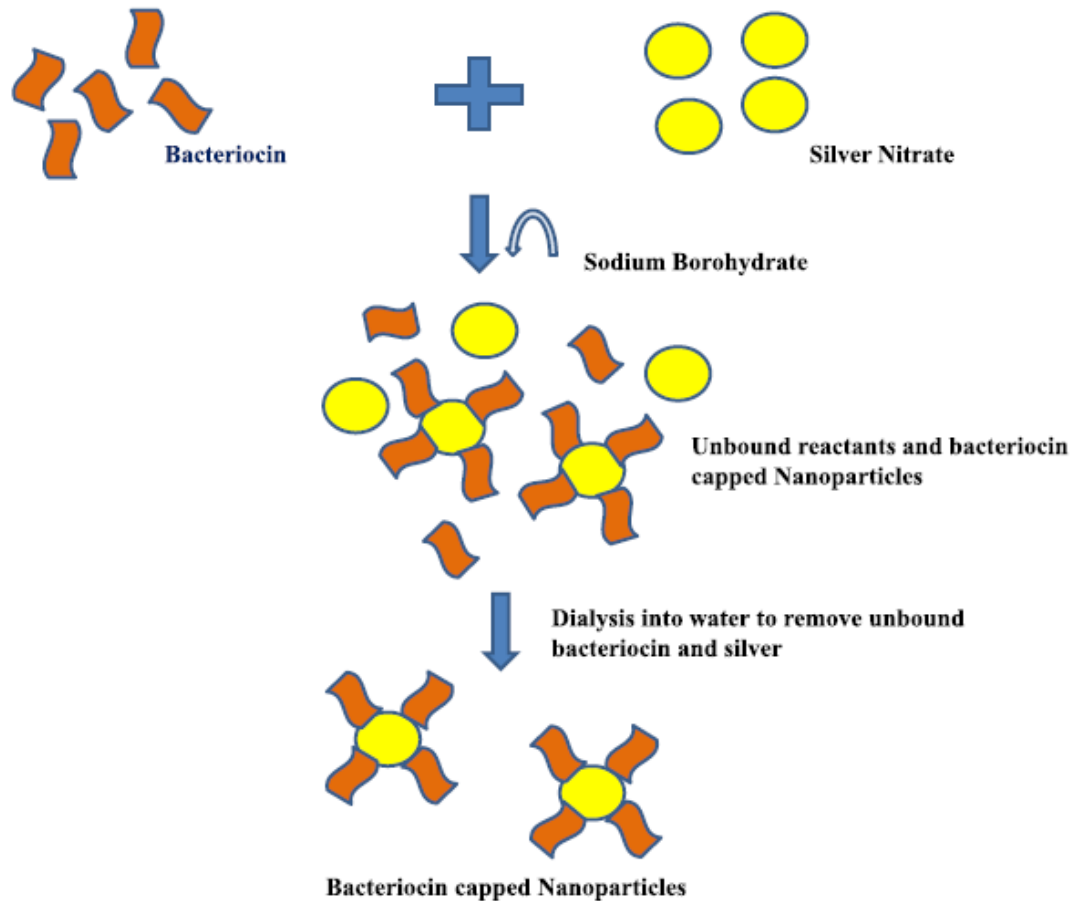


Figure 20 : Représentation schématique de la synthèse verte de bactériocine coiffées de nanoparticules d'argent (Parveen & Kiran, 2019)

Les entérocoques recouverts de nanoparticules d'argent (En-SNP) ont montré une inhibition à large spectre contre un certain nombre de bactéries pathogènes d'origine alimentaire sans toxicité notable pour les globules rouges, ce qui révèle que les En-SNP présentent une activité antibactérienne beaucoup plus importante que les S-NP synthétisés chimiquement, sans utiliser de produits chimiques dangereux (Parveen & Kiran, 2019).

Pandit *et al.*, (2017) ont synthétisé des nanoparticules d'argent à partir de l'extrait de citrates de *Cymbopogon* et les a conjugués avec la nisine pour former un conjugué de nano-bactériocine. L'activité antimicrobienne *in vitro* du bioconjugué d'argent a été évaluée par rapport à divers micro-organismes d'altération et les résultats ont montré un potentiel antimicrobien accru de la nisine après conjugaison avec l'argent nanoparticules.

Conclusion Générale

Les bactéries lactiques sont utilisées depuis des siècles pour la production et la conservation des produits alimentaires. En outre, ces bactéries ont la capacité de produire des peptides antimicrobiens « bactériocines », doués d'activités inhibitrices dirigées notamment contre plusieurs bactéries indésirables, pathogènes, d'altération ou résistantes aux antibiotiques, ce qui renforcent cette propriété de bioconservation. Actuellement, les bactériocines sont des substituts prometteuses aux antibiotiques existants qui deviennent moins efficaces aux résistants développés par les microorganismes. Mais, seules la nisine et la pédiocine sont autorisées comme conservateurs alimentaires.

Dans ce travail nous nous sommes fixés comme objectifs l'asseye de la mise évidence des bactériocines produites par des entérocoques à partir de deux produits laitiers artisanaux de la wilaya de Naama en particulier la région de Sfisifa : « Klila » et « Jben » à base de lait crue de brebis.

C'était prévue d'appliqué un protocole de purification des bactériocines basé sur la technique de la précipitation suivi par la technique de la dialyse, mais malheureusement nous n'avons pas eu la chance pour appliquer ce processus a cause de situation actuelle de confinement imposé au niveau national et international pour éviter la pandémie du COVID-19.

Par conséquence on a ajouté une partie qui couvre la diversité des sources des bactéries lactiques productrices des bactériocines et les différents processus de purification des bactériocines au cours de ces dernières années. Généralement, les nouvelles bactériocines sont découvertes par dépistage conventionnelle avec l'essai « Spot-on-lawn », l'essai de diffusion sur disque, l'essai de diffusion sur puits d'agar, purifiés par précipitation au sulfate d'ammonium suivi par IEC ou GFC, et caractérisé par RP-HPLC, Tricine-SDS-PAGE et/ou MALDI-TOF MS. Cependant, la notion commune de méthodes alternatives répond à l'ambition de "tout sauf la chromatographie" qui promet un coût moindre, et un temps de traitement plus court par rapport aux méthodes conventionnelles basé sur la chromatographie. A la lumière des éléments ci-dessus, la méthode basée sur l'extraction liquide-liquide : ATPS semble être la méthode de purification primaire de la bactériocine la plus prometteuses.

Enfin, plusieurs limitations ; qui ont été déjà cité ; remettent en question l'utilisation des bactériocines comme agents de conservation naturelle dans les industries alimentaires. Dans ce sens, les systèmes de nanotransporteurs, tels que les nanoparticules à base de lipides, de glucides, de métaux et de polymères, représentent des approches prometteuses pour maximiser

l'utilisation de ces peptides antimicrobiens. Néanmoins, des études avancées doivent être menées pour optimiser les formulations des bactériocines-nanoconjugués.

Des tests toxicologiques et d'acceptabilité approfondis doivent également être réalisés avant que les produits soient approuvés pour une utilisation à grande échelle.

Ainsi, bien que la science des bactériocines-nanoconjugués soit actuellement dans sa forme naissante, elle présente un grand potentiel pour révolutionner l'industrie alimentaire.

