



HAL
open science

**Recherche de molécules bioactives d'origine
microbienne : caractérisation biochimique et moléculaire
des souches de bactéries isolées du Soumbala, du Bikalga
et de certains yaourts consommés au Burkina Faso,
productrices de bactériocines**

Essodolom Taale

► **To cite this version:**

Essodolom Taale. Recherche de molécules bioactives d'origine microbienne : caractérisation biochimique et moléculaire des souches de bactéries isolées du Soumbala, du Bikalga et de certains yaourts consommés au Burkina Faso, productrices de bactériocines. Biologie moléculaire. Université Ouaga I Pr Joseph KI-ZERBO, 2016. Français. NNT : . tel-01290941

HAL Id: tel-01290941

<https://hal.science/tel-01290941>

Submitted on 19 Mar 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ OUAGA I PR JOSEPH KI-ZERBO

.....

École Doctorale

Sciences et Technologie

.....

Laboratoire : Centre de Recherche en Sciences

Biologiques, Alimentaires et Nutritionnelles



N° d'ordre...../

THÈSE UNIQUE

Présentée par

Essodolom TAALE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Ouaga I Pr Joseph KI-ZERBO

Option : Sciences Biologiques Appliquées

Spécialité : Microbiologie-Biologie Moléculaire

Sur le thème :

Recherche de molécules bioactives d'origine microbienne : caractérisation biochimique et moléculaire des souches de bactéries isolées du *Soumbala*, du *Bikalga* et de certains yaourts consommés au Burkina Faso, productrices de bactériocines

Soutenue publiquement, le 6 Février 2016 devant le Jury composé de :

Président : Jacques SIMPORE, Professeur Titulaire en Biologie et Génétique Moléculaires, Université Ouaga I Pr Joseph KI-ZERBO, Burkina Faso (Rapporteur)

Membres : Alfred S. TRAORE, Professeur Titulaire en Biochimie-Microbiologie, Université Ouaga I Pr Joseph KI-ZERBO, Burkina Faso (Directeur de thèse) ;

Lamine Saïd BABA-MOUSSA, Professeur Titulaire en Biochimie et Biologie Moléculaire, Université d'Abomey-Calavi, Bénin (Rapporteur) ;

Yaovi Agbékponou AMEYAPOH, Maître de Conférences en Microbiologie - Biochimie, Université de Lomé, Togo (Rapporteur) ;

Aly SAVADOGO, Maître de Conférences en Biochimie-Microbiologie, Université Ouaga I Pr Joseph KI-ZERBO, Burkina Faso.

DÉDICACE

A mes parents Professeur Elias Kodjo DonkorTAALE et Amah Grâce PAROU.
Votre affection et votre soutien ont été déterminant dans la réalisation de ce travail.
Soyez bénis.

A Blandine, pour tout le bonheur que tu me procures.

A mes fils Wiyao et Warou, vous êtes ma fierté.

A mes frères et sœurs

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au Centre de Recherche en Sciences Biologiques, Alimentaires et Nutritionnelles (CRSBAN), du département de Biochimie-Microbiologie, de l'Unité de Formation et de Recherche en Sciences de la Vie et de la Terre (UFR-SVT), de l'Université Ouaga I Pr Joseph KI-ZERBO (Burkina Faso) avec la collaboration du Laboratoire de Biologie et de Typage Moléculaire en Microbiologie, du département de Biochimie et Biologie Cellulaire, de la Faculté des Sciences et Techniques, de l'Université d'Abomey-Calavi (Bénin). Au terme de ce travail, nos remerciements vont :

Au **Pr Alfred S. TRAORE**, Professeur Titulaire en Biochimie – Microbiologie à l'Université Ouaga I Pr Joseph KI-ZERBO, responsable pédagogique de la formation Doctorale en Biotechnologies, Président du Réseau Ouest Africain de Biotechnologies (RA-BIOTECH), Directeur du CRSBAN et Directeur de cette thèse, pour nous avoir accueilli dans son centre et nous avoir offert l'opportunité de faire nos premiers pas dans la recherche scientifique. Hommages respectueux ;

Au **Dr Aly SAVADOGO**, Maître de Conférences en Biochimie – Microbiologie au département de Biochimie – Microbiologie à l'UFR-SVT de l'Université Ouaga I Pr Joseph KI-ZERBO, pour avoir suivi ce travail, pour sa disponibilité, pour ses multiples conseils et son appui moral, pratique et théorique. Veuillez trouver ici, l'expression de mes sincères reconnaissances. Merci d'avoir accepté de siéger dans ce jury comme membre ;

Au **Pr Jacques SIMPORE**, Professeur Titulaire en Génétique et en Biologie Moléculaire à l'Université Ouaga I Pr Joseph KI-ZERBO (Burkina Faso) pour avoir accepté d'être rapporteur et président de jury de cette thèse et pour aussi m'avoir accordé l'opportunité de suivre les techniques de séquençage au CERBA (Centre de Recherche Biomoléculaire Pietro Annigoni) ;

Au **Pr Nicolas BARRO**, Professeur Titulaire en Biochimie – Microbiologie, Vice-président chargé des Enseignements et des Innovations pédagogiques de l'Université Ouaga I Pr Joseph KI-ZERBO et responsable du LABESTA (Laboratoire de Biologie Moléculaire, d'Epidémiologie et de Surveillance des Bactéries et Virus Transmissible par l'Eau et les Aliments) de l'UFR-SVT de l'Université Ouaga I Pr Joseph KI-ZERBO. Toutes nos reconnaissances pour votre soutien et vos conseils tout au long de cette étude ;

Au **Dr Cheikna ZONGO**, Maître-Assistant en Biochimie – Microbiologie au Département de Biochimie – Microbiologie de l’UFR-SVT de l’Université Ouaga I Pr Joseph KI-ZERBO, pour ses encouragements, ses conseils et ses soutiens multiformes depuis le DEA jusqu’à l’aboutissement de cette thèse et le temps consacré à la lecture et à la correction de cette thèse. Qu’il trouve ici l’expression de ma reconnaissance ;

Au **Dr Marius K. SOMDA**, Assistant en Microbiologie – Biotechnologie au Département de Biochimie – Microbiologie de l’UFR-SVT de l’Université Ouaga I Pr Joseph KI-ZERBO, pour ses encouragements, ses conseils et ses soutiens multiformes depuis le DEA jusqu’à l’aboutissement de cette thèse. Qu’il trouve ici l’expression de ma reconnaissance.

Toute ma reconnaissance à tous les enseignants du CRSBAN pour l’enseignement de qualité qu’ils ne cessent de dispenser afin que les sociétés africaines arrivent à intégrer les biotechnologies comme facteur incontournable d’un développement durable et efficace.

Mes remerciements s’adressent aussi :

Au **Pr Lamine Said BABA-MOUSSA**, Professeur Titulaire en Biochimie, Microbiologie et Biologie Moléculaire, Directeur du Laboratoire de Biologie et de Typage Moléculaire en Microbiologie du Département de Biochimie et de Biologie Cellulaire, de la Faculté des Sciences et Techniques (FAST) de l’Université d’Abomey-Calavi (Bénin), pour m’avoir accueilli dans son laboratoire pour la PCR, le Séquençage partiel du gène 16S rRNA des souches de *Lactobacillus* et la bioinformatique. Merci professeur d’avoir accepté d’être rapporteur de cette thèse et membre du jury. Cher Professeur, veuillez accepter toute notre reconnaissance ;

Au **Dr Yaovi Agbékponou AMEYAPOH**, Maître de Conférences en Microbiologie – Biochimie à l’Ecole Supérieure des Techniques Biologiques et Alimentaires (ESTBA) de l’Université de Lomé (Togo) pour avoir accepté d’être rapporteur et membre de jury de cette thèse. Veuillez accepter toute notre reconnaissance.

Toute ma reconnaissance va au **Dr Simplicie KAROU**, Maître de Conférence en Biochimie à l’ESTBA (Ecole Supérieure des Techniques Biologiques et Alimentaires) de l’Université de Lomé pour ces encouragements, son soutien et pour m’avoir permis de découvrir le CRSBAN.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude aux Messieurs et Mesdames suivants pour leurs disponibilités et leurs conseils : **Dr François TAPSOBA ; Dr Joseph SAWADOGO, Dr Gertrude BSADJO TCHAMBA, Adama SAWADOGO, Fulbert GUIRA, Serge KOUHOUNDE, Valéry BAZIE, Désiré TRAORE, Benoît TRAORE et Bakary TARNAGDA.**

Aux **Dr Abdel Haziz SINA OROU**, Maître Assistant en Biochimie et Biologie Moléculaire et **Dr Pacôme A. D. NOUMAVO**, Assistant au Laboratoire de Biologie et de Typage Moléculaire en Microbiologie du Département de Biochimie et Biologie Cellulaire, de la Faculté des Sciences et Techniques (FAST) de l'Université d'Abomey-Calavi (Bénin), pour tous leurs soutiens et assistances.

Je tiens à remercier **Marius Durand DAH NOUVLESSOUNON** et son épouse **Michaëlle CHOKKI** et **Christine N'TCHA** et son époux **Gildas BOKO**, ainsi que leur famille respective, pour l'accueil qu'ils m'ont réservé et pour la chaleur familiale qu'ils m'ont permis d'avoir tout au long de mon séjour à Abomey-Calavi (Bénin). Mes remerciements vont également à tous les étudiants en Master et doctorants du **Pr Lamine Said BABA-MOUSSA**. J'espère que c'est le début d'une longue et fructueuse collaboration.

Aux **Dr Issiaka SOULAMA** (Responsable du laboratoire de Biologie Moléculaire) et **Mr Samuel S. SÉRÉMÉ** (Responsable de l'Unité de Parasitologie Moléculaire) du Centre National de Formation et de Recherche sur le Paludisme (CNRFP) à Ouagadougou (Burkina Faso) pour tout leur soutien dans la réalisation de cette étude. Veuillez accepter toutes nos reconnaissances.

Au Réseau Ouest Africain des Biotechnologies (RABIOTECH), qui à travers son programme de formation m'a permis de pouvoir faire mon DEA et ma thèse. En effet, le RABIOTECH qui a son siège au CRSBAN à l'UFR-SVT de l'Université Ouaga I Professeur Joseph KI-ZERBO est un fruit de la coopération entre universités et structures de formation des pays ci-dessous : Bénin, Burkina Faso, Côte d'Ivoire, Guinée-Conakry, Mali, Niger, Togo et d'autres partenaires comme le Centre International de Recherche Développement sur l'Élevage en zone Sub-humide (CIRDES)- Bobo Dioulasso ; EISMV-Sénégal. Ce réseau sous régional bénéficie de l'appui de plusieurs partenaires de l'enseignement supérieur (Association des Universités Africaines- AUA, UNESCO, Banque Mondiale, CAMES, Agence Universitaire de la Francophonie- AUF, ISP/IPICS/Suède, OPCW, etc.). Le RABIOTECH bénéficie aussi du soutien des partenaires du Nord provenant des pays comme la Belgique (Faculté Universitaire de Gembloux, Université de Liège, etc.), de la France (Université de la méditerranée, Université Louis Pasteur de Strasbourg, Centre de Génétique Moléculaire de Gif-sur-Yvette-CNRS, Université d'Aix-Marseille, Université Paris VI, Université Paris XII), de l'Italie (Université de Rome), du Pays Bas (Université de Groningen, Université de Wageningen). Le réseau RABIOTECH a permis

au CRSBAN d'être érigé en pôle régional d'excellence en Biotechnologie d'une part par l'AUA et d'autre part par l'AUF.

Au Programme d'Appui aux Centres d'Excellence Régionaux (PACER II) de l'Union Economique et Monétaire Ouest Africaine (UEMOA) pour son soutien.