A propos des perspectives futures pour la continuation et le développement de ce travail :

- ▣ En premier lieu mener à terme la réalisation de la partie pratique du travail ;
- ▣ Ensuite, la caractérisation structurale des bactériocines et la détection des gènes codant correspondants par PCR ;
- ▣ L'étude de l'activité antimicrobienne de l'ensemble des bactériocines probablement identifiées contre un panel plus large de bactéries cibles ;
- ▣ L'étude de l'activité antimicrobienne synergique des bactériocines et des huiles essentiels des plantes médicinales locales.
- ▣ Enfin on vise la valorisation et l'industrialisation des produits de terroir, tout en augmentant leurs durées de conservation et au même temps en préservant leurs identités artisanales

Références Bibliographique

A

1. **Ababsa A., (2012).** Recherche de bactériocines produites par les bactéries lactiques du lait. Thèse de Magister en Génie microbiologique, université Ferhat Abbas, Setif : pp73+annexes.
2. **Abbasiliasi S., Tan J.S., Ibrahim T.A.T., Kadkhodaei S., Ng H.S., Vakhshiteh F., Ajdari Z., Mustafa S., Ling T.C., Rahim R.A., et Ariff A. B., (2014).** Primary recovery of a bacteriocin-like inhibitory substance derived from *Pediococcus acidilactici* Kp10 by an aqueous two-phase system. Food Chem, 151: pp 93–100.
3. **Abee T., Krockel L., et Hill C., (1995).** Bacteriocins: modes of action and potentials in food. Int. J. Food Microbiol, 28: pp 169-185.
4. **Aissaoui Z., (2004).** Fabrication et caractérisation d'un fromage traditionnelle Algériens 'Bouhezza'. Thèse de Magister en Biologie, université Mentouri, Constantine, (2004) : pp134+annexes.
5. **Aissaoui Z., Benatallah L., Ghennam E.H., et Zidoune M.N., (2011).** Manufacture and characteristics of the traditional Algerian ripened bouhezza cheese. Journal of Food, Agriculture & Environment, 9: pp 96-100.
6. **Albano H., Pinho C., Leite D., Barbosa J., Silver J., Carneiro L., et Magalhães R., (2009).** Evaluation of bacteriocin-producing strain of *Pediococcus acidilactici* as a biopreservative for « Alheira », a fermented meat sausage. Food Control, 20: pp 764-770.
7. **Allison G.E., et Klaenhammer T.R., (1996).** Functional analysis of the gene encoding immunity to lactacin F, lafI, and its use as a Lactobacillus-specific, food-grade genetic marker. Applied and Environmental Microbiology, 62: pp4450–4460.
8. **Alvarez-Sieiro P., Montalbán-López M., Dongdong M., et Kuipers O., (2016).** Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. J. Appl. Microbiol. Biotechnol, 100: pp 2939–2951.
9. **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: pp 454-468.
10. **Anderssen E.L., Diep B.D., Nes I.F., Eijsink V.G.H., et Nissen-Meyer J., (1998).** Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A. App. Environ. Microb, 64: pp 2269–2272.
11. **Arnison P.G., Bibb M.J., Bierbaum G., Bowers A.A., Bugni T.S., Bulaj G., Camarero J.A., Campopiano D.J., Challis G.L., Clardy J., Cotter P.D., Craik D.J., Dawson M., Dittmann E., Donadio S., Dorrestein P.C., Entian K.D., Fischbach M.A., Garavelli J.S., Göransson U., Gruber C.W., Haft D.H., Hemscheidt T.K., Hertweck C., Hill C., Horswill A.R., Jaspars M., Kelly W.L., Klinman J.P., Kuipers O.P., Link A.J., Liu W., Marahiel M.A., Mitchell D.A., Moll G.N., Moore B.S., Müller R., Nair S.K., Nes I.F., Norris G.E., Olivera B.M., Onaka H., Patchett M.L., Piel J., Reaney M.J.T., Rebuffat S., Ross R.P., Sahl H.G., Schmidt E.W., Selsted M.E., Severinov K., Shen B., Sivonen K., Smith L., Stein T., Süßmuth R.D., Tagg J.R., Tang G.L., Truman A.W., Vederas J.C., Walsh C.T., Walton J.D., Wenzel S.C., Willey J.M., Donk W.A., (2013).** Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products:

overview and recommendations for a universal nomenclature. Nat Prod Rep, 30: pp108–160.

12. **Axelsson L., (2004).** Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, 3rd Edition (edited by Salminen, S., Wright A.V., and Ouwehand A.), Marcel Dekker, New York: pp1-67
13. **Aymerich T., Holo H., Havarstein L.S., Hugas M., Garriga M., et Nes I.F., (1996).** Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. Appl. Environ. Microb., 62: pp 1676-1682.



14. **Badis A., Guetarni D., Kihal M., et Ouzrout R., (2005).** Caractérisation phénotypique des Bactéries lactiques isolées à partir de lait de chèvre de deux populations locales « Arabia et Kabyle ». Scien &Tech, 23 : pp 30-37.
15. **Badis A., Guetarni D., Moussa Boudjema B., Henni D., et Kihal M., (2004).** Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. Food Microbiol, 21: pp 579–588.
16. **Balows A., Truper H.G., Dworkin M., Harder W., et Schleifer K.H., (1992).** The prokaryotes second Ed – vol 11, Springer Verlage, New York.
17. **Bastos M.C., Ceotto H., Coelho M.L., et Nascimento J.S., (2009).** Staphylococcal antimicrobial peptides: relevant properties and potential biotechnological applications. Curr. Pharma. biotechnol, 10: pp38-61.
18. **Batdorj B., Dalgarrondo, Choiset Y., Pedroche J., Métro F., et Prévost H., (2006).** Purification and characterisation of two bacteriocin produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolian airag. J. App. Microbiol, 101: pp837-848.
19. **Béal C., Marin M., Fontaine E., Fonseca F., et Obert J.P., (2008).** Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. In : bacteries lactiques, de la genetique aux ferments (corrieu g. et luquet f.m.), Tec & doc, lavoisier. Paris : pp661-765.
20. **Bencharif A., (2001)** Stratégies des acteurs de la filière lait en Algérie : états des lieux et problématiques. In Padilla M. (ed.) CIHEAM, Options Méditerranéennes Série B. Etudes et Recherches N° 32 : pp 25-45.
21. **Bendimerad N., (2013).** Caractérisation phénotypique technologique et moléculaire d'isolats de bactéries lactiques de laits crus recueillis dans les régions de l'Ouest Algérien. Essai de fabrication de fromage frais type « Jben ». Thèse Doctorat en Microbiologie, université aboubekr belkaid, Tlemcen : pp162+annexes.
22. **Benkerroum N., et Tamime A.Y., (2004).** Technology transfer of some Moroccan traditional dairy products (lben, jben, smen) to small industrial scale. Food Microbiol., 21: pp399–314.
23. **Benkerroum N., Ghouati Y., Sandine W.E., et Tantaoui-Elaraki A., (1993).** Methods to demonstrate the bactericidal activity of bacteriocins. Lett. Appl. Microbiol., 17: pp78-81.
24. **Benkerroum N., Oubel H., Zahar M., Dlia S., et Maltout A.F., (2000).** Isolation of a bacteriocin producing *Lactococcus lactis subsp. lactis* and application to control *Listeria monocytogenes* in Moroccan Jben. J. Appl. Microbiol., 89: pp960-968.

25. **Benmechernene Z., Fernandez-No I., Kihal M., Bohme K., Calo-Mata P., et Barros-Velazquez J., (2013).** Recent patents on bacteriocins: food and biomedical applications. *Recent Pat. DNA Gene Seq*, 7: pp66–73.
 26. **Berecka M. P., Wasko A., et Koston D., (2009).** Comparison of different methods for detection of antimicrobial activity of probiotic strains of *Lactobacillus rhamnosus* against some food spoilage microorganisms. *Annales*. Vol. LXIV1.
 27. **Bhunja A.K., Bhowmik T.K., et Johnson M.G., (1994).** Determination of bacteriocin encoding plasmids of *Pediococcus acidilactici* strains by Southern hybridization. *Lett. Appl. Microbiol*, 18: pp168-170.
 28. **Boelter J.F., et Brandelli A., (2016).** Innovative bionanocomposite films of edible proteins containing liposome-encapsulated nisin and halloysite nanoclay. *Colloid. Surf. B*, 145: pp740–747.
 29. **Boussouar N., (2017).** Caractérisation technologique et sanitaire des enterocoques isolés à partir de lait de chamelle du sud-ouest Algérien. Thèse Doctorat en Microbiologie, université Aboubekr belkaid, Tlemcen : pp152+annexes.
 30. **Bradley A.J., (2002).** Bovine mastitis: an evolving disease, *The Veterinary Journal*. 164, 2: pp116-128.
 31. **Bradshaw J.P., (2003).** Cationic antimicrobial peptides. *Bio Drugs*, 17: pp233–240.
 32. **Brandelli A., (2012).** Nanostructures as promising tools for delivery of antimicrobial peptides, *MiniRev.Med.Chem*, 12: pp731–741.
 33. **Brotz H., Bierbaum G., Markus A., Molitor E., et Sahl H.G., (1995).** Mode of action of the lantibiotic mersacidin: inhibition of peptidoglycan biosynthesis via a novel mechanism. *Antimicrob. Agents Chemother*, 39: pp714-719.
 34. **Bruno M.E. C., et Montville T. J., (1993).** Common Mechanistic Action of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol. Sep*, 59,9: pp3003–3010.
- ⊗
35. **Castro M.P., Palavecino N.Z., Herman C., Garro O.A., et Campos C.A., (2011).** Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. *Meat Sci*, 87: pp321–329.
 36. **Chamba J.F., (2008).** Application des bactéries lactiques lors des fabrications fromagères. In *Bactéries lactique de la génétique aux ferments*. Corrieu G et Luquet F-M, pp849.paris : édition TEC et DOC, Lavoisier.
 37. **Chen Y.S., Srionnual S., Onda T., et Yanagida F., (2007).** Effects of prebiotic oligosaccharides and trehalose on growth and production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.*,45: pp190-193.
 38. **Chou L.Y., Ming K., et Chan W.C., (2011).** Strategies for the intracellular delivery of nanoparticles. *Chem.Soc.Rev*, 40: pp233–245.
 39. **Christensen D.P., et Hutkins R.W., (1992).** Collapse of the proton motive force in *Listeria monocytogenes* caused by a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*, *Appl. Environ. Microbiol*, 58: pp3312–3315.
 40. **Claps S., et Morone G., (2011).** Produits laitiers et fromagers traditionnels de l'Algérie. In *Développement de la Filière laitière et Fromagère en Algérie*, CorFilac : pp57-77.
 41. **Cleveland J., Montville T.J., Nes I.F., et Chikindas M.L., (2001).** Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. of Food Microbiology*, 71: pp1–20.

42. **Cotter P., Hill C., et Ross R.P., (2005).** Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3,10: pp777-788.
43. **Cotter P., Ross P., et Hill C., (2013).** Bacteriocin - a viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology*, 11: pp95-105.
44. **Cui Y., Zhang C., Wang Y., Shi J., Zhang L., Ding Z., Qu X., et Cui H., (2012).** Class IIa bacteriocins: diversity and new developments. *Int. J. Mol Sci*, 13: pp16668–16707.
- ☞
45. **De Kwaadsteniet M., Fraser T., Van Reenen C.A., et Dicks L.M.T., (2006).** Bacteriocin T8, a novel class IIa sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* T8, isolated from vaginal secretions of children infected with human immunodeficiency virus. *Appl. Environ. Microbiol*, 72: pp4761–4766.
46. **De Vuyst L., et Leroy F., (2007).** Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol*, 13: pp194–199.
47. **Deegan L.H., Cotter P.D., Hill C., et Ross P., (2006).** Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.*, 16: pp1058-1071.
48. **Dellagio H., De Roissart H., Torriani S., Curk M.C., et Janssens D., (1994).** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In *Les bactéries lactiques : aspects fondamentaux et technologiques*. De Roissart, H., Luquet, F.M. (Eds.), Loriga, Uriage : pp.25-116.
49. **Devoyode J.J., et Poullain F., (1988).** Les leuconostocs Propriétés : leur role en technologie laitier. *Le lait*, 68, 3 : pp249-280.
50. **Dicks L.M.T., Heunis T.D.J., Van Staden D.A., Brand A., Noll K.S., et Chikindas M.L., (2011).** Medical and personal care applications of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. In *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*, Drider D, Rebuffat S (eds). Springer: New York: pp391-421.
51. **Diep D.B., Havarstein L.S., et Nes I.F., (1995).** A bacteriocin-like peptide induces bacteriocin synthesis in *Lb. plantarum* C11. *Mol. Microbiol*, 18: pp631-639.
52. **Diep D.B., et Nes I.F., (2002).** Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram-positive bacteria. *Curr. Drug. Targets*, 3: pp107-122.
53. **Dimov S., Ivanova P., et Harizanova N., (2005).** Genetics of Bacteriocins Biosynthesis by Lactic Acid Bacteria. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 19: pp4-10
54. **Djidjel A., (2007).** Production d'acide lactique par *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* sur jus de datte : Cinétique et optimisation en cultures discontinues, semi-continues et continues. Thèse doctorat, Institut National Polytechnique de lorraine : pp246+annexes.
55. **Domig K., (2003).** Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus spp.* 1. Media for isolation and enumeration. *Int. J. Food Microbiol*, 88: pp147-164.
56. **Dortu C., et Thonart P., (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 13, 1 : pp143-154.
57. **Dortu C., (2008).** Isolement d'une bactérie lactique produisant de la sakacin G et utilisation sur des matrices alimentaires. Thèse Doctorat en sciences agronomiques et ingénierie biologique, universitaire wallonie-europe, Gembloux : pp155+annexes.

58. **Drider D., et Prevost H., (2009).** Bactéries lactiques physiologie, métabolisme, Genomique et Application industrielle. Ed. Economsa 49 rue Harica 75015Paris : pp381-427.
59. **Drider D., Fimland G., Hechard Y., McMullen L.M., et Prévost H., (2006).** The continuing story of Class IIa bacteriocins. *Microbiology Molecular Biology Reviews*, 70: pp564-582.
60. **Duncan T.V., (2011).** Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: barrier materials, antimicrobials and sensors. *J. Colloid. Interface Sci.* 363 (1): pp1–24.



61. **Eeckhaut A.V., Lanckmans K., Sarre S., et Smolders I., (2010).** Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: evaluation of matrix effects. *J. Chromatogr. B* 2877, 23: pp2198.
62. **Elayaraja S., Annamalai N., Mayavu P., et Balasubramanian T., (2014).** Production, purification and characterization of bacteriocin from *Lactobacillus murimus* AU06 and its broad antibacterial spectrum. *Asian Pac. J. Trop. Biomed*, 4: pp305–311.
63. **El-Ziney M.G., Uyttendaele M., Debevere J., et Jakobsen M., (1998).** Characterization of growth and metabolite production of *Lb. reuteri* during glucose/glycerol cofermentation in batch and continuous cultures. *Biotechnol Lett*, 20: pp913-916.
64. **Ennahar S., Sashihara T., Sonomoto K., et Ishizaki A., (1999).** Class IIa bacteriocins: Biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev*, 24: pp85–106.



65. **Fahim H.A., Khairalla A.S., El-Gemndy A.O., (2016).** Nanotechnology: a valuable strategy to improve bacteriocin formulations. *Front. Microbiol*, 7: pp13– 85.
66. **Farokhzad O.C., et Langer R., (2009).** Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACSNano*, 3: pp16–20.
67. **Fayaz A.M., Balaji K., Girilal M., Yadav R., Kalaichelvan P.T., et Venketesan R., (2010).** Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Nanomedicine*, 6: pp103–109.
68. **Fimland G., Eijsink V.G., et Nissen-Meyer J., (2002).** Comparative studies of immunity proteins of pediocin-like bacteriocins. *Microbiol*, 148: pp3661-3670.
69. **Fimland G., Johnsen L., Dalhus B., et Nissen-Meyer J., (2005).** Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure, and mode of action. *J Peptide Sci*, 11: pp688-696.
70. **Fox P.F., (2011).** Cheese. In *Encyclopedia of Dairy Sciences* (2 éd): pp533-543.
71. **Franz C.M.A.P., Van Belkum M.J., Holzapfel W.H., Abriouel H., et Gálvez A., (2007).** Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol Rev*, 31: pp293–310.
72. **Fu Y., Sarkar P., Bhunia A.K., et Yao Y., (2016).** Delivery systems of antimicrobial compounds to food. *Trends Food Sci Technol*, 57: pp165–77.



73. **Gabrielsen C., Brede D.A., Hernández P.E., Nes I.F., et Diep D.B., (2012).** The maltose ABC transporter in *Lactococcus lactis* facilitates high-level sensitivity to the circular bacteriocin garvicin ML. *Antimicrob. Agents Chemother*, 56: pp2908–2915.