A West African Research Association pour avoir financé la partie séquençage à travers son programme WARC (West African Research Council) Travel Grantees 2014 program, soutenu par Bureau of Educational and Cultural Affairs of the US Department of State through a grant from the Council of American Overseas Research Centers.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE	i
REMERCIEMENTS	ii
LISTE DES FIGURES.....	xii
LISTE DES TABLEAUX.....	xiv
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xv
RÉSUMÉ	xvii
ABSTRACT.....	xviii
PUBLICATIONS ISSUES DE LA THÈSE	xix
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
1. MOLÉCULES BIOACTIVES	5
1.1. Bactériocines	5
1.1.1. Généralités.....	5
1.1.2. Définitions.....	6
1.1.3. Classification des bactériocines	7
1.1.4. Différents types de bactériocines	9
1.1.4.1. Bactériocines de classe I	11
a) Lantibiotiques	11
b) Labyrinthopeptines	11
c) Sactibiotiques	12
1.1.4.2. Bactériocines de la classe II.....	12
a) Bactériocines ressemblant à la pédiocine	12
b) Bactériocines à deux composantes non-modifiées	13
c) Bactériocines circulaires.....	14
d) Peptides linéaires non-modifiés ne ressemblant pas à la pédiocine	15
1.1.4.3. Bactériolysines	15
1.1.4.4. Colicines	15
1.1.4.5. Microcines.....	16
1.1.4.6. Archéocines.....	17
1.1.5. Mode et mécanisme d'action des bactériocines.....	17
1.1.5.1. Mode d'action des bactériocines.....	17
a) Généralités	17
b) Mode d'action des lantibiotiques.....	17

c) Mode d'action des bactériocines de classe II	19
d) Mode d'action des Microcines et des Colicines	22
e) Mode d'action des archéocines	22
1.1.5.2. Mécanisme d'action générale des bactériocines	22
1.1.6. Organisation génétique et production des bactériocines	26
1.1.6.1. Généralités	26
1.1.6.2. Organisation génétique des lantibiotiques	26
1.1.6.3. Organisation génétique des bactériocines de classe II	28
1.1.6.4. Organisation génétique des Microcines et des Colicines	30
1.1.6.5. Organisation génétique des halocines	30
1.1.7. Applications des bactériocines	30
1.1.7.1. Applications en Agroalimentaire	30
1.1.7.2. Applications médicales des bactériocines	32
1.1.7.3. Impact économique des bactériocines	33
1.2. Peptides NRPS (Non-Ribosomal Peptides Synthetases)	34
1.2.1. Historique	34
1.2.2. Diversité des peptides NRPS	34
1.2.3. Structure des peptides NRPS	34
1.2.4. Synthèses des peptides NRPS	35
1.2.5. Activités biologiques des peptides NRPS	37
1.3. Autres peptides bioactifs	38
2. BACTÉRIES PRODUCTRICES DE BACTÉRIOCINES	39
2.1. Bactéries à Gram positives productrices de bactériocines	39
2.1.1. Bactéries lactiques	39
2.1.1.1. Principales caractéristiques des bactéries lactiques	39
2.1.1.2. Caractéristiques morphologiques des bactéries lactiques	40
2.1.1.3. Différents genres des bactéries lactiques	40
2.1.1.4. Écologie des bactéries lactiques	44
2.1.1.5. Caractères biochimiques et physiologiques des bactéries lactiques	44
2.1.1.6. Caractères moléculaires des bactéries lactiques	45
2.1.1.7. Utilité des bactéries lactiques	45
2.1.1.8. Effets des bactéries lactiques sur la santé humaine et animale	46
2.1.1.9. Bactériocines produites par les bactéries lactiques	47
2.1.1.10. Genre <i>Lactobacillus</i>	49
a) Généralités sur les bactéries du genre <i>Lactobacillus</i>	49

b) Identification des <i>Lactobacillus</i>	49
2.1.2. Genre <i>Bacillus</i>	50
2.2. Bactéries à Gram négatives.....	52
2.3. Archées	53
3. DIFFÉRENTES MÉTHODES GÉNOTYPIQUES	54
3.1. Contenu en guanine et cytosine de l'ADN chromosomique.....	54
3.2. Hybridation ADN-ADN.....	54
3.3. Amplification aléatoire d'ADN polymorphe	55
3.4. Analyse des fragments de restriction de l'ADN ribosomique amplifié (ARDRA)	55
3.5. Polymorphisme de longueur des fragments amplifiés (AFLP).....	56
3.6. Le profil plasmidique	56
3.7. Electrophorèse en champs pulsés de l'ADN chromosomique digéré (Pulsed Field Gel Electrophoresis)	57
3.8. Repetitive extragenic palindromic-Polymerases Chain Reaction (rep-PCR)	57
3.9. Séquençage génétique de Sanger	58
3.9.1. Principe de la méthode de SANGER	58
3.9.2. Séquençage de l'ARNr 16S et son utilisation.....	59
3.9.2.1. Principe général.....	59
3.9.2.2. Arbres phylogénétiques.....	60
3.9.2.3. Avantages de l'utilisation des séquences 16S rRNA	61
3.9.2.4. Limites de l'utilisation des séquences 16S rRNA.....	62
CHAPITRE II : MATÉRIEL & MÉTHODES	63
1. Cadre et période d'étude	64
2. Matériel biologique	64
3. Méthodologie	65
3.1. Méthodes microbiologiques	65
3.1.1. Isolement des bactéries	65
3.1.2. Conservation des souches isolées	65
3.1.3. Caractérisations morphologiques	65
3.1.3.1. Observation à l'état frais	65
3.1.3.2. Coloration de Gram.....	66
3.1.4. Caractérisations biochimiques	66
3.1.4.1. Test à la catalase	66
3.1.4.2. Test de sporulation	66
3.1.4.3. Test d'oxydase	66

3.1.4.4. Test d'urée, de l'O.N.P.G, d'indole et de production d'acétoïne	67
3.1.4.5. Fermentation des sucres et étude de la mobilité des souches	67
a) Fermentation du glucose et du lactose avec production de sulfure d'hydrogène et de gaz.....	67
b) Étude fermentaire de quelques sucres	68
c) Étude de la mobilité des souches et utilisation du mannitol.....	68
3.1.5. Recherche des souches productrices de substances à activité antibactérienne	68
3.2. Etude de l'influence du pH et de la température sur la croissance des souches appartenant au groupe des bactéries lactiques.....	69
3.2.1. Influence du pH sur la croissance des souches lactiques	69
3.2.2. Influence de la température sur la croissance des souches lactiques	69
3.2.3. Technique de détermination de taux de croissance, du pH optimal et de la température optimale	70
3.3. Méthodes de Biologie moléculaire	71
3.3.1. Extraction et purification d'ADN génomique des Bacilles à Gram positifs.....	71
3.3.2. Extraction et purification d'ADN génomique des Cocci à Gram positifs	71
3.3.3. Dosage de l'ADN extrait.....	72
3.3.4. Amplification de l'ADN par PCR.....	72
3.3.4.1. Composition des mélanges réactionnels de la PCR	72
3.3.4.2. Amorces utilisées	72
3.3.4.3. Réactions d'amplifications.....	74
3.3.4.4. Électrophorèse des produits PCR sur gel d'agarose	75
a) Préparation du gel d'agarose 1,5%	75
b) Électrophorèse et révélation	75
3.4. Séquençage	75
3.4.1. Purification des produits PCR.....	75
3.4.1.1. Dissolution du gel d'agarose	76
3.4.1.2. Fixation du DNA.....	76
3.4.1.3. Lavage	76
3.4.1.4. Elution	77
3.4.2. Les réactions de séquençage	77
3.4.3. Traitement des séquences.....	77
3.4.4. Aligement des séquences et recherche des différents opérons de plantaricines	78
3.5. Analyses statistiques des données chiffrées.....	78

CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSION	79
Partie I : Caractérisation des souches de bactéries lactiques productrices de substances bioactives isolées à partir d'aliments fermentés.....	80
1. Caractères morphologiques des souches étudiées.....	80
2. Caractères morphologiques des bactéries du groupe 1	80
3. Caractéristiques biochimiques des bactéries du groupe 1	82
4. Activité antimicrobienne des substances produites par les souches de bactéries lactiques	86
5. Détermination des paramètres de croissance des souches de bactéries lactiques	88
5.1. Détermination du pH optimal de croissance des souches de bactéries lactiques.....	88
5.2. Détermination de la température optimale de croissance des souches de bactéries lactiques .	89
6. Identification des souches de bactérie lactiques	92
6.1. Identification des souches lactiques de forme bacillaire.....	92
6.2. Identification des souches de forme coccoïde.....	93
6.2.1. Utilisation du couple d'amorces LcF et LcR spécifiques aux <i>Lactococcus</i> sp.....	93
6.2.2. Utilisation du couple d'amorces PedF et PedR spécifiques aux <i>Pediococcus</i> sp.	94
6.3. Recherche des gènes des bactériocines chez les souches de bactéries lactiques	95
Conclusion partielle	96
Partie II: Caractérisation de souches de <i>Bacillus</i> productrices de Bacteriocin-Like Inhibitory Substances (BLIS).....	97
1. Caractères morphologiques des bactéries appartenant au genre <i>Bacillus</i>	97
2. Caractéristiques biochimiques des souches de <i>Bacillus</i>	97
3. Activité antimicrobienne des souches du genre <i>Bacillus</i> à l'encontre de <i>Micrococcus luteus</i> LMG3293.....	99
4. Identification des souches de <i>Bacillus</i>	101
4.1. Identification du genre bactérien.....	101
4.2. Identification des espèces de <i>Bacillus</i>	103
4.2.1. Identification des espèces appartenant au groupe de <i>Bacillus subtilis</i>	103
4.2.2. Identification des espèces appartenant au groupe de <i>Bacillus cereus</i>	104
5. Recherche des gènes de substances BLIS.....	105
Conclusion partielle	106
Partie III : Détermination de séquences partielles du gène 16S rRNA de quatre souches lactiques de forme Bacillaire/ <i>Lactobacillus</i>	107
1. Détermination des séquences nucléotidiques partielles des souches de <i>Lactobacillus</i>	107
2. BLAST ou alignement des séquences nucléotidiques partielles du gène 16S rRNA des souches de <i>Lactobacillus</i>	107

3. Relation phylogénétique entre les souches de <i>Lactobacillus</i> étudiées.....	111
4. Screening des différents gènes du locus <i>pln</i> codant pour les plantaricines chez les espèces de <i>Lactobacillus plantarum</i>	112
Conclusion partielle	116
CONCLUSION & PERSPECTIVES.....	117
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	119
ANNEXES	I
Annexe 1 : Milieux de culture utilisés	II
Annexe 2 : Séquences nucléotidiques partielles du gène 16S rRNA des quatre souches de <i>Lactobacillus</i>	IV
Annexe 3 : Les Articles publiés	V
Annexe 4 : Articles soumis	XXVI
Annexe 4 : Communications affichées	XXVIII
Annexe 4 : Résumé des communications orales	XXX

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Classification universelle des bactériocines	8
Figure 2 : Séquence en acides aminés du labyrinthopeptine A2 produit par <i>Actinomadura namibiensis</i>	12
Figure 3 : Séquence en acides aminés de la pédiocine PA-1 produite par <i>Pseudomonas acidilactici</i> ...	13
Figure 4 : Séquence en acides aminés de l'entéroisine AS-48	14
Figure 5 : Séquence en acides aminés de la microisine J25 produite par la souche d' <i>Escherichia coli</i> montrant sa structure en lasso	16
Figure 6: Principaux mécanismes d'action des Microisines.....	23
Figure 7: Schéma montrant les principaux mécanismes d'action des bactériocines produites par les bactéries à Gram positives	25
Figure 8 : Diagramme schématique de la biosynthèse des lantibiotiques.....	27
Figure 9 : Organisation génétique de l'entéroisine AS-48.....	28
Figure 10: Diagramme schématique de la biosynthèse des bactériocines de classe II	29
Figure 11: Exemple de chromatogramme obtenu en incorporant les fluorophores dans les réactions de séquençage	59
Figure 12 : Aspect des colonies de la souche Y3 sur PCA	81
Figure 13 : Activité antimicrobienne des substances produites par la souche S5 à l'encontre de <i>Micrococcus luteus</i> LMG 3293.....	86
Figure 14: pH optimal de croissance de chaque souche de bactérie lactique	89
Figure 15: Température optimale de croissance	91
Figure 16: Taux de croissance maximale de chaque souche à pH optimal et température optimale de croissance	91
Figure 17: Résultats de l'amplification par les amorces spécifiques aux <i>Lactobacillus</i> des souches lactiques de forme bacillaire	92
Figure 18: Résultats de l'amplification par les amorces spécifiques aux <i>Lactococcus</i> des souches de forme sphérique.....	93
Figure 19: Résultats de l'amplification par les amorces spécifiques aux <i>Pediococcus</i> des souches de forme sphérique.....	94
Figure 20: Amplification des gènes 16S rDNA des bactériocines chez les bactéries lactiques	95
Figure 21: Résultats de l'amplification des 13 bactéries du groupe 2 avec les amorces B-K1/5F et B-K1/3R spécifiques aux <i>Bacillus</i> sp.....	101
Figure 22: Identification des souches de <i>Bacillus</i> au stade genre avec les amorces LbF and LbR spécifiques au genre <i>Lactobacillus</i>	102