74. **Gálvez A., Abriouel H., López R. L., et Omar N. B., (2007).** Bacteriocin-based strategies for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 120: pp51–70.
75. **Galvez A., Gallego G., Maqueda M., et Valdivia E., (1989).** Purification and amino acid composition of peptide antibiotic AS-48 produced by *Streptococcus (Enterococcus) faecalis subsp. liquefaciens* S-48. *Antimicro. Agents Chemother*, 33: pp437–441.
76. **Gao Y., Li B., Li D., et Zhang L., (2016).** Purification and characteristics of a novel bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* L11 isolated from Chinese traditional fermented cucumber. *Biotechnol. Lett*, 38, 5: pp871–876.
77. **Gao Y., Li D., Liu S., et Zhang L., (2015).** Garviecin LG34, a novel bacteriocin produced by *Lactococcus garvieae* isolated from traditional Chinese fermented cucumber. *Food Control*, 50: pp896–900.
78. **Garneau S., Martin N.I., et Vederas J.C., (2002).** Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie*, 84: pp577–592.
79. **Ghorbanzade T., Jafari S.M., Akhavan S., et Hadavi R., (2017).** Nano-encapsulation of fish oil in nano-liposomes and its application in fortification of yogurt. *Food Chem*, 216: pp146–52.
80. **Gillor O., Etzion A., et Riley M.A., (2008).** The dual role of bacteriocins as anti-and probiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81: pp591-606.
81. **Gobinath C., Adriana-Ine's R., Ma. del Rocío L., Heidi-Mari'a., et Norberto C., (2019).** Bacteriocin encapsulation for food and pharmaceutical applications: advances in the past 20 years. *Biotechnol Lett*, 41:453–469.
82. **Gray E.J., Lee K.D., Souleimanov A.M., Di Falco M.R., Zhou X., Ly A., Charles T.C., Driscoll B.T., et Smith D.L., (2006).** A novel bacteriocin, thuricin 17, produced by plant growth promoting rhizobacteria strain *Bacillus thuringiensis* NEB17: isolation and classification. *J. Appl Microbiol*, 100: pp545–554.
83. **Gross E., et Morell J.L., (1971).** The structure of nisin, *Journal of the American chemical society*, 93: pp4634-4635.
84. **Guessas B., Hadadji M., Saisi N., et Kihal M., (2006).** Inhibition of *staphylococcus aureus* growth by lactic acid bacteria in milk. *Dirasat. Agruicultural. Sci*. 32, 3: pp304-312.
85. **Guinane C., Piper C., Draper L.A., O'Connor P.M., Hill C., Ross R.P., et Cotter P.D., (2015).** Impact of environmental factors on bacteriocin promoter activity in gut-derived *Lactobacillus salivarius*. *Appl. Environ. Microbiol*, 81: pp7851–7859.
86. **Guiraud J., (2003).** *Microbiologie alimentaire. Techniques d'analyse microbiologiques.* Ed, Dunod, Paris : pp651.
87. **Guteriani H., (2007).** Etude de l'effet des bacteries lactiques sur l'inhibition des bacteries impliquees dans la physiopathologie digestive in vitro. Thèse de magister en microbiologie, université Hassiba ben bouali, Chlef : pp120+annexes.
- ✍
88. **Hadji-Sfaxi I., El-Ghaish S., Ahmadova A., Batdorj B., Le Blay-Laliberté G., Barbier G., Haertlé T., et Chobert J.M., (2011).** Antimicrobial activity and safety of use of *Enterococcus faecium* PC4.1 isolated from Mongol yogurt. *Food Control.*, 22: pp2020-2027.
89. **Hammi I., (2016).** Isolement et caractérisation de bactériocines produites par des souches de bactéries lactiques isolées à partir de produits fermentés marocaines et de différentes

- variétés de fromage français. Thèse doctorat chimie analytique, université de Strasbourg, Strasbourg : pp 136+annexes.
90. **Hardie, J.M, et Whiley R.A., (1997).** Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. J. Appl. Microbiol. Symposium Supplement, 83: 1-11.
91. **Hécharde Y., et Sahl H.G., (2002).** Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. Biochimie, 84: pp545–557,
92. **Heitz P.D.W., (1970).** Gel chromatography. Angew. Chem. Int. Ed. 9,9: pp689–702.
93. **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, 59, 3: pp200-208.
94. **Henning C., Gautam D., et Muriana P., (2015).** Identification of Multiple Bacteriocins in *Enterococcus spp.* Using an *Enterococcus*-Specific Bacteriocin PCR Array. Microorganisms, 3: pp1-16.
95. **Héquet A., Laffite V., Simon L., De Sousa-Caetano D., Thomas C., Fermaux C., et Berjeaud J.M., (2007).** Characterization of new bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated using a medium designed to stimulate inhibition of *Listeria* by *Lactobacillus sakei* 2512 on meat. Int. J. Food Microbiol, 113: pp67-74.
96. **Holzappel W. H., Haberer P., Geisen R., Björkroth J., et Schillinger U., (2001).** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. Am. J. Clin. Nutr., 73 : pp36-73.
- ☞
97. **Ingolf F., Nes Dag A., Brede., et Dzung B., (2013).** Class II Non-Lantibiotic Bacteriocins. In Handbook of Biologically Active Peptides: Bacterial/Antibiotic Peptides. 2nd Edition, Elsevier: pp2032
- ☞
98. **Jack R.W., Tagg J.R., et Ray B., (1995).** Bacteriocins of gram-positive bacteria. Microbiol. Rev, 59: pp171-200.
99. **Jesorka A., et Orwar O., (2008).** Liposomes: technologies and analytical applications. Annu. Rev. Anal. Chem, 1,1: pp801–832.
100. **Jiang H., Zou J., Cheng H., Fang J., et Huang G., (2017).** Purification, characterization, and mode of action of pentocin JL-1, a novel bacteriocin isolated from *Lactobacillus pentosus*, against drug-resistant *Staphylococcus aureus*. Biomed. Res. Int. 2017, 2: pp7657190.
101. **Jiménez-Díaz R., Ruiz-Barba J.L., Cathcart D.P., Holo H., Nes I.F., Sletten K.H., et Warner P.J., (1995).** Purification and partial amino acid sequence of Plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the activity of which depends on the complementary action of two peptides. Applied and Environmental Microbiology, 61: pp4459–4463.
102. **Jiong Z., Han J., Hui C., Jiehong F., et Guangrong H., (2018).** Strategies for screening, purification and characterization of bacteriocins. International Journal of Biological Macromolecules, 117: pp781–789.
103. **Joerger M.C., et Klaenhammer T.R., (1986).** Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin by *Lactobacillus helveticus* 481. J. Bacteriol., 167: pp439-446.

- 104. Johnsen L., Fimland G., et Nissen-Meyer J., (2005).** The C-terminal domain of pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) is involved in specific recognition of the C-terminal part of cognate immunity proteins and in determining the antimicrobial spectrum. *J. Biol. Chem.*, 280: pp9243-9250.
- 105. Johnson C.P., Santos, Rita C.S., Sousa Caio G., Otoni, Allan R.F., Moraes, Victor G.L., Souza Eber A.A., Medeiros Paula J.P., Espitia Ana C.S., Pires Jane S.R., et Coimbra Nilda F.F., (2018).** Nisin and other antimicrobial peptides: Production, mechanisms of action, and application in active food packaging. *Innfoo*.
- 106. Joosten H.M., Rodriguez E., et Nunez M., (1997).** "PCR detection of sequences similar to the AS-48 structural gene in bacteriocin-producing enterococci." *Lett Appl Microbiol*, 24: pp40-42.
- ✂
- 107. Kabuki T., Uenishi H., Watanabe M., Seto Y., et Nakajima H., (2007).** Characterization of a bacteriocin, Thermophilin 1277, produced by *Streptococcus thermophilus* SBT1277. *J. Appl Microbiol*, 102: pp971– 980.
- 108. Kaškonienė V., Stankevičius M., Bimbraitė-Survilienė K., Naujokaitytė G., Šernienė L., Mulkytė K., Malakauskas M., et Maruška A., (2017).** Current state of purification, isolation and analysis of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 101: pp1323–1335.
- 109. Kermanshahi R., et Qasarmi E., (2015).** Inhibition Effect of Lactic Acid Bacteria against Food Born Pathogen, *Listeria monocytogenes*. *Appl Food Biotechnol*, 2: pp11-19.
- 110. Khorasani S., Danaei M., et Mozafari M., (2018).** Nanoliposome technology for the food and nutraceutical industries. *Trends Food Sci Technol*, 79: pp106–15.
- 111. Klaenhammer T.R., (1988).** Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70: pp337-349.
- 112. Klaenhammer T.R., (1993).** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev*, 12(1-3): pp39 – 85.
- 113. Klaenhammer T.R., Fremaux C., et Hechard Y., (1994).** Activité antimicrobienne des bactéries lactiques. In *Bactéries lactiques*. De Roissart H., Luquet F.M. Tome 1, Lorica : pp353-366.
- 114. Klaessig F., Marrapese M., et Abe S., (2011).** Current perspectives in nanotechnology terminology and nomenclature. In *Nanotechnol Standards*, eds V. Murashov and J. Howard (New York, NY: Springer): pp21–52.
- 115. Klein G., Pack A., Bonaparte C., et Reuter G., (1998).** Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol*, 41: pp103–125.
- 116. Knoetze H., Todorov S.D., et Dicks L.M.T., (2008).** A class IIa peptide from *Enterococcus mundtii* inhibits bacteria associated with otitis media. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31,3: pp228-234.
- 117. König H., et Fröhlich J., (2009).** Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- 118. Kuo W.S., Chang C.N., Chang Y.T., et Yeh C.S., (2009).** Antimicrobial gold nanorods with dual-modality photodynamic in activation and hyperthermia. *Chem. Commun*: pp4853–4855.



119. **Lafuente R.D., Velasquez C.T., et De La Fuentesalcido N., (2016).** Bacteriocins of Gram-positive bacteria: Features and biotherapeutic approach. *African Journal of Microbiology Research*: pp1873-1879.
120. **Lahsaoui S., (2009).** Etude de procédé de fabrication d'un fromage traditionnel (klila). Mémoire d'Ingénieur en Agronomie, université El hadj lakhdar, Batna.
121. **Lappe R., SantAnna R., et Brandelli A., (2012).** Extraction of the antimicrobial peptide cerein 8A by aqueous two-phase systems and aqueous two-phase micellar systems. *Natural Product Research*, 26: pp2259–2265.
122. **Larparent J.P., (1990).** Microorganismes eucaryotes et procaryotes. Structure. Metabolisme. Systematique. Applications industrielles. Milieux de culture et réactifs. In *Memento technique de microbiologie*. Lavoisier Technique et Documentation. Paris.
123. **Larparent-Gourgaud M., Michaux O., Larparent J.P., Desmasures N., Desmazeaud M., Mangin I., Masson F., Montel M.C., et Tailliez P., (1997).** Les ferments lactiques et bactéries apparentées In *Microbiologie alimentaire Techniques de laboratoire*. Larparent J-P. Tec & Doc, Lavoisier : pp199-255.
124. **Leal-Sánchez M.V., Jimenez-Díaz R., Maldonado-Barragán A., Garrido-Fernández A., et Ruiz-Barba J.L., (2002).** Optimization of bacteriocin production by batch fermentation of *Lactobacillus plantarum* LPCO10. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: pp4465–4471.
125. **Lebres E., Azizi D., Hamza A., Taleb F., et Taouchichet, B., (2002).** Manuel des travaux pratiques. Institut Pasteur d'Algérie : pp20.
126. **Lechardeur D., Cesselin B., Fernandez A., Lamberet G., Garrigues C., Pedersen M., Philippe G., et Alexandra G., (2011).** Using heme as an energy boost for lactic acid bacteria. *Curr Opin Biotechnol*, 22: pp143-9.
127. **Lejeune R., Callewaert R., Crabbé K., et De Vugst L., (1998).** Modelling the growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 in batch cultivation. *J. Appl. Bacteriol.* 84: pp159-168.
128. **Leksir Ch., et Chemmam M., (2014).** Caractérisation, fabrication et consommation du fromage traditionnel 'Klila' dans l'est Algérien. Thèse de Doctorat en sciences biologiques, université 8 Mai 1945, Guelma : 143+annexes.
129. **Leveau J.Y., et Bouix M., (1993)** Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel, edited by Tec & Doc (Lavoisier. Paris) : pp85-87.
130. **Leveau J.Y., Brielle M., et De Roissart H., (1991).** la flore lactique IN *Technique d'analyse et de control dans les industries agroalimentaire*. Bourgeois C.M., leveau J-Y .Tec et DOC ,lavoisier : pp152-186.
131. **Lim K.B. et Balolong M.P., (2016).** Isolation and characterization of a broad spectrum bacteriocin from *Bacillus amyloliquefaciens* RX7, *Biomed. Res. Int.* 2016, 2: pp852-1476.
132. **Lopes N.A., et Brandelli A., (2017).** Nanostructures for delivery of natural antimicrobials in food. *Rev. Food Sci. Nutr. Crit.*
133. **Luchansky J.B., et Call J.E., (2004).** Evaluation of nisin-coated cellulose casings for the control of *L. monocytogenes* inoculated onto the surface of commercially prepared frankfurters. *J. Food Prot.*, 67: pp1017-1021.
134. **Luquet F.M., Corrieu G., et Marteau P., (2006).** Bactéries lactiques et probiotiques. In *Acta Endoscopica*, 36,3 : pp376-376.

135. Lv X., Ma H., Sun M., Lin Y., Bai F., Li J., et Zhang B., (2018). A novel bacteriocin DY4-2 produced by *Lactobacillus plantarum* from cutlassfish and its application as bio-preservative for the control of *Pseudomonas fluorescens* in fresh turbot (*Scophthalmus maximus*) fillets, *Food Control*.
- M
136. Mahrous H., Mohamed A., El-Mongy M.A., El-Batal A.I., et Hamza H.A., (2013). Study bacteriocin production and optimization using new isolates of *Lactobacillus* spp. isolated from some dairy products under different culture conditions. *Food Nutr. Sci.* 4: pp342–356.
137. Makhloufi K.M., (2012). Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Thèse Doctorat. Université pierre et marie curie, Paris : pp229.
138. Maky M.A., Ishibashi N., Zendo T., Perez R.H., Doud J.R., Karmi M., et Sonomoto K., (2015). Enterocin F4-9, a novel O-linked glycosylated bacteriocin. *Appl Environ Microbiol*, 81: pp4819–4826.
139. Maldonado-Barragán A., Caballero-Guerrero B., Martín V., Ruiz-Barba J.L., et Rodríguez J.M., (2016). Purification and genetic characterization of gassericin E, a novel coculture inducible bacteriocin from *Lactobacillus gasseri* EV1461 isolated from the vagina of a healthy woman. *BMC Microbiol.*, 16, 1: pp37.
140. Mameche-Doumandji A., (2008). Purification et caractérisation de bactériocine produites par des bactéries lactiques autochtones isolées. Thèse Doctorat, institut national agronomie : pp111.
141. Marchal N., Bourdon J.L., et Richard C.L., (1991). Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries .3 ème Ed., Doin éditeurs, Paris.
142. Marth E.H., et Steele J. L., (2001). *Applied dairy microbiology*. Marcel Dekker, Inc., New York.
143. Martínez B., Fernández M., Suárez J.E., et Rodríguez A., (1999). Synthesis of lactococcin 972, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* IPLA 972, depends on the expression of a plasmid-encoded bicistronic operon. *Microbiology*, 145: pp3155–3161.
144. Matamoros S., (2008). Caractérisation de bactéries lactiques psychrotrophes en vue de leur utilisation dans la biopréservation des aliments : étude physiologique et moléculaire des mécanismes d'adaptation au froid (Doctoral dissertation, Nantes).
145. Mäyrä-Mäkinen A., et Bigret M., (2004). Industrial use and production of lactic acidbacteria. In *lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects* (salminen s., wrighta.v. Et ouwehand a.). 3e ed., marcel dekker, inc. New York: pp73-102.
146. Mennane Z., Khedid K., Zinedine A., Lagzouli M., Ouhssine M., et Elyachioui M., (2007). Microbial Characteristics of Klila and Jben Traditionnal Moroccan Cheese from Raw Cow's Milk. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 2, 1 : pp23-27.
147. Mezaini A., (2011). Essai de mise en évidence rôle de certaines bactéries lactique dans le contrôle des infections. Thèse Doctorat. Ecole nationale supérieure agronomique El-Harrach, Alger : pp72.
148. Minahk C.J., Farías M.E., Sesma F., et Morero R.D., (2000). Effect of Enterocin CRL35 on *Listeria monocytogenes* cell membrane, *FEMS Microbiol. Lett.* 192: pp79–83.

149. Monnet V., Latrille E., Beal C., et Corrieu G., (2008). Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. In Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (corrieu g. Et luquet f.m.). Tec & doc, lavoisier. Paris : pp512-592.
150. Moretto T., Aasen I.M., Storro I., et Axelsson L., (2000). Production of sakacin P by *Lactobacillus sakei* in a completely defined medium. J. Appl. Microbiol., 88: pp536-545.
151. Mozafari M.R., Khosravi-Darani K., Borazan G.G., Cui J., Pardakhty A., et Yurdugul S., (2008b). Encapsulation of food ingredients using nanoliposome technology. Int. J. Food Prop, 11: pp833–844.
152. Mozafari M.R., Johnson C., Hatziantoniou S., et Demetzos C., (2008a). Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. J. Liposome Res. 18, 4: pp309–327.
153. Mustapha A., Ariyapitipun T., et Clarke A.D., (2002). Survival of *Escherichia coli* 0157:H7 on vacuum-packaged raw beef treated with polylactic acid, lactic acid and nisin. J. Food. Sci. 67: pp262-267.