Figure 23: Résultats de l'amplification des 13 bactéries du groupe 2 avec les amorces Bsub5F et Bsub3R spécifiques aux <i>Bacillus subtilis</i>	103
Figure 24: Résultats de l'amplification des 13 bactéries du groupe 2 avec les amorces Ba1F et Ba1R spécifiques aux <i>Bacillus cereus</i>	104
Figure 25: Résultats de l'amplification des 13 souches de <i>Bacillus</i> avec les amorces spécifiques aux souches bactériennes productrices de bactériocines	105
Figure 26 : Arbre phylogénétique construit à partir de l'alignement des séquences nucléotidiques partielles de 16S rRNA de <i>Lactobacillus plantarum</i> strain Lf1	110
Figure 27: Relation phylogénétique potentielle entre les souches de <i>Lactobacillus</i> étudiées	112

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Quelques exemples de bactériocines avec leur classe d'appartenance.....	10
Tableau II: Spectre d'action des Lantibiotiques	18
Tableau III : Spectre d'action des bactériocines de classe II	20
Tableau IV : Spectre d'action des Colicines et des Microcines.....	24
Tableau V : Quelques bactériocines utilisées dans la conservation des aliments.....	31
Tableau VI : Liste des domaines et motifs correspondants impliqués dans la synthèse de peptides non-ribosomique.	36
Tableau VII : Caractéristiques des différents genres de bactéries lactiques	42
Tableau VIII: Bactériocines produites par les bactéries à Gram positives	48
Tableau IX : Quelques Microcines et Colicines produites par les bactéries à Gram négatives.....	52
Tableau X: Origine de souches bactériennes utilisées lors de cette étude	64
Tableau XI: Liste des amorces utilisées.....	73
Tableau XII : Programmes PCR	74
Tableau XIII : Caractéristiques morphologiques des souches utilisées lors de cette étude.....	80
Tableau XIV: Caractéristiques biochimiques et utilisation des sucres par les souches lactiques.....	82
Tableau XV: Diamètre d'inhibition des substances produites par les souches lactiques à l'encontre de <i>Micrococcus luteus</i> LMG 3293.....	86
Tableau XVI: Taux de croissance maximale de chaque souche de bactérie lactique en fonction du pH	88
Tableau XVII: Taux de croissance maximale de chaque souche de bactérie lactique en fonction de la température.....	90
Tableau XVIII : Caractéristiques biochimiques et utilisation des sucres par les souches de <i>Bacillus</i> ...	98
Tableau XIX : Diamètre d'inhibition des souches de <i>Bacillus</i> sp. à l'encontre de <i>Micrococcus luteus</i> LMG 3293.....	99
Tableau XX : Résultats des alignements consécutifs des séquences nucléotidiques partielles du gène 16S rRNA des quatre souches de <i>Lactobacillus</i>	108
Tableau XXI : Résultats des alignements à partir de BLASTn et BAGEL3 des séquences partielles du gène 16S rRNA	113
Tableau XXII : Organisation génétique possible du gène <i>pln</i>	114

LISTE DES ABRÉVIATIONS

% : Pourcentage	ddNTPs : didéoxynucléotides triphosphates
α : Alpha	dNTPs : déoxynucléotides triphosphates
β : Béta	DO : Densité optique
°C : Degré Celsius	E. : <i>Enterococcus</i>
μl : Microlitre	EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique
μm : micromètre	G : Guanine
A : Adénine	GRAS : Generally Recognized As Safe
aa : Acides aminés	H₂S : Sulfure d'hydrogène
ABC : ATP Binding Cassette	HPH : Hautes Pressions Hydrostatiques
ADN : Acide Désoxyribonucléique	HPK : Protéine Histidine Kinase (Histidine Kinase Protein)
ADNr : Acide Désoxyribonucléique ribosomal	HPLC : Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance
AFLP : Amplified Fragment Length Polymorphism	ITS : Intergenic Spacer Région
ARDRA : Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis	K.I.A :Kliger Iron Agar
ARN : Acide Ribonucléique	K⁺ : Ion Potassium
ARNr : Acide Ribonucléique ribosomal	KDa : Kilo Dalton
ATCC : American Type Culture Collection	Lb. : <i>Lactobacillus</i>
ATP : Adénosine Triphosphate	Lc. : <i>Lactococcus</i>
B : <i>Bacillus</i>	ml : Millilitre
Bact. : Bactériocine	MLST : Multi Locus Sequence Typing
BCC : Bouillon cœur-cerveille	mm : millimètre
Bif. : <i>Bifidobacterium</i>	mol% : Pourcentage moléculaire
BL : Bactéries lactiques	MRS : Man, Rogosa et Sharpe
BLAST : Basic Local Alignment Search Tool	Na⁺ : Ions Sodium
BLASTn : Basic Local Alignment Search Tool using Nucleotides query	NaCl : Chlorure de sodium
BLIS : Bacteriocin-Like Inhibitory Substances	NaOH : Hydroxyde d'Hydrogène
BN : Bouillon nutritif	ND : Non Déterminé
C : Cytosine	NRPS : Non Ribosomal Peptide Synthetase
Cs⁺ : Ion Césium	O.N.P.G : Ortho Nitro Phényl Galactopyranoside
	ORF : Open Reading Frame

PAGE : Électrophorèse sur Gel de Polyacrylamide

pb : Paire de bases

PCA : Plate Count Agar

PCR: Polymerase Chain Reaction

Ped. : *Pediococcus*

PFGE: Pulse Field Gel Electrophoresis

pH: Potentiel d'hydrogène

RAPD: Random Amplified Polymorphism

DNA

Rb⁺: Ion Rubanum

rpm :Rotations par minute

RR : Régulateur de Réponse

SARM : *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline

sp.: Espèce

S-S: Pont sulfure

subsp.ou spp. : Sous-espèce

T : Thymine

TBE: Tris Borate EDTA

TSA: Trypticase-soja Agar

TSB: Trypticase-soja Broth

U : Uracile

UFC : Unité Formant Colonie

RÉSUMÉ

Les molécules bioactives de type bactériocines constituent une source potentielle dans la recherche de nouvelles molécules capables de jouer le rôle des antibiotiques. Le but de cette étude est de rechercher les bactéries productrices de bactériocines et les types de bactériocines qu'elles peuvent produire. Vingt-deux souches bactériennes ont été isolées à partir d'aliments fermentés locaux burkinabé (*Soumbala*, lait fermenté, yaourt local et *Bikalga*), puis caractérisées par les méthodes de microbiologie, de physiologie, de PCR, de séquençages et de bio-informatiques. La recherche de gènes de molécules bioactives a consisté à rechercher les gènes *pln* codant pour les plantaricines. Cette recherche a été réalisée en ligne en utilisant les logiciels NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) et BAGEL3 (<http://bagel.molgenrug.nl/index.php/bagel3>) par alignement des séquences nucléotidiques partielles du gène 16S rRNA de quatre souches de *Lactobacillus*.

La combinaison de ces méthodes a permis d'identifier et de classer les 22 souches en deux groupes distincts : le groupe des bactéries lactiques et le groupe des *Bacillus*.

Parmi les bactéries lactiques on a les Lactobacilles (Souches S3, S4, Y6 et Lf1) et les Lactocoques (souches S2, S5, Y1, Y3 et Y5). Les alignements multiples des séquences nucléotidiques partielles du gène 16S rRNA des Lactobacilles obtenues par séquençage à travers BLASTn de la base de données NCBI ont permis d'identifier les souches S3, S4, Y6 et Lf1 comme étant respectivement *Lactobacillus* sp. strain S3, *Lactobacillus* sp. strain S4, *Lactobacillus* sp. strain Y6 et *Lactobacillus plantarum* strain Lf1. Le pH optimal de croissance pour les souches de bactéries lactiques varie de pH 5,5 à pH 7 et leur température optimale de croissance de 30 à 40°C. Le taux maximal de croissance varie de 0,072 à 0,259 h⁻¹.

Les 13 souches bactériennes du genre *Bacillus* sont identifiées comme étant des *B. cereus* (souches Bik1, Bik2, Bik3, Bik5, Bik6, Bik7, Lf2, Lf3, Lf4 et Lf5) et *B. subtilis* (Souches Bik4, Bik8 et Lf6).

Les substances antibactériennes produites par les vingt deux souches bactériennes présentent un degré de spécificité élevé et possèdent un spectre d'action élargie car agissent sur *Micrococcus luteus* LMG 3293, une bactérie pas proche phylogénétiquement des bactéries lactiques et des *Bacillus*. Le gène *pln* codant pour les plantaricines chez les quatre souches de Lactobacilles est un gène mosaïque car composé de plusieurs opérons qui sont opéron *plnABCD* ; opéron *plnEFI* ; opéron *plnGHSTUVW*, opéron *plnJKLR* et opéron *plnMNOP*. Les bactériocines produites potentiellement par les 4 souches de *Lactobacillus* sont la plantaricine E, la plantaricine F, la plantaricine J, la plantaricine K, la protéine d'immunité et les protéines régulatrices comme plantaricine A ou IP, la protéine Histidine kinase (HKP) et la protéine régulatrices de réponse (RR). Les gènes de molécules bioactives sont indispensables à l'expression de l'activité antimicrobienne de la souche bactérienne. La recherche de ces gènes des molécules bioactives a été possible grâce aux outils bio-informatiques et moléculaires.

A la lumière des résultats obtenus les souches de *Lactobacillus* peuvent être proposées aux différentes unités de production d'aliments fermentés pour une utilisation éventuelle.

Mots clés : *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, Bactériocines, *Bikalga*, Burkina Faso, Gène *pln*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus* sp., *Micrococcus luteus* LMG 3293, Molécules bioactives, PCR, Plantaricine, Séquençage, *Soumbala*.

ABSTRACT

Bacteriocins could be use as new bioactives molecules acting as antibiotics. The aim of this study was to investigate for bacteriocins producing bacteria and types of bacteriocins they can produce. Twenty-two bacterial strains were isolated from Burkinabe local fermented foods (*Soumbala*, fermented milk, indigenous yoghurt and *Bikalga*) and were characterized by microbiological, PCR, sequencing and bioinformatics tools. The *pln* gene was habor amount *Lactobacillus* strains. This research was conducted online using NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) and BAGEL3 (<http://bagel.molgenrug.nl/index.php/bagel3>) tools.

Nine lactic acid bacteria and thirteen strains belonging to *Bacillus* sp. were obtained.

Lactic acid bacteria are divided into two sub-groups: Lactobacilli (strains S3, S4, Y6 and Lf1) and Lactococci (strains S2, S5, Y1, Y3 and Y5). The multiple alignments through NCBI of 16S rRNA gene, partial sequences of lactobacilli were performed online through NCBI and identified strains S3, S4, Y6 and Lf1 as respectively *Lactobacillus* sp. strain S3, *Lactobacillus* sp. strain S4, *Lactobacillus* sp. strain Y6 and *Lactobacillus plantarum* strain Lf1. The optimum growth pH and temperature ranges respectively from pH 5.5 to pH 7, and between 30 to 40°C for all the lactic acid bacteria. The maximum growth rate ranges from 0.072 to 0.259 h⁻¹

The 13 bacterial strains belonging to *Bacillus* sp. were identified as *B.cereus* (strains Bik1, Bik2, Bik3, Bik5, Bik6, Bik7, Lf2, Lf3, Lf4 and Lf5) and *B. subtilis* (strain Bik4, Bik8 and Lf6).

Genes of bioactive molecules are essential for the expression of the antimicrobial activity of the bacterial strain. The *pln* gene coding for plantaricins is a mosaic gene. Several operons were found amount *Lactobacillus* strains: *plnABCD* operon; *plnEFI* operon; *plnGHSTUVW* operon, *plnMNOP* operon and *plnJKLR* operon. The *pln* gene contains more than twenty genes. The four *Lactobacillus* strains could produce as bacteriocins: plantaricin E, plantaricin F, plantaricin J, plantaricin K, the immunity protein and regulatory proteins such as plantaricin A or IP, histidine protein kinase (HKP) and the response regulator (RR).