154. Namasivayam S.K.R., Samrat K., Debnath S., et Jayaprakash C., (2015). Biocompatible chitosan nanoparticles incorporated bacteriocin (CSNps-B) preparation for the controlled release and improved anti-bacterial activity against food borne pathogenic bacteria *Listeria monocytogenes*. Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci. 6,5: pp625–631.
155. Nes I.F., Yoon S.S., et Diep D.B., (2007). Ribosomally Synthesized Antimicrobial Peptides (Bacteriocins) in Lactic Acid Bacteria. Review Food Sci Biotechnol, 16: pp675-690.
156. Nigutova K., Morovsky M., Pristas P., Teather R.M., Holo H., et Javorsky P., (2007). Production of enterolysin A by rumen *Enterococcus faecalis* strain and occurrence of enlA homologues among ruminal Gram+ cocci. J. Appl. Microbiol., 102,2: pp563-569.
157. Nilsen T., Nes I.F., et Holo H., (2003). Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG2333. Appl. Environ. Microbiol., 69,5: pp2975-2984.
158. Nissen-Meyer J., Rogne P., Oppegård C., Haugen H.S., et Kristiansen P.E., (2009). Structure-function relationships of the non-lanthioninecontaining peptide (class II) bacteriocins produced by Grampositive bacteria. Curr Pharm Biotechnol, 10: pp19–37.
159. Norfariza J., Stuckey D.C., Ariff A.B., et Wong F.W.F., (2018). Novel approaches to purifying bacteriocin: A review, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 58,14: pp2453-2465.



160. Ouadghiri M., Amar M., Vancanaeyt M., et Swings J., (2005). Biodiversity of lactic acid bacteria in Moroccan soft white cheese (Jben). FEMS Microbiology Letters 251, 2 : pp267-71.
161. Ovchinnikov K.V., Chi H., Mehmeti I., Holo H., Nes I.F., et Diep D.B., (2016). Novel group of leaderless multipeptide bacteriocins from gram-positive bacteria. Appl. Environ. Microbiol., 82, 17: pp5216–5224.



162. Pandit R., Rai M., et Santos C.A., (2017). Enhanced antimicrobial activity of the food protecting nisin peptide by bioconjugation with silver nanoparticles. Environ. Chem. Lett: pp1–10.
163. Papagianni M., (2003). Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function and applications. Biotechnol. Adv., 21,6: pp465-499.

164. **Parada J.L., Caron C.R., Medeiros A.B.P., et Soccol C.R., (2007).** Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 50, 3: pp521–542.
165. **Parente E., Brienza C., Ricciandi A., et Addario G., (1997).** Growth and bacteriocin production by *Enterococcus faecium* DPC 1146 in batch and continuous culture *J. Ind Microbiol Biotechnol*, 18: pp62-67.
166. **Parveen K.S., et Kiran N., (2019).** Bacteriocin-nanoconjugates as emerging compounds for enhancing antimicrobial activity of bacteriocins. *Journal of King Saud University – Science*, 31, 4: pp758-767.
167. **Patton G.C., et Van Der Donk W.A., (2005).** New developments. In lantibiotic biosynthesis and mode of action. *Curr. Opin. Microbiol.*, 8: pp543-551.
168. **Perez R.H., Zendo T., et Sonomoto K., (2014).** Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): Various structures and applications. *Microbial Cell Factories*, 13(Suppl. 1): pp1–13 (S3).
169. **Pierre M.K., Edith M.F.K., Michelle L.T.T., Jules-Bocamdé T., Carmen W., François Z.N., De Lourdes, et Pérez-Chabel M., (2019).** Nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 2MT isolated from freshwater Nile tilapia in Cameroon: Bacteriocin screening, characterization, and optimization in a low-cost medium. *LWT - Food Science and Technology*, 107: pp272–279.
170. **Pingitore E.V., Salvucci E., Sesma F., et Nader-Macías M., (2007).** Different strategies for purification of antimicrobial peptides from Lactic Acid Bacteria (LAB), In A.Méndez-Vilas (Ed.), 2: pp557–568.
171. **Przybycien T.M., Pujar N.S., et Steele L.M., (2004).** Alternative bioseparation operations: life beyond packed-bed chromatography. *Current Opinion in Biotechnology*, 15: pp469–478.
172. **Puizani R.S., Rao R.D., Sunki R., (1992).** Antiinicrobial activity of lactic culture: partial purification and characterization of antimicrobial compounds produced by *Streptococcus Thermophilus*. *J. Food Science*, 44: pp575-578.
- ℞
173. **Raghupathi K.R., Koodali R.T., et Manna A.C., (2011).** Size-dependent Bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles. *Langmuir*, 27: pp4020–4028.
174. **Rasheed H.A., Tuoheti T., Zhang Y., Fidelis A., Tekliye M., et Dong, M., (2020).** Purification and partial characterization of a novel bacteriocin produced by bacteriocinogenic *Lactobacillus fermentum* BZ532 isolated from Chinese fermented cereal beverage (Bozai). *LWT – Food Science and Technology*.
175. **Rashmi K., Anita K.G., Rajput Y.S., Sood S.K., Nadeem A., et Seema P., (2019).** Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 128: pp171 -177.
176. **Ratisbonne Z.K.A., (2009).** Caractérisation de deux souches de *Lactobacillus sakei* utilisées dans la fermentation des produits carnés. *Mémoire Master. Université Montpellier ii et Montpellier i* : pp40.
177. **Reddy Y.K.V., Aranha C., Gupta S.M., et Yedery R.D., (2004).** Evaluation of Antimicrobial Peptide Nisin as a Safe Vaginal Contraceptive Agent in Rabbits: In Vitro and in Vivo Studies. *Reproduction*, 128: pp117-126.

178. Riley M.A., et Wertz J.E., (2002). Bacteriocins: evolution, ecology, and applications. *Annu. Rev. Microbiol*, 56: pp117-137
179. Rodney R.M., Hall J. K., Westwood C.T., Celi P., et Lean I.J., (2016). Precalving and early lactation factors that predict milk casein and fertility in the transition dairy cow. *J. Dairy Sci.*, 99: pp7554– 7567.
180. Rodriguez J.M., Cintas L.M., Casaus P., Suarez A., et Hernandez P., (1995). PCR detection of the lactocin S structural gene in bacteriocin producing lactobacilli from meat. *Appl. Environ. Microbiol*, 61: pp2802-2805.
181. Rogers L.A., (1928). The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Bacteriol*, 5: 161-168.
182. Ryan M.P., Meaney W.J., Ross R. P., et Hill C., (1998). Evaluation of lacticin 3147 and a teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. *Appl. Environ. Microbiol*, 64: pp2287-2290.
- ∞
183. Sahoo T.K., Jena P.K., Patel A.K., et Seshadri S., (2015). Purification and molecular characterization of the novel highly potent bacteriocin TSU4 produced by *Lactobacillus animalis* TSU4. *Appl. Biochem. Biotechnol*, 177: pp90–104.
184. Saidi N., Guessas B., Bensalah F., Badis A., Hadadji M., Henni D.E., Prevost H., et Kihal M., (2002). Caractérisation des bactéries lactiques isolées du lait de chèvre des régions arides. *J. Alg. Reg. Arides*, 1: pp1-11.
185. Sakili D., et Issoual D., (2003). Lactic acid bacteria in processing maroccan smen. Copy right academic d'agriculture de France. Université Moulay Ismail, Faculté des Sciences et Techniques, Département de Biologie Errachidia, Maroc.
186. Sallofe C., (1994). Lactics acid bacteries. Dannone New Latter n°5 July.
187. Salminen S., Wright A.V., et Ouwehand A., (2004). Lactic acid bacteria. microbiological and functional aspects. Marcel Dekker. Inc., U.S.A.
188. Samson B.W., et Koshy P., (2018). Purification, characterization, mode of action, and enhanced production of Salivaricin mmaye1, a novel bacteriocin from *Lactobacillus salivarius* SPW1 of human gut origin. *Electronic Journal of Biotechnology*, 35: pp39–47
189. Saraniya A., et Jeevaratnam K., (2014). Purification and mode of action of antilisterial bacteriocins produced by *Lactobacillus pentosus* SJ65 isolated from UttapamBatter, *J. Food Biochem.*, 38, 6: pp612–619.
190. Saravana K.P., et Annalakshmi, A., (2012). Enhancing the antimicrobial activity of nisin by encapsulating on silver nanoparticle synthesized by bacillus sp. *Int. J. Pharma. Biol. Arch.*, 3: pp406–410.
191. Sass P., Jansen A., Szekat C., Sass V., Sahl H.G., et Bierbaum G., (2008). The lantibiotic mersacidin is a strong inducer of the cell wall stress response of *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiology*, 8, 1: 186.
192. Savadogo A., (2004). Caractérisation biochimique et moléculaire des bactéries lactique productrice d'exopolysaccharide isolée à partir d'échantillons de lait fermenté du Burkina Faso. Thèse doctorat, Ouagadougou : pp143+annexes.
193. Sawa N., Koga S., Okamura K., Ishibashi N., Zendo T., et Sonomoto K., (2013). Identification and characterization of novel multiple bacteriocins produced by *Lactobacillus sakei* D98, *J. Appl. Microbiol.*, 115, 1: pp61–69.