The antibacterial substances produced by the twenty two strains (plantaricins from the four *Lactobacillus* strains and BLIS from other strains) showed high degree specificity and have a wider spectrum mode of action because they target *Micrococcus luteus* LMG 3293, which is not closely to lactic acid bacteria and *Bacillus* species.

The four *Lactobacillus* strains could be proposed for use to indigenous fermented food producers.

Keywords: *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, bacteriocins, *Bikalga*, Burkina Faso, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus* sp., *Micrococcus luteus* LMG 3293, Bioactive Molecules, PCR, plantaricin., *pln* gene, Sequencing, *Soumbala*.

PUBLICATIONS ISSUES DE LA THÈSE

1. Articles publiés

Taale E., Savadogo A., Zongo C., Tapsoba F., Karou D. S. et Traoré S. A. (2015). Revue sur les peptides antimicrobiens d'origine microbienne : Cas des bactériocines. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, x(x): xx-xx, xxxx

Taale E., Savadogo A., Zongo C., Somda M. K., Sereme S. S., Karou S. D., Soulama I. and Traore A. S., (2015). Characterization of *Bacillus* species producing Bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) isolated from fermented food in Burkina Faso. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, 2(4): 279-290.

Taale E., Savadogo A., Zongo C., Ilboudo A. J. and Traore A. S. (2013). Bioactive molecules from bacteria strains: case of bacteriocins producing bacteria isolated from foods. *Current Research in Microbiology and Biotechnology*, 1(3): 80-88.

2. Articles soumis

Taale E., Savadogo A., Sina A.O., Zongo C., Karou S. D., Baba-Moussa L.S. and Traore A. S. (2015). Searching for bacteriocin *pln* loci from *Lactobacillus* spp. isolated from fermented food in Burkina Faso by molecular methods. Article soumis dans *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*.

3. Communications affichées

Taale E., Savadogo A., Zongo C., Savadogo A., Tapsoba F., Karou D. S. et Traoré S. A. (2013). Influence du pH et de la température sur la croissance de souches lactiques productrices de bactériocines. *Poster présenté à la 5^{ème} édition des Journées Portes Ouvertes et Scientifiques de l'université de Ouagadougou (Burkina Faso) du 25 au 30 Novembre 2013.*

Taale E., Savadogo A., Zongo C. et Traoré S. A. (2012). Recherche de gènes à partir de souches bactériennes productrices de bactériocines. *Poster présenté au Colloque régional sur les biotechnologies tenu du 6 – 9 Novembre 2012 à Ouagadougou (Burkina Faso).*

4. Communication orale

Taale E., Savadogo A., Zongo C., Karou D. S. et Traoré S. A. (2014). Isolement et caractérisation de souches lactiques productrices de bactériocines. *Communication orale présentée au Colloque Scientifique International de l'Université de Kara (Togo) du 12 au 16 Mai 2014.*

INTRODUCTION

Dans leur compétitivité, les organismes vivants ont développés divers moyens afin d'assurer leur survie en synthétisant des substances naturelles bioactives telles que :

- les défensines chez les Mammifères ;
- les magainines et les dermaseptiques chez les Amphibiens ;
- les cecropines et les cératoxines chez les Insectes,
- et les bactériocines, les antibiotiques, les peptides NRPS (Non Ribosomal Peptides Synthetase) chez les Microorganismes (Morisset, 2003).

Ces dernières années, les chercheurs se sont intéressés à ces molécules bioactives notamment aux bactériocines produites par les bactéries comme les bactéries lactiques car elles pourraient être utilisées par les industries agroalimentaires comme agent conservateur biologique afin de pouvoir réduire l'utilisation des agents conservateurs chimiques, qui se révèlent de plus en plus nocifs pour la santé animale et humaine (Makhloufi, 2011). De plus, les bactériocines ne peuvent-elles pas être utilisées en lieu et place des antibiotiques, contre lesquels l'apparition des souches multirésistantes constituent ces dernières décennies un sérieux problème de santé publique? Les bactériocines ne sont pas toxiques pour les cellules eucaryotes et perdent leur activité dans le tractus gastro-intestinal en présence des protéases ; ces deux propriétés permettent de les classer dans la catégorie des substances sans danger pour l'Homme (Makhloufi, 2011). Les bactériocines peuvent aussi inhiber plusieurs pathogènes.

Les bactériocines produites par les bactéries sont de petits peptides, thermostables qu'elles utilisent dans le cadre de la compétition contre d'autres bactéries de la même espèce (spectre étroit) ou contre des bactéries d'autres genres (large spectre) (Cotter *et al.*, 2005b). De plus, les bactériocines représentent une large classe de substances antagonistes qui varient considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leurs spectres d'action et de leurs modes d'action (Klaenhammer, 1988). Une ou plusieurs bactériocines ont été identifiées chez plusieurs espèces de bactéries et d'archaebactéries (Cotter *et al.*, 2005b; Willey et van Der Donk, 2007).

Les bactéries productrices de bactériocines peuvent être des bactéries à Gram positives et des bactéries à Gram négatives. Ces différentes bactéries peuvent être isolées à partir de plusieurs niches écologiques.

Au Burkina Faso, plusieurs études ont montré que le *Soumbala* et le *Bikalga*, deux condiments obtenus respectivement par fermentation alcaline à partir des graines de *nééré* (*Parkia biblogosa*) et des graines d'*Hibiscus sabdariffa* occupent une part importante dans la ration journalière. Ils sont fabriqués de manière artisanale. Leur qualité hygiénique laisse à désirer car pourraient être source de microorganismes indésirables et/ou pathogènes (comme *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*,

Salmonella sp.). Dans ce sens plusieurs études ont été entreprises pour caractériser la flore microbienne de ces différents aliments afin de mieux comprendre et maîtriser les microorganismes utiles et les microorganismes nuisibles (Ouoba *et al.*, 2004, 2007, 2008, 2010; Parkouda *et al.*, 2009; Savadogo *et al.*, 2011; Compaoré *et al.*, 2013a,b).

Les recherches de molécules bioactives ont été menées chez ces souches. Ces travaux ont surtout porté sur les molécules bioactives de types peptides NRPS (Non Ribosomal Peptide Synthetase) comme surfactines, plipastatines, mycosubtilines, fengycines, etc. (Savadogo *et al.*, 2011; Compaoré *et al.*, 2013a). Donc au Burkina Faso, très peu d'informations sont disponibles sur les molécules bioactives de type bactériocines produites par les bactéries isolées de divers aliments burkinabè fermentés ou non. C'est fort de ce constat que l'objectif général de cette thèse est de «Caractériser les souches de bactéries productrices de bactériocines isolées du *Soumbala*, du *Bikalga* et de certains yaourts consommés au Burkina Faso au plan morphologique, biochimique et moléculaire » afin d'apporter de nouvelles données sur les bactériocines et les bactéries qui les produisent.

Objectifs spécifiques :

- Isoler des souches bactériocinogènes (souches de bactéries lactiques et souches du genre *Bacillus*) ;
- Tester leur pouvoir inhibiteur sur *Micrococcus luteus* LMG 3293 ;
- Caractériser les souches performantes par les tests biochimiques et microbiologiques ;
- Déterminer le pH optimal et la température optimale de croissance des souches lactiques ;
- Identifier les deux groupes de bactéries (Bactéries lactiques et *Bacillus*) par les techniques moléculaires ;
- Faire un screening des différents gènes du locus *pln* codant pour les plantaricines à partir des séquences nucléotidiques partielles en utilisant les outils de bio-informatiques

Ce document de thèse est subdivisé en trois chapitres. Le premier chapitre fait un état de connaissances sur les bactériocines et les organismes producteurs. Le deuxième chapitre expose les différentes démarches suivies en vue d'atteindre les objectifs assignés. Enfin, dans le troisième chapitre, se trouvent les différents résultats trouvés et leur interprétation possible.

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. MOLÉCULES BIOACTIVES

Les molécules bioactives sont des substances antibactériennes naturelles d'origine biologique élaborées par les bactéries. Ces molécules bioactives sont variées et diversifiées car on distingue les bactériocines, les peptides NRPS (Non Ribosomal Peptides Synthetase), les antibiotiques et autres. Les molécules bioactives diffèrent les unes des autres sur leur mode de synthèse et leur spectre d'activité. Ainsi, les bactériocines sont produites par voies ribosomales ou plasmidiques, les peptides NRPS sont codés par des gènes non ribosomiaux tandis que les antibiotiques sont obtenus par actions enzymatiques.

1.1. Bactériocines

1.1.1. Généralités

La découverte des bactériocines remonte au début du 20^{ème} siècle lorsque Gratia (1925) démontra l'existence d'une substance inhibitrice, thermostable, provenant d'un dialysat d'un milieu de culture d'*Escherichia coli* V (Gratia, 1925; Morisset, 2003). Cette substance nommée colicine V inhibe la croissance d'une autre souche d'*Escherichia coli*. Les bactériocines représentent une large classe de substances antagonistes qui varient considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leurs spectres d'action et de leurs modes d'action (Klaenhammer, 1988).

Une bactériocine est généralement un composé protéique de 20 à 60 acides aminés. Les bactériocines ne sont pas des antibiotiques mais elles possèdent des propriétés antibiotiques car elles peuvent être :

- bactéricides, c'est-à-dire éliminer certaines bactéries
- et bactériostatiques, c'est-à-dire inhiber ou bloquer la croissance de certains micro-organismes.

Les bactériocines se différencient des antibiotiques par :

- une synthèse par voie ribosomale contrairement à la synthèse enzymatique des antibiotiques,
- une activité à des concentrations bien plus faibles que celles des antibiotiques,
- et un spectre d'activité généralement plus restreint que celui des antibiotiques (Nes, 2011).

1.1.2. Définitions

Les bactériocines sont des substances naturelles douées d'activités antimicrobiennes, produites par les bactéries Gram positives, Gram négatives et les archées. Différentes définitions des bactériocines ont été données au cours du temps (Dortu et Thonart, 2009). Cependant, la définition qui reste la plus largement acceptée est celle de Kaenhammer qui définit *les bactériocines comme des protéines, ou complexes de protéines, possédant une activité bactéricide dirigée contre des espèces proches de la souche productrice* (Klaenhammer, 1988). Autres définitions :

- ⇒ Les bactériocines sont des fractions protéiques biologiquement actives ayant un mode d'action bactéricide (Tagg *et al.*, 1976).
- ⇒ Les bactériocines sont des composés peptidiques antimicrobiens constituant un sous-groupe de peptides antimicrobiens de synthèse ribosomique (De Vuyst et Vandamme, 1994).
- ⇒ Les bactériocines constituent un groupe hétérogène de protéines antibactériennes dont varient le spectre d'activité, le mode d'action, le poids moléculaire, l'origine génétique et les propriétés biochimiques (Abee, 1995).
- ⇒ Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens ribosomiques d'origine chromosomique ou plasmidique de poids moléculaire faible (2- 6 KDa) et amphipatique produite par les bactéries à Gram positives et les bactéries à Gram négatives (Riley et Wertz, 2002a, b).
- ⇒ Les bactériocines sont définies comme des molécules sécrétées par les bactéries, de nature protéique ou partiellement protéique et douées d'une activité antagoniste vis-à-vis des souches phylogénétiquement proches des souches productrices (Morisset, 2003).
- ⇒ Les bactériocines constituent un groupe hétérogène de protéines utilisées contre les bactéries indésirables (Chen et Hoover, 2003).
- ⇒ Les bactériocines produites par les bactéries sont de petits peptides thermostables, qu'elles utilisent dans le cadre de la compétition contre d'autres bactéries de la même espèce (spectre étroit) ou contre des bactéries d'autres genres (large spectre) (Cotter *et al.*, 2005a, b).
- ⇒ Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens le plus souvent cationiques, modifiés ou non post-traductionnellement de masse moléculaire comprise entre 2 et 6KDa (Heng *et al.*, 2007).
- ⇒ Les bactériocines sont des peptides extracellulaires bioactifs de synthèse ribosomique doués d'activité bactéricide ou bactériostatique sur les bactéries (Molloy *et al.*, 2011).
- ⇒ Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens, subissant des modifications post-traductionnelles ou non, qui sont synthétisés par des bactéries possédant un système les immunisant contre leur propre production (Rea *et al.*, 2011).