194. Schirch V.E.R.N.E., Hopkins S., Villar E.N.R.I.Q.U.E., et Angelaccio, S. (1985). Serine hydroxy methyltransferase from *Escherichia coli*: purification and properties. *Journal of Bacteriology*, 163,1: pp1-7.
195. Seil J.T., et Webster T.J., (2012). Antimicrobial applications of nanotechnology: Methods and literature. *Int.J.Nanomedicine*, 7: pp2767.
196. Serhan M., Cailliez-Grimal C., Borges F., Revol-Junelles A.M., Hosri C. et Fanni J., (2009). bacterial diversity of darfiyeh, a lebanese artisanal raw goat's milk cheese. *Foodmicrobiol*,26: pp645-652
197. Settanni L., et Corsetti A., (2008). Application of bacteriocins in vegetable food. *Int. J Food Microbiol*, 121: 123-138.
198. Sharma A., et Sharma U.S., (1997). Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *Int. J. Pharm.* 154: pp123–140.
199. Sharma S., Garg A.P., et Singh G., (2010). Optimization of fermentation conditions for bacteriocin production *Lactococcus lactis* CCSULAC1 in modified MRS medium. *Int. J. Dairy Sci.*, 5: pp1-9.
200. Sharma T.K., Sapra M., Chopra A., Sharma R., Patil S.D., Malik, R.K., et Navani, N., (2012). Interaction of bacteriocin-capped silver nanoparticles with food pathogens and their antibacterial effect. *Int. J. Green Nanotechnol*, 4: pp93–110.
201. Skaugen M., Cintas L.M., et Nes I.F., (2003). Genetics of bacteriocin 12 production in lactic acid bacteria. *Genetics of Lactic Acid Bacteria*. Kluwer 13 Academic/Plenum Publishers, N Y. Edited by Brian J.B. Wood and Philip J. 14 Warner: pp 225-260.
202. Smaoui S., (2010). Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse Doctorat, Toulouse : pp251+annexes.
203. Sonbol F.I., Abdel Aziz A.A., El-Banna T.A., et Al-Fakhrany O.M., (2020). Antimicrobial activity of bacteriocins produced by *Enterococcus* isolates recovered from Egyptian homemade dairy products against some foodborne pathogens. *International Microbiology*.
204. Song D.F., Zhu M.Y., et Gu Q., (2014). Purification and characterization of Plantaricin ZJ5, a new bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*ZJ5. *PLoS One* 9 ,8: pp105-549.
205. Stepper J., Shastri S., Loo TS., Preston J.C., Novak P., Man P., Moore C.H., Havlíček V., Patchett M.L., et Norris G.E., (2011). Cysteine S-glycosylation, a new post-translational modification found in glycopeptide bacteriocins. *FEBS Lett*, 585: pp645–650.
206. Stevens K.A., Sheldon B.W., Klapes N.A., et Klaenhammer T.R., (1991). Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 57: pp3613-3615.
207. Stiles M.E., et Holzappel W., (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.*, 36,1 : pp1-29.
208. Strus M., Gosiewski T., Kochan P., et Heczko P.B., (2006). The in vitro effect of hydrogen peroxide on vaginal microbial communities. *FEMS Immuno. Medical Microbiol*, 48: pp56- 63.
209. Sure K.P., Kotnis P.V., Bhagwat P.K., Ranveer R.C., Dandge P.B., et Sahoo A.K., (2016). Production and characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus viridescence* (NICM 2167). *Braz. Arch. Biol. Technol.*

210. Sutyak K.E., Wirawan R.E., Aroutcheva A.A., et Chikindas M.L., (2008). Isolation of the *Bacillus subtilis* antimicrobial peptide subtilisin from the dairy product-derived *Bacillus amyloliquefaciens*. Journal of Applied Microbiology, 104,4: pp1067-1074.

⌘

211. Tabak S.B.A., et Bensoltane A., (2012). L'activité antagoniste des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* et *Lactobacillus bulgaricus*) vis-à-vis de la souche *Helicobacter pylori* responsable des maladies gastroduodénales. Nature & Technologie : pp71-78

212. Tagg J., (2004). Prevention of streptococcal pharyngitis by anti-*Streptococcus pyogenes* bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Streptococcus salivarius*. Indian Journal of Medical Research, 119: pp13-16.

213. Tanous C., Chambellon E., Le Bars D., Delespaul G., et Yvon M., (2006). Glutamate dehydrogenase activity can be transmitted naturally to *Lactococcus lactis* strains to stimulate amino acid conversion to aroma compounds. Appl Environ Microbiol 72: pp402–1409.

214. Tanous C., Gori A., Rijnen L., Chambellon E., et Yvon M., (2005). Pathways for α -ketoglutarate formation in *Lactococcus lactis* and their role in amino acid catabolism. Int. Dairy J., 15: pp759-770.

215. Tantaoui A., et EL marakchi A., (1987). Study of the marocain dairy products Lben and smen Mircen.,3: pp211-220.

216. Todorov S.D., (2009). Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum*—Production genetic organization. Braz. J. Microbiol, 40: pp209–221.

217. Trautner B.W., Hull R.A., et Darouiche R.O., (2005). Colicins prevent colonization of urinary catheters. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 56, 2: pp413-415.

218. Trivedi D., Jena P.K., Seshadri S., (2014). Colicin E2 Expression in *Lactobacillus brevis* DT24, a vaginal probiotic isolate, against uropathogenic *Escherichia coli*. ISRN Urology, 2014: pp7.

219. Tu L., et Mustapha A., (2002). Reduction of *Brochothrix thermosphacta* and *Salmonella* serotype *typhimurim* on vacuum-packaged fresh beef treated with nisin and nisin combined with EDTA. J. Food. Sci., 67: pp302-306.

⌘

220. Upreti G.C., et Hinsdill R.D., (1975). Production and mode of action of lactocin 27: bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. Antimicrob Agents Chemother., Feb,7,2: pp 45-139.

⌘

221. Van Belkum M.J., Hayema B.J., Geis A., Kok J., et Venema G., (1989). Cloning of two bacteriocin genes from a lactococcal bacteriocin plasmid. Appl. Environ. Microbiol., 55: pp1187–1191.

222. Vandamme P., Pot B., Gillis M., De Vos P., Kersters K., et Swings J., (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiol Rev, 60: pp407-438.

223. Venugopal H., Edwards P.J.B., Schwalbe M., Claridge J.K., Libich D.S., Stepper J., Loo T., Patchett M.L., Norris G.E., et Pascal S.M., (2011). Structural, dynamic, and chemical characterization of a novel S-glycosylated bacteriocin. Biochemistry, 50: pp2748–2755.

224. Verluyten V., Leroy F., et De Vuyst L., (2004). Effects of different spices used in production of fermented sausages on growth of and curvacin A production by *Lactobacillus curvatus* LTH 1174. Appl. Environ. Microbiol., 70, 80: pp4807-4813.
225. Vijayakumar P.P., et Muriana P.M., (2015). A microplate growth inhibition assay for screening bacteriocins against *Listeria monocytogenes* to differentiate their mode-of-action. Biomolecules, 5: pp1178–1194.
226. Vollenweider S., (2004). 3-hydroxypropionaldehyde : applications and perspectives of biotechnological production. Appl Microbiol Biotech, 64 : pp16-27.
227. Vos P., Garrity G., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.H., et Whitman, W., (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2e. Vol., 3. New York, NY: Springer-Verlag.