Cette multitude de définition montre la complexité à définir les bactériocines. Cependant on peut dire que les *bactériocines constituent une catégorie de molécules bioactives produites par voie ribosomique ou plasmidique par les bactéries en vue de leur survie.*

1.1.3. Classification des bactériocines

Selon Makhloufi (2011), l'élucidation ces dernières années de la structure, du mode d'export et du mécanisme d'action des différentes bactériocines a rendu leur classification assez difficile. C'est pourquoi plusieurs classifications ont été proposées par divers auteurs :

Klaenhammer a proposé de classer les bactériocines en quatre principales classes en se basant sur leurs structures primaires et tridimensionnelles et sur leurs modes d'action (Klaenhammer, 1993; Makhloufi, 2011). La classe I regroupant les bactériocines modifiées post-traductionnellement appelées lantibiotiques, la classe II renfermant les bactériocines non modifiées et thermo-résistantes appelées « pediocin-like », la classe III renferme les bactériolysines qui sont des protéines thermosensibles pourvues d'activité enzymatique. Une quatrième classe dans laquelle se trouvent les bactériocines complexes. Les classes I et II sont subdivisées en sous-classes (Figure 1).

Les bactériocines appartenant à la classe IV dans la classification de Klaenhammer (1993) n'étant pas clairement caractérisées, Diep et Nes ont proposé en 2002 la classification de Klaenhammer sans la classe IV. Par la suite, Nes *et al.* (2007) ont proposé une nouvelle classification dans laquelle la classe IV regroupe les bactériocines circulaires et non complexes ; par contre Heng *et al.* (2007) ont suggéré soit le maintien de la classe III soit son abandon dans la classification.

Une nouvelle classification des bactériocines proposée par Cotter *et al.* (2005b) regroupe les bactériocines en trois classes : les lantibiotiques, les non-lantibiotiques et les bactériolysines. En effet, Cotter et Collaborateurs ont subdivisé les lantibiotiques en pediocin-like, twopeptides, bactériocines circulaires et des bactériocines non modifiées et non « pediocin-like ». Ils ne prennent pas en compte les peptides de haut poids moléculaires thermolabiles car selon eux ils seraient plutôt considérés comme enzymes à cause de leur potentielle activité enzymatique (Figure 1).

De toutes les classifications des bactériocines proposées, les classes I et II sont communément admises. Cependant selon certains auteurs les bactériocines circulaires constituent soit la classe IV (Heng *et al.*, 2007), soit la classe IIc (Cotter *et al.*, 2005b; Nissen-Meyer *et al.*, 2009).

Une nouvelle classification des bactériocines proposée par Heng et Tagg en (2006) est considérée comme universelle car elle prend en compte les bactériocines produites par les bactéries à Gram positives et les bactéries à Gram négatives. Cette classification divise les bactériocines en quatre classes avec des sous-groupes (Figure 1). On distingue la classe des lantibiotiques, la classe des peptides non-modifiés, la classe des protéines de haut poids moléculaire et la classe des peptides cycliques.

Enfin, Zouhir *et al.* (2010) ont proposé de classer les bactériocines en douze classes en utilisant comme seul repère leur structure primaire.

La figure 1 a été proposée en se référant aux travaux de Klaenhammer (1993), de Cotter *et al.* (2005b) et de Heng et Tagg (2006).

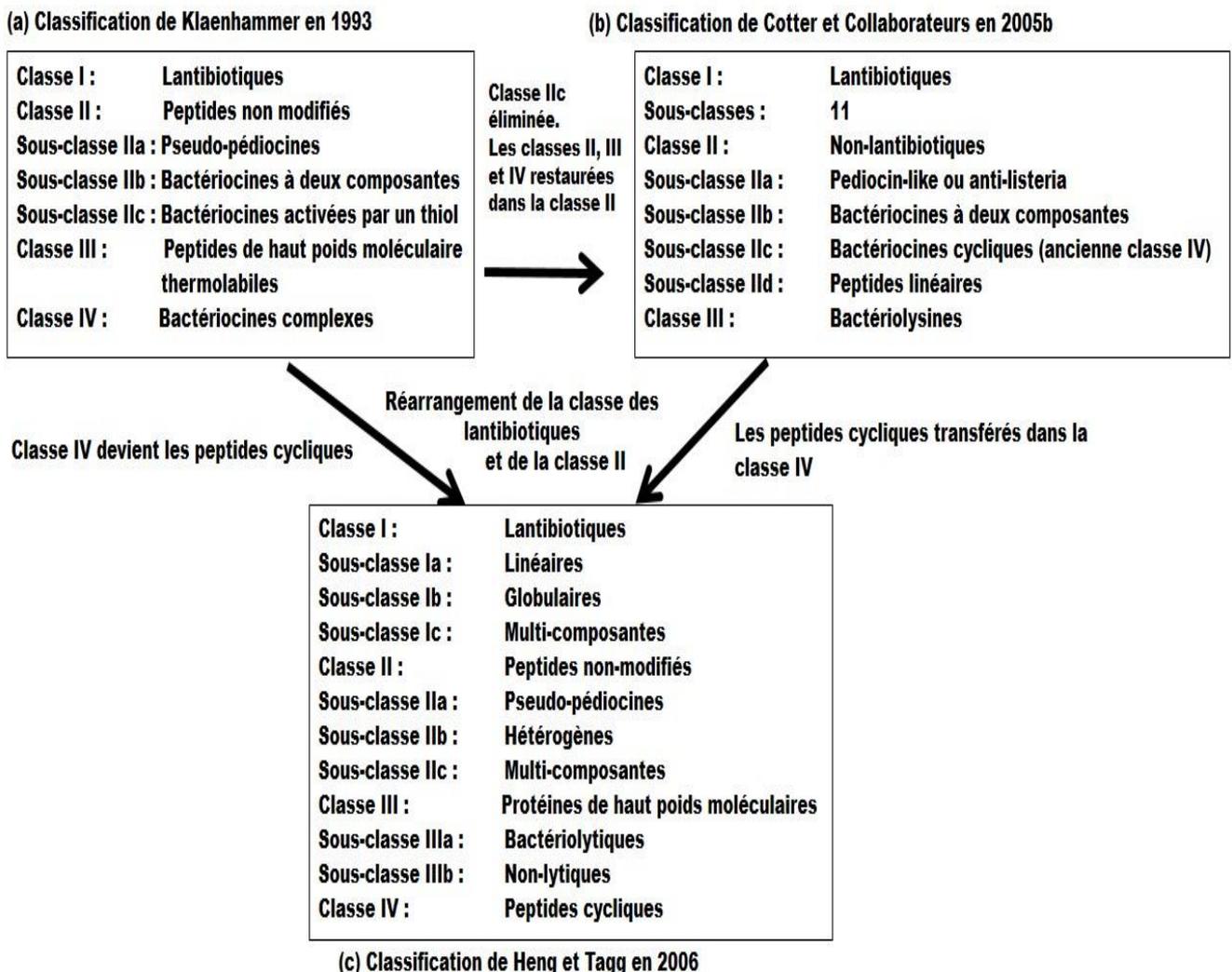


Figure 1: Classification universelle des bactériocines

- (a) Classification proposée par Klaenhammer (1993),
 (b) Classification proposée par Cotter *et al.* (2005b),
 (c) Classification proposée par Heng et Tagg (2006) .

1.1.4. Différents types de bactériocines

On distingue les lantibiotiques, les peptides ne subissant pas de modifications post-traductionnelles, les bactériolysines, les peptides complexes, les microcines, les colicines et les archéocines. Chaque groupe de bactériocines est subdivisé en sous-groupe ou sous-classe. Le tableau I présente quelques bactériocines et leur classe d'appartenance.

Tableau I : Quelques exemples de bactériocines avec leur classe d'appartenance

Classe	Sous-classe	Propriétés	Exemples
I-Lantibiotiques ou peptides modifiés		Modifiés, thermostables, 21-38 acides aminés, poids moléculaires <15kDa	Nisine, Lacticine 481, Plantaricine C
	Ia-Linéaires	Cationique, forment des pores	Mersacidine
	Ib-Globulaires	Inhibent les enzymes, non cationique	Lct3147, Plantaricine W
	Ic-Multicomposantes	Deux peptides	
II-Peptides non-modifiés		Thermostable, 30-60 acides aminés, <15kDa	Pédiocine PA1/AcH, Entéroicine A, Sakacine A
	IIa-Pédiocine-like	Anti-listeria, YGNGV consensus	Entéroicine B, L50, Carnobacteriocine A
	IIb-Divers	Non pédiocine-like	Lactocine G, Plantaricine S, Lactacine F
	IIc-Multicomposantes	Deux peptides	
III-Protéines de poids moléculaire élevé		Thermolabile, >30kDa	Entérolysine A, Lcn972
	IIIa-Bactériolitique	Cible la membrane plasmique	Colicine E2-E9
	IIIb-Non lytique	Cible le cytosol	
IV-Peptides circulaires		Thermostable, liaison peptidique queue de la tête	AS-48, Grassercine A, Acidocine B

Source : Verma *et al.* (2014)

1.1.4.1. Bactériocines de classe I

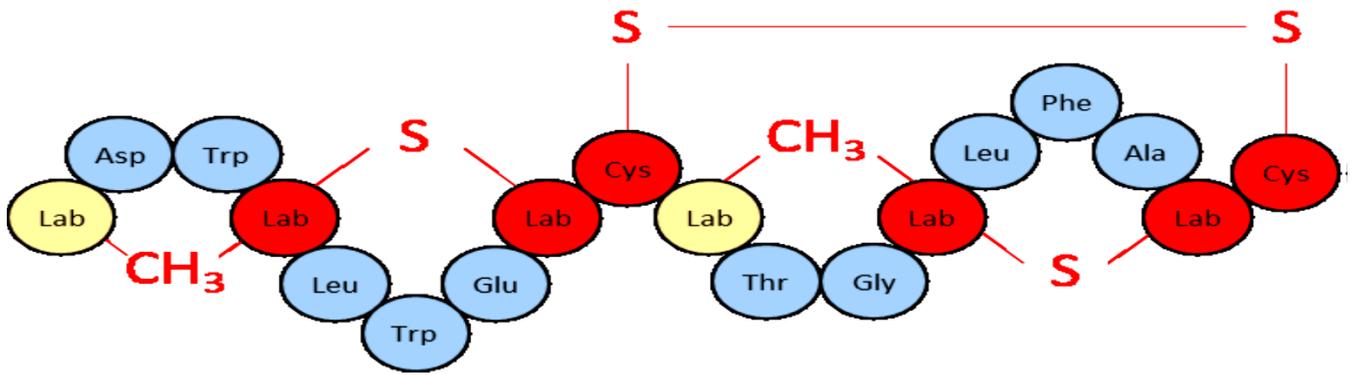
Cette classe regroupe tous les peptides antimicrobiens thermorésistants subissant des modifications post-traductionnelles et contenant certains acides aminés inhabituels. Elle se subdivise en 3 sous-classes (les lantibiotiques, les labyrinthopeptines et les sactibiotiques).

a) Lantibiotiques

Les lantibiotiques ou bactériocines de la sous-classe Ia sont de petits peptides (≤ 5 kDa ; de 19 à 28 acides aminés) subissant de nombreuses modifications post-traductionnelles et contenant de la lanthionine, de la β -méthyllanthionine, de la déhydroalanine et de la déhydrobutyrine (Cotter *et al.*, 2005a; Rea *et al.*, 2011). La nisine est le premier lantibiotique à avoir été décrit par Rogers et Whittier, (1928) et est la bactériocine la plus étudiée car elle est approuvée par plusieurs pays comme agent conservateur. De nos jours plus de 60 lantibiotiques ont été découverts (Bierbaum et Sahl, 2009).

b) Labyrinthopeptines

La sous-classe Ib contient les labyrinthopeptines renfermant un acide aminé inhabituel, la labionine et n'ont été découvertes que très récemment (Meindl *et al.*, 2010). Les labyrinthopeptines A1 et A2 produites par *Actinomadura namibiensis* sont les plus connues. De plus leur structure montre des ponts dissulfures et des ponts méthyles entre les labionines chez A2, ce qui leur permet d'avoir des actions inhibitrices à l'encontre de *Staphylococcus*, de *Streptococcus*, du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et du virus de l'herpès (HSV) (Fernandez, 2014). La séquence peptidique de labyrinthopeptine A2 est représentée par la figure 2. Chez la labyrinthopeptine A2, les ponts dissulfures se forment d'une part entre les acides aminés modifiés la labionine et d'autre part entre les cystéines. Sur la figure 2 les acides aminés impliqués dans la formation des ponts dissulfures sont colorés en rouge. Les acides aminés usuels sont en bleu et les molécules de labionine non impliquées dans la formation des ponts dissulfures mais reliées à une labionine par un groupe méthyle sont colorées en jaune.



Source : Fernandez (2014)

Figure 2 : Séquence en acides aminés du labyrinthopeptine A2 produit par *Actinomadura namibiensis*

c) Sactibiotiques

L'élucidation de la subtilolisine A est à l'origine de la création de cette sous-classe Ic ou la sous-classe des sactibiotiques. En effet, la subtilolisine A est un peptide cyclique produit par *Bacillus subtilis* subissant de nombreuses modifications post-traductionnelles et ne ressemblant en rien aux peptides cycliques traditionnels. Les sactibiotiques ont la caractéristique particulière de contenir un soufre lié au carbone α du peptide. On a aussi la thuricine CD produite par *Bacillus thuringiensis* (Rea *et al.*, 2011).

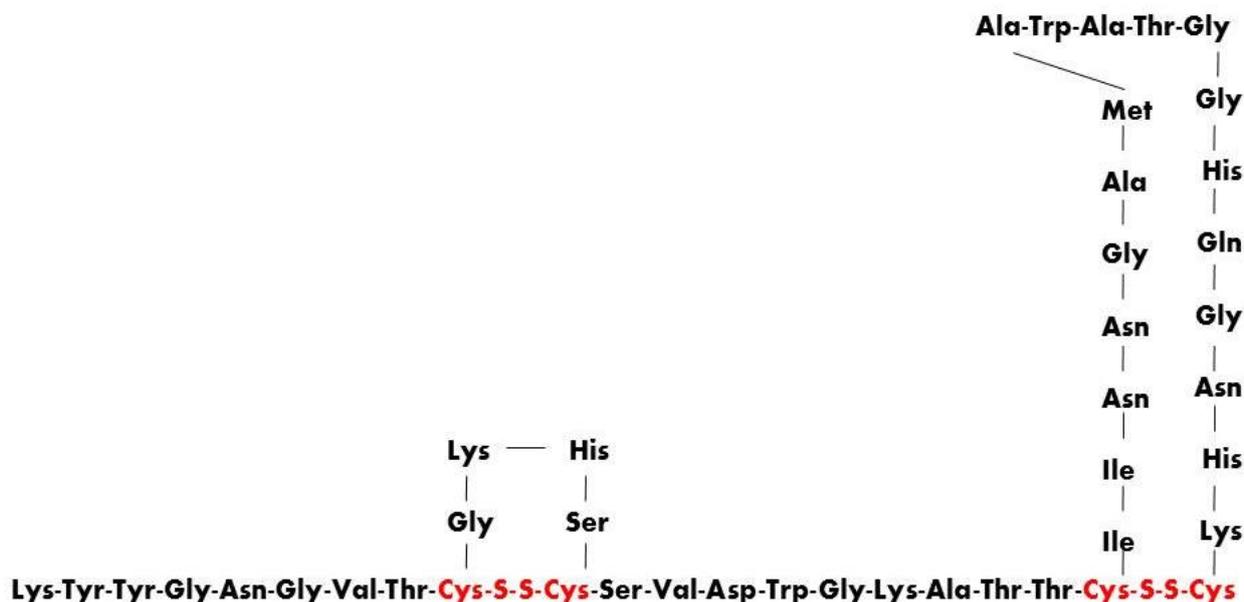
1.1.4.2. Bactériocines de la classe II

Les bactériocines de la classe II forment un groupe hétérogène de peptides de taille inférieure à 10 kDa, ne possèdent que les acides aminés standards et ne subissent pas de modifications post-traductionnelles (Fernandez, 2014). On distingue quatre sous-classes.

a) Bactériocines ressemblant à la pédiocine

Les bactériocines de la sous-classe IIa sont thermo et pH-résistantes. Elles possèdent un pont dissulfure indispensable à l'activité et un motif consensus YGNGVX₁CX₂K/NX₃X₄-C (X = n'importe quel acide aminé) à leur partie N-terminale. Leur partie C-terminale est variable et peut être aussi bien hydrophobe qu'hydrophile. Elles sont toutes actives contre les espèces de *Listeria* (Feng *et al.*, 2009). Exemples : Pédiocine PA-1, Mésentéricine Y105, Sakacine P, Piscicoline 126, Carnobactériocine Bm1, Entéroïcine A.

La figure 3 illustre la composition en acides aminés de la pédiocine PA-1 produite par *Pseudomonas acidilactici* en montrant les ponts dissulfures formés entre les molécules de cystéine.



Source : Figure proposée par Fernandez (2014) et modifiée par moi-même en supprimant la couleur bleue et les boules entourant chaque acide aminé.

Figure 3 : Séquence en acides aminés de la pédiocine PA-1 produite par *Pseudomonas acidilactici*

b) Bactériocines à deux composantes non-modifiées

Cette sous-classe IIb renferme les bactériocines à deux composantes non-modifiées c'est-à-dire deux peptides différents (Nissen-Meyer *et al.*, 2011). La lactococcine G fut la première bactériocine à deux composantes à être isolée en 1992 par Nissen-Meyer *et al.* (1992) et de nos jours on dénombre plus d'une dizaine de bactériocines à deux composantes dont les deux peptides sont indispensables pour exprimer une activité optimale c'est-à-dire que les deux peptides fonctionnent en synergie car chaque peptide pris individuellement a une activité faible voire nulle (Nissen-Meyer *et al.*, 2011). Ces peptides ont entre 30 et 50 acides aminés et sont synthétisés sous la forme d'un précurseur dont le peptide leader sera clivé au moment de l'exportation de la bactériocine. Ils sont cationiques, amphiphiles ou hydrophobes, et actifs au niveau des membranes bactériennes (Nissen-Meyer *et al.*, 2010).

Exemples : ABP-118 α et β , Lactocine 705 α et β , Lactococcine MN, Plantaricine EF.

d) Peptides linéaires non-modifiés ne ressemblant pas à la pédiocine

Les bactériocines de cette sous-classe IId sont des peptides linéaires non-modifiés ne ressemblant pas à la pédiocine pouvant être :

- (i) des bactériocines sec-dépendantes, car elles possèdent en N-terminal un peptide signal permettant de traverser la membrane cytoplasmique par la voie sec-dépendante (Iwatani *et al.*, 2011). La lactococcine 972 en est l'exemple ;
- (ii) des bactériocines sans peptide leader. Plusieurs travaux ont concernés la lacticine Q afin de pouvoir élucider l'action de ces types de bactériocines. Ces études ont montré que la lacticine Q est capable de détruire le potentiel membranaire sans avoir besoin d'un récepteur spécifique en formant des pores responsables des fuites des composés intercellulaires (Fujita *et al.*, 2007; Yoneyama *et al.*, 2009a, b) ;
- (iii) des bactériocines particulières car ce sont des bactériocines ne pouvant pas être classées ailleurs. La lactococcine A appartient à ce groupe de bactériocines linéaires incapables d'appartenir à une classe distincte des bactériocines (Iwatani *et al.*, 2011).

1.1.4.3. Bactériolysines

Les bactériolysines sont de grandes protéines, thermolabiles ayant une activité antimicrobienne. Leur mécanisme d'action est différent de celui des autres bactériocines car elles agissent en hydrolysant la paroi bactérienne des cellules sensibles. Il semblerait que la partie N-terminale montre des homologies avec les endopeptidases alors que la partie C-terminale sert de site de reconnaissance. Les bactéries productrices ne possèdent pas toujours d'immunité contre leur production (Cotter *et al.*, 2005b). Exemple : l'heveticine J de *Lactobacillus helveticus*, l'entérolysine A d'*Enterococcus faecalis* et la lysostaphine qui est la plus connue des bactériolysines non produites par des bactéries lactiques (Rea *et al.*, 2011).

1.1.4.4. Colicines

Elles sont produites par des souches d'*Escherichia coli* en conditions de stress et sont létales pour l'organisme producteur et toutes les cellules voisines reconnues par cette dernière (Rebuffat, 2011).

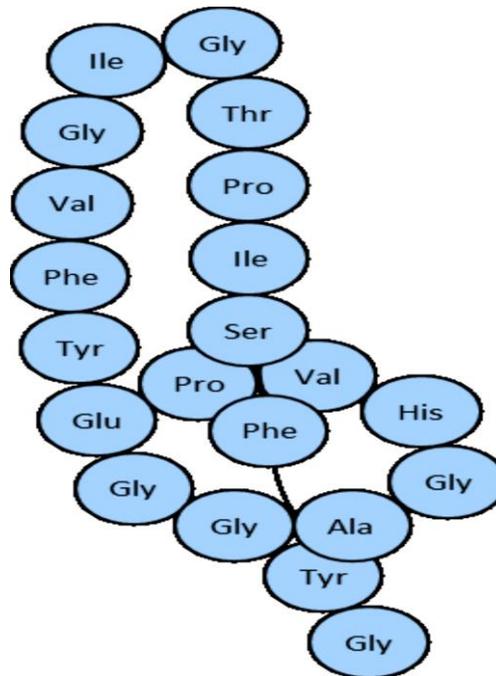
- ❖ **Les colicines du groupe A** sont codées par de petits plasmides et excrétés dans le milieu extérieur, et utilisent un récepteur relié au système membranaire Tol (Rebuffat, 2011). Exemples : Colicines E1 à E9, K, N, U et S4.

- ❖ **Les colicines du groupe B** sont codées par de grands plasmides et ne sont pas excrétées dans le milieu de culture (opposées aux colicines A) et utilisent un récepteur relié au système membranaire Ton. Exemples : colicines B, D, Ia, M, 5 et 10 (Rebuffat, 2011).

1.1.4.5. Microcines

Les microcines sont produites dans des conditions de stress nutritif (Duquesne *et al.*, 2007; Rebuffat, 2011). On peut distinguer :

- ❖ **Les microcines de classe I** qui sont des peptides subissant de nombreuses modifications post-traductionnelles conduisant soit à une cyclisation (Microcine B17), soit à une adénylation (Microcine C7/C51), soit à une structure en lasso (Microcine J25) (Duquesne *et al.*, 2007). La figure 5 montre la structure en lasso de la Microcine J25 proposée par Fernandez (2014).



Source : Fernandez (2014)

Figure 5 : Séquence en acides aminés de la microcine J25 produite par la souche d'*Escherichia coli* montrant sa structure en lasso

- ❖ **Les microcines de classe II** sont produites par les *Enterobacteriaceae* et actifs contre ces derniers (Duquesne *et al.*, 2007). On a les microcines de la classe IIa caractérisées par l'absence de modification post-traductionnelle (exemple : microcines V, L et 24) et les microcines de la classe IIb qui sont des polypeptides linéaires transportant en C-terminal un sidérophore (hautement conservé utilisé dans la reconnaissance) ajouté après la traduction de la protéine (Fernandez, 2014).

1.1.4.6. Archéocines

Les Archées produisent des bactériocines nommées archaéocines. Les halocines produites par les halobactéries (*Halobacteria*) sont les seules bactériocines reconnues jusqu'à présent. La halocine S8 est la première archaéocine caractérisée. Elle contient 36 acides aminés et est codée par un méga-plasmide et est extrêmement résistante au sel, à des températures extrêmes et aux solvants organiques pendant de longue durée. La concentration des halocines produites augmente au cours de la transition de la phase exponentielle vers la phase stationnaire. La stabilité des halocines peut expliquer la faible diversité des espèces dans les environnements hypersalés fréquentés par les halobactéries (Verma *et al.*, 2014). On distingue aussi les sulfolobocines produites par *Sulfolobus*, un genre appartenant aux archées (Charlesworth et Burns, 2015).