228. Wang J., Zhang S., Ouyang Y., et Li R., (2019). Current developments of bacteriocins, screening methods and their application in aquaculture and aquatic products, Biocatalysis and Agricultural Biotechnolog.
229. Wannun P., Piwat S., et Teanpaisan R., (2016). Purification, characterization, and optimum conditions of fermencin SD11, a bacteriocin produced by human orally *Lactobacillus fermentum* SD11. Applied Biochemistry and Biotechnology, 179,4: pp572–582.
230. Weerapong W., Yuwares M., Supaluk S., Adisorn S., Soottawat B., et Wonnop V., (2016). Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. MESC-06962: pp15.
231. Wiedemann I., Bottiger R.R., Wiese A., Hagge S.O., Gutschmann T., Seydel U., Deegan I L., Hill C., Ross P., et Sahl H.G., (2006). The mode of action of the lantibiotic lactacin 3147a complex mechanism involving specific interaction of two peptides and the cell wall precursor lipid II. Mol. Microbiol, 61: pp285-296.
232. Wong F.W.F., Ariff A.B., Abbasiliasi S., et Stuckey D.C., (2017). Recovery of a bacteriocin-like inhibitory substance from *Pediococcus acidilactici* Kp10 using surfactant precipitation, Food Chem. 232: pp245–252.



233. Yadav M.K., Kumar V., Singh B., et Tiwari S.K., (2017). Phospholipid/Polydiacetylene Vesicle-Based Colorimetric Assay for High-Throughput Screening of Bacteriocins and Halocins. Appl. Biochem. Biotechnol, 182: pp142–154.
234. Yann D., (2003). Production En Continu De Ferments Lactiques Probiotiques Par La Technologie Des Cellules Immobilisées. Thèse Doctorat, université laval, Québec : pp147+annexes.
235. Yateem A., Balba M. T., Al-Surrayai T., Al-Mutairi B., et Al-Daher R., (2008). Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potential from camel milk. Int. J. Dairy Sci, 3: pp194-199.
236. Yoon K.Y., Byeon J.H., Park J.H., et Hwang J., (2007). Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles. Sci. Total Environ., 373: pp572–575.
237. Yousefi M., Ehsani A., et Jafari S.M., (2019). Lipid-based nano delivery of antimicrobials to control food-borne bacteria. Advances in Colloid and Interface Science, 270: pp263–277.



238. **Zacharof M., et Lovitt R.W., (2012).** Bacteriocins produced by lactic acid bacteria: a review article. *APCBEE Proc.*, 2, 50–56.
239. **Zad H., (1998).** Bactéries lactiques isolées de lait de *Camelus dromedarius* : étude microbiologique et biochimique, caractéristiques technologiques, élaboration de ferments lactiques mésophiles et fabrication de fromages. Thèse de doctorat d'état, université de Constantine Algérie.
240. **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: pp219-225.
241. **Zendo T., (2013).** Screening and characterization of novel bacteriocins from lactic acid bacteria. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 77: pp893–899.
242. **Zendo T., Eungruttanagorn N., Fujioka S., Tashiro Y., Nomura K., Sera Y., Kobayashi G., Nakayama J., Ishizaki A., et Sonomoto K., (2005).** Identification and production of a bacteriocin from *Enterococcus mundtii* QU 2 isolated from soybean. *J Appl Microbiol*, 99 : pp1181–1190.
243. **Zhang S., et Mustapha A., (1999).** Reduction of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 numbers on vacuum-packaged fresh beef treated with nisin or nisin combined with EDTA. *J Food Protection*, 62: pp1123-1127.
244. **Zhu X., Zhao Y., Sun Y., et Gu Q., (2014).** Purification and characterisation of plantaricin ZJ008, a novel bacteriocin against *Staphylococcus spp.* from *Lactobacillus plantarum* ZJ008, *Food Chem*, 165: pp216–223.
245. **Zohri M., Alavidjeh M.S., Haririan I., Ardestani M.S., Ebrahimi S.E.S., Sani H.T., et Sadjadi S.A., (2010).** A comparative study between the antibacterial effect of nisin and nisin-loaded chitosan/alginate nanoparticles on the growth of *Staphylococcus aureus* in raw and pasteurized milk samples. *Probiotics Antimicrob. Proteins*, 2: pp258–266.

Annexes

Annexe A « milieux de culture »**Bouillon BHIB (Brain Heart Infusion Broth)**

Protéose-peptone	10g
Infusion de cervelle de veau	12,5g
Infusion de coeur de bœuf	5g
Chlorure de sodium	5g
Phosphate disodique	2g
Glucose	2g
Eau distillée	1000ml

pH 7,4. Stériliser par autoclave à 120°C pendant 15min.

Bouillon MRS (Man Rogosa et Sharpe)

Polypeptone	10 g
Extrait de viande	10g
Extrait autolytique de levure	5g
Glucose	20g
Tween 80	1ml
Phosphate dipotassique	2g
Acétate de sodium	5g
Citrate d'ammonium	2g
Sulfate de magnésium	0,20g
Sulfate de manganèse	0,05g
Eau distillée	1000ml

pH 5,7 Stériliser par autoclave à 120°C pendant 15min.

Eau peptonée tamponnée (EPT)

Peptone	20g
Chlorure de sodium	5g
Phosphate disodique	9g
Phosphate monopotassique	1,5g
Eau distillée	1000ml

pH 7,2. Stériliser par autoclave à 120°C pendant 15min.

Gélose MRS (Man Rogosa et Sharpe)

Peptone	10g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	5g
Glucose	20g
Tween 80	1ml
Phosphate dipotassique	2g
Acétate de sodium	5g
Citrate triammonium	2g
Sulfate de magnésium	0,20g
Sulfate de manganèse	0,05g
Eau distillée	1000ml

pH 6,2 Stériliser par autoclave à 120°C pendant 15min.

Gélose M17

Peptone de caséine	2,50g
Peptone de viande	2,50g
Peptone de soja	5g
Extrait de levure	2,50g
Extrait de viande	5g
Lactose	5g
Glycérophosphate de sodium	19g
Sulfate de magnésium	0,25g
Acide ascorbique	0,50g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

pH 7,2 Stériliser par autoclave à 120°C pendant 15min.

Gélose CATC (Citrates Azides Tween Carbonate)

Peptone de caséine	15g
Extrait de levure	05g
Potassium KH ₂ PO ₄	06g
Citrate de Sodium	05g
Tween 80	1ml
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

pH 7 +/- 0,2 Stériliser par autoclave à 120°C pendant 15min.

Solutions ajoutées

Carbonate de Sodium	2g
TTC	0,1g
Azide de Sodium	0,4g

Stérilisation des solutions par filtration.

Gélose Muller-Hinton

Extrait de viande	2g
Hydrolysate acide de caséine	17,5g
Amidon	1,5g
Agar	10g
Eau distillée	1000ml

pH 7,4 Stériliser par autoclave à 120°C pendant 15min.

Gélose de Columbia au sang

Peptones	23g
Amidon	1g
Chlorure de sodium	5g
Agar	10g
Sang	50ml

pH 7,3 Stériliser par autoclave à 120°C pendant 15min le milieu de base.

Après refroidissement du milieu de base ajouter le sang défibriné stérile dans une zone stérile.

Gélose à l'esculine

Peptones	10g
Esculine	1g
Citrate de fer ammoniacal	1g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

pH 7,5 Stériliser par autoclave à 120°C pendant 15min.

Annexe B « Coloration de Gram »

La coloration de Gram a été effectuée selon le protocole décrit par **Prescott et al., 2003**.

1. Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre
2. Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec la goutte d'eau, strier et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène
3. Couvrir le frottis par du cristal violet pendant 60 secondes
4. Laver l'excès du colorant avec de l'eau distillée
5. Couvrir de Lugol pendant 30 secondes
6. Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes
7. Rincer immédiatement le frottis avec l'alcool en inclinant la lame et par goutte à goutte jusqu'à disparition complète de la coloration violette
8. Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes
9. Couvrir avec de la fuschine pendant 15 secondes
10. Laver à l'eau distillée pendant 10 secondes
11. Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope à un fort grossissement.

Les cellules Gram+ absorbent la couleur du cristal violet et demeurent bleues violettes en apparence, contrairement aux cellules Gram- qui apparaissent distinctement rosâtres.