1.1.5. Mode et mécanisme d'action des bactériocines

1.1.5.1. Mode d'action des bactériocines

a) Généralités

Le mode d'action des bactériocines sur une bactérie cible se fait par adsorption sur la surface cellulaire suivie d'un effet létal. Le mode d'action peut se faire par : (i) un effet bactériostatique ; (ii) un effet bactéricide au cours duquel les bactéries meurent tout en gardant leur intégrité physique car il n'y a pas eu de lyse cellulaire et (iii) un effet bactériolytique conduisant à une dissolution de la cellule bactérienne. L'état physiologique de la bactérie productrice et les conditions expérimentales (concentration et pureté de la bactériocine, concentration de la cellule cible et milieu de culture) peuvent influencer l'activité des bactériocines (Jasniewski, 2008). Enfin, la combinaison de plusieurs bactériocines permet d'augmenter leur activité et leur spectre d'action (Limonet *et al.*, 2004; Dortu et Thonart, 2009). Le mode d'action diffère d'un groupe à un autre.

b) Mode d'action des lantibiotiques

Les lantibiotiques agissent en se liant à un récepteur transmembranaire (récepteur lipide II dans la plupart des cas) de la cellule cible entraînant la formation de pores ; ce qui induit la perte du potentiel électrique et du gradient pH transmembranaire (Wiedemann *et al.*, 2006; Kuipers *et al.*, 2011). Le tableau II qui donne le spectre d'action de quelques lantibiotiques a été réalisé en utilisant BACTIBASE, une base de données dédiée aux bactériocines.

Tableau II: Spectre d'action des Lantibiotiques

Bactériocine	Organisme producteur	Active contre	Référence
Classe Ia ou les lantibiotiques			
Nisine Q	<i>Lactococcus lactis</i>	Les bactéries Gram positives comme les bactéries lactiques, <i>Bacillus</i> sp., <i>Listeria</i> , <i>Micrococcus</i> sp.	(Yoneyama <i>et al.</i> , 2008)
Nisine F	<i>Lactococcus lactis</i> F10	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus carnosus</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus reuteri</i>	(De Kwaadsteniet <i>et al.</i> , 2008)
Nisine U	<i>Lactococcus uberis</i> ATCC 27958	<i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Streptococcus uberis</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Streptococcus dysgalactiae</i> , <i>Staphylococcus simulans</i> , <i>Staphylococcus cohnii</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Streptococcus mitis</i> ,	(Wirawan <i>et al.</i> , 2006)
Lacticine 3147 A1 & A2	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	<i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Clostridium difficile</i>	(Rea <i>et al.</i> , 2011)
Classe Ib : Les labyrinthopeptines			
Labyrinthopeptines (A1 et A2)	<i>Actinomadura namibiensis</i>	<i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , virus de l'herpès simple 1	(Fernandez, 2014)
Classe Ic : Les sactibiotiques			
Subtilosine A	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>E. faecalis</i> OGX-1, <i>L. monocytogenes</i> ATCC19115, <i>P. gingivalis</i> ATCC33277, <i>K. rhizophila</i> ATCC9341, <i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC13408, <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC19615, <i>Shigella sonnei</i> ATCC25931, <i>Escherichia coli</i> ATCC8739, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC9027, <i>S. gordonii</i> Challis ATCC49818 et <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538.	(Rea <i>et al.</i> , 2011)
Thuricine CD	<i>Bacillus thuringiensis</i> 6431	<i>Clostridium difficile</i> .	(Rea <i>et al.</i> , 2011)

Source : BACTIBASE (<http://bactibase.pfba-lab-tun.org/bacteriocinslist.php?RecPerPage=ALL>)

c) Mode d'action des bactériocines de classe II

Le mode d'action des bactériocines de la sous-classe IIa réside dans l'induction de la membrane par liaison au feuillet β de la cellule cible conduisant à la dissipation de la force proton motrice et à la fuite de l'ATP intracellulaire à cause de la formation de pores membranaires (Nissen-Meyer *et al.*, 2009; Kjos *et al.*, 2010).

Les bactériocines de la sous-classe IIb agissent par perméabilisation de la membrane de la cellule cible provoquant ainsi la fuite des composés intracellulaires tels que les ions monovalents (cas des plantaricines E/F et J/K), des cations monovalents (cas de la Lactococcine G) par formation de pores (Nissen-Meyer *et al.*, 2011).

Quant aux bactériocines de la sous-classe IIc, elles induisent la perméabilisation des membranes bactériennes et détruisent la force proton-motrice. Leur cyclisation permet leur stabilisation et est nécessaire à l'expression de leur activité biologique (Nissen-Meyer *et al.*, 2009).

Toutes ces observations citées ci-dessus permettent aux bactériocines de la classe II d'exprimer leur activité antibactérienne sur une large gamme de bactéries aussi bien pathogènes et ou altérants que les bactéries utiles. C'est pourquoi le tableau III a été réalisé afin de montrer cette diversité de l'activité antibactérienne des bactériocines de classe II.

Tableau III : Spectre d'action des bactériocines de classe II

Bactériocine	Producteur	Active contre	Référence
Classe IIa : Pediocin-like et anti-<i>Listeria</i>			
Pédiocine PA1	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Pediococci, Lactobacilli, Leuconostoc, Brochothrix, thermosphacta propionibacteria, Bacilli, Enterococci, Staphylococci, Listeria, Clostridia</i>	(Motlagh <i>et al.</i> , 1994)
Carnobactériocine B2	<i>Carnobacterium piscicola</i>	<i>Listeria et Enterococcus</i>	(Wang <i>et al.</i> , 1999)
Mésentéricine Y105	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus, Listeria innocua, Listeria ivanovii</i>	(Fremaux <i>et al.</i> , 1995)
Sakacine P (Sakacine 674)	<i>Lactobacillus sakei</i>	<i>Lactobacilli, Carnobacteria, Enterococcus faecalis, Brochothrix, thermosphacta, Listeria monocytogenes, Li. innocua, Li.ivanovii</i>	(Hühne <i>et al.</i> , 1996)
Curvacine A	<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Lactobacilli, Listeria monocytogenes, Li.innocua, Li.ivanovii, Enterococcus faecalis, Carnobacterium sp., Brochothrix, thermosphacta</i>	(Haugen <i>et al.</i> , 2008)
Carnobacteriocine BM1	<i>Carnobacterium piscicola</i>	<i>Listeria, Enterococcus</i>	(Quadri <i>et al.</i> , 1994)
Entéroccine A	<i>Enterococcus faecium (Streptococcus faecium)</i>	<i>Enterococcus faecalis JCM 5803, Ent. faecalis OU510, Ent.faecium JCM 5804, Ent.faecium TUA 1344L, Ent.hirae ATCC 10541, Lactobacillus plantarum ATCC 14917, Lb. sakei ssp. sakei JCM 1157, Lactococcus lactis ssp. cremoris ATCC 19257, Bacillus coagulans JCM 2257, B. subtilis JCM 1465, Listeria innocua ATCC 33090, Pediococcus, Listeria monocytogenes</i>	(Hu <i>et al.</i> , 2010)
Lactococcine MMFII	<i>Lactococcus lactis subsp (Streptococcus lactis), lactis</i>	<i>Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Listeria monocytogenes, Listeria ivanovii</i>	(Ferchichi <i>et al.</i> , 2001a, b)

Source : BACTIBASE (<http://bactibase.pfba-lab-tun.org/bacteriocinslist.php?RecPerPage=ALL>)

Tableau III : Spectre d'action des bactériocines de classe II (suite)

Bactériocine	Producteur	Active contre	Référence
Classe IIb : Les bactériocines à deux composants non-modifiées			
Lactocine 705α et β	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Bactéries lactiques, <i>Listeria</i> , <i>Streptococci</i>	(Vignolo <i>et al.</i> , 1996)
Plantaricine EF	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Pediococcus pentosaceu</i> , <i>Ped. pentosaceus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. viridescens</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. acidilactici</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Carnobacterium piscicola</i> ,	(Maldonado <i>et al.</i> , 2004)
Plantaricine W$\alpha\beta$	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus spp.</i> , <i>Lb. lactis</i> , <i>Lb. pentosaceus</i> , <i>Oenococcus oeni</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Listeria innocua</i> , <i>Li. monocytogenes</i> , <i>Propionibacterium freudenreichii</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	(Holo <i>et al.</i> , 2001)
Classe IIc : Les bactériocines circulaires			
Carnobacteriocine-A (Piscicoline-61)	<i>Carnobacterium piscicola</i>	<i>Carnobacterium</i> , <i>Enterococcus Listeria</i> , <i>monocytogenes</i> , <i>Clostridium</i> , <i>perfringens</i>	(Worobo <i>et al.</i> , 1994)
Classe IId : Les peptides linéaires non-modifiés ne ressemblant pas à la pédiocine			
Lacticine Q	<i>Lactococcus lactis</i> QU5	<i>Bacillus cereus</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Ent. faecium</i> , <i>Ent. mundtii</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lb. alimentarius</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. coryniformis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Listeria innocua</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i>	(Yoneyama <i>et al.</i> , 2009a, b)
Lactococcine A	<i>Lactococcus lactis</i> subsp (<i>Streptococcus cremoris</i>) <i>cremoris</i>	<i>Lactococcus</i> sp.	(Diep <i>et al.</i> , 2007)

Source : BACTIBASE (<http://bactibase.pfba-lab-tun.org/bacteriocinslist.php?RecPerPage=ALL>)

d) Mode d'action des Microcines et des Colicines

Les Microcines de classe I exercent leur action en s'insérant dans le périplasme de la cellule cible en passant à travers la membrane externe par un système de transport actif représenté par le système Ton. Par contre les Microcines de classe II utilisent différents systèmes de transporteurs comme Fiu, FepA et Cir (Acuña *et al.*, 2011). Leur action finale est leur insertion dans le cytoplasme avant de conduire à la mort de la cellule cible. Voir aussi la figure 6 et le tableau IV.

Les Colicines se lient à un récepteur spécifique (récepteurs normalement utilisés dans l'absorption de nutriments tels que la vitamine B12) de la surface cellulaire en formant des pores avant d'exercer leur activité nucléase c'est-à-dire en hydrolysant l'ADN, le RNA ribosomal, le RNA de transfert et par dégradation du peptidoglycane (Rebuffat, 2011). Toutes ces actions conduisent à la mort cellulaire.

e) Mode d'action des archéocines

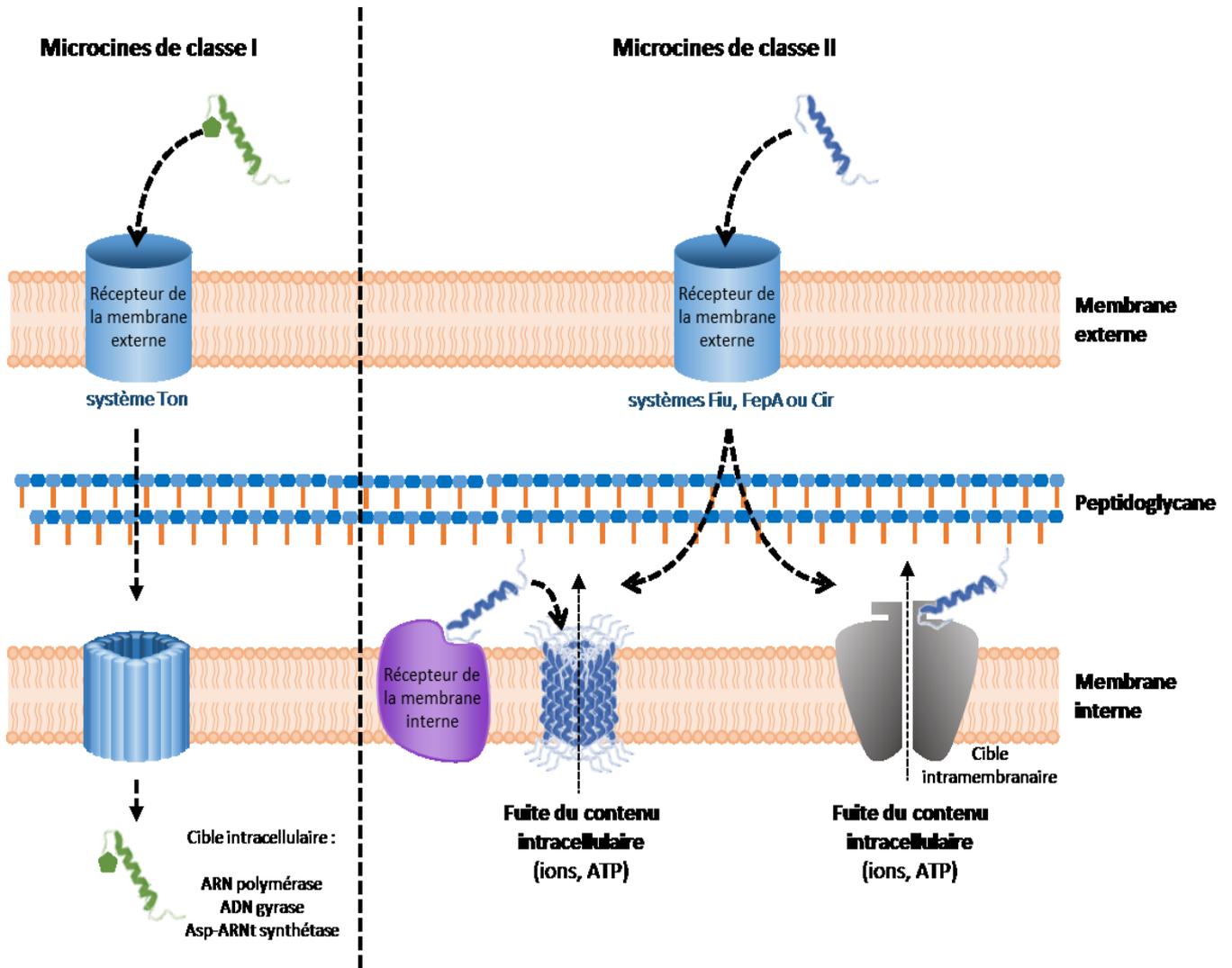
Le spectre d'action des archéocines est très étroit car elles inhibent les souches phylogénétiquement proches et jusqu'à présent leur action sur les bactéries n'est pas encore prouvée (Shand et Leyva, 2007; Charlesworth et Burns, 2015). Par contre les bactériocines produites par les bactéries sont actives sur les archées (O'connor et Shand, 2002; Charlesworth et Burns, 2015).

1.1.5.2. Mécanisme d'action générale des bactériocines

Le mécanisme d'action des bactériocines se décompose en trois étapes :

- la fixation du peptide sur la membrane de la cellule cible. Durant cette étape le peptide adopte sa conformation tridimensionnelle lui permettant d'exprimer son activité,
- l'insertion de la bactériocine dans la membrane cytoplasmique. Au cours de cette étape, plusieurs peptides antibactériens sont recrutés pour former un pore,
- la formation du pore conduit à des fuites de composés intracellulaires vitaux (Figures 6 et 7). Cette perte entraîne des effets néfastes pour la cellule cible, allant d'un simple ralentissement de la vitesse de croissance bactérienne à la mort cellulaire.

Les principaux mécanismes d'action des microcines produites par les bactéries à Gram négatives sont illustrés par la figure 6.



Source : Fernandez (2014)

Figure 6: Principaux mécanismes d'action des Microcines

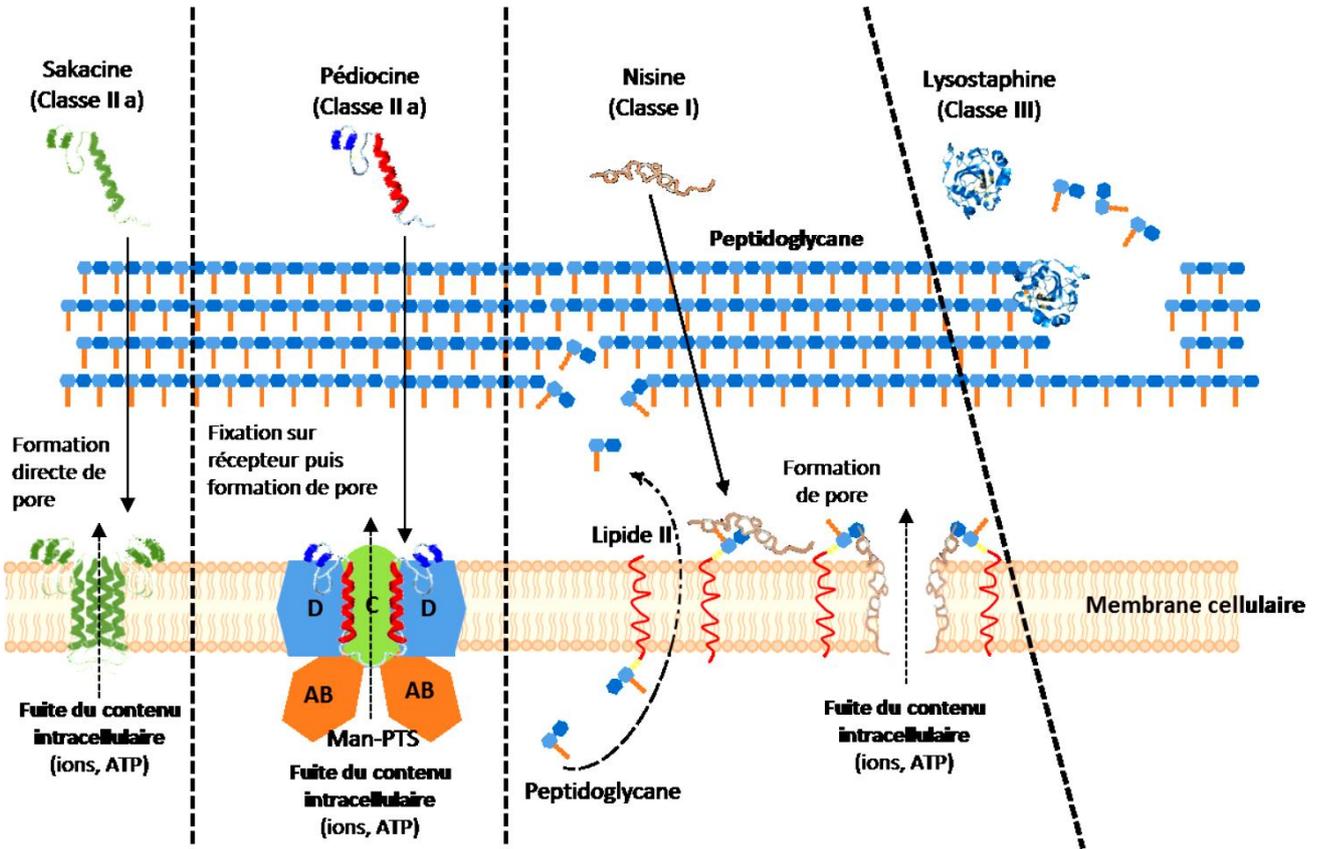
Tous ces principaux mécanismes d'actions leur permettent d'avoir un spectre d'action plus ou moins étroit comme le montre le tableau IV.

Tableau IV : Spectre d'action des Colicines et des Microcines

Bactériocine	Producteur	Active contre	Référence
Colicine E2	<i>Escherichia coli</i> K-12	<i>Escherichia coli</i>	(Trautner <i>et al.</i> , 2005)
Colicine E1 et N	<i>Escherichia coli</i> <i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Escherichia coli</i>	(Patton <i>et al.</i> , 2007)
Colicine-V (Microcine-V)	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>	(Otto <i>et al.</i> , 1998)
Microcine J25	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	(Wilson <i>et al.</i> , 2003)
Microcine H47	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	(Azpiroz <i>et al.</i> , 2001)
Microcine E492	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	(Thomas <i>et al.</i> , 2004)
Microcine C7	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Yersinia</i> , <i>Proteus</i> , <i>Escherichia coli</i>	(Severinov <i>et al.</i> , 2007; Kazakov <i>et al.</i> , 2008)
Colicine E1 à E3	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Escherichia coli</i> (DEC)	(Calcuttawala <i>et al.</i> , 2015)

Source : BACTIBASE (<http://bactibase.pfba-lab-tun.org/bacteriocinslist.php?RecPerPage=ALL>)

La figure 7 montre le mécanisme d'action de la Sakacine, la Pédiocine, la Nisine et la Lysostaphine qui sont des bactériocines produites par les bactéries à Gram positives.



Source : Fernandez (2014)

Figure 7: Schéma montrant les principaux mécanismes d'action des bactériocines produites par les bactéries à Gram positives

La sakacine, une bactériocine de classe IIa, agit directement au niveau de la membrane interne en formant un pore conduisant à la mort de la bactérie cible. La pédiocine PA-1, appartenant aussi à la classe IIa, se fixe sur l'unité D du mannose phospho-transférase (enzyme transmembranaire multimérique). Elle s'internalise et force le canal à rester ouvert, conduisant à la fuite du contenu intracellulaire et à la mort de la bactérie cible. La nisine, une bactériocine de classe I, se fixe sur le lipide II transmembranaire impliqué dans la synthèse du peptidoglycane. Elle s'insère et forme des pores tout en bloquant la fonction du lipide II. Enfin, la lysostaphine, une bactériocine de classe III agit directement au niveau du peptidoglycane (Figure 7) (Fernandez, 2014).

1.1.6. Organisation génétique et production des bactériocines

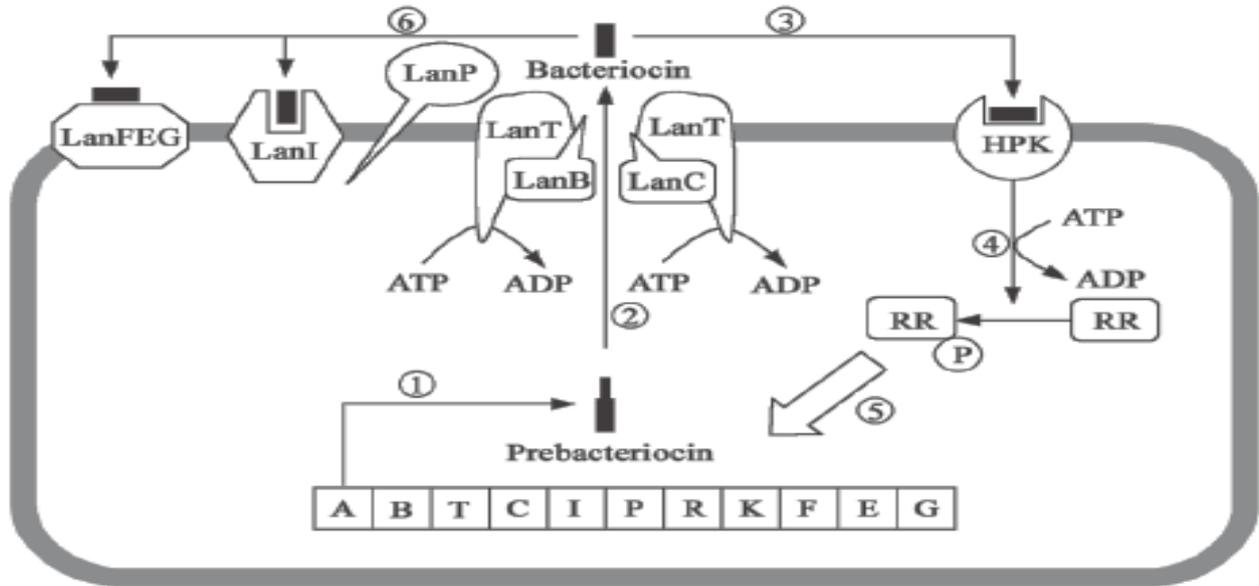
1.1.6.1. Généralités

Toutes les bactériocines sont produites par voie ribosomale dans le cytoplasme de la cellule productrice sous forme d'un précurseur inactif appelé prébactériocine ou préprobactériocine reconnu par le transporteur de type ABC (Transporteur ATP Binding Cassette) qui se clive pendant ou immédiatement après la sécrétion afin de permettre à la bactériocine d'être active (Chen et Hoover, 2003; Makhoulfi, 2011).

Les gènes impliqués dans la production des bactériocines sont généralement organisés sous forme d'opéron contenant des gènes de structure, des gènes d'immunité, des gènes nécessaires au transport et à l'exportation de la bactériocine synthétisée qui sont généralement retrouvés sur un autre locus et un gène codant pour le peptide leader ou prébactériocine (Jasniewski, 2008). 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 et Thonart, 2009). Les gènes des bactériocines peuvent être localisés sur les plasmides ou sur les chromosomes (Worobo *et al.*, 1994).

1.1.6.2. Organisation génétique des lantibiotiques

Les gènes impliqués dans la biosynthèse des lantibiotiques sont les gènes de structure, les gènes codant les enzymes indispensables à la translocation du peptide formé par départ du peptide leader, des gènes d'immunité pour protéger la cellule productrice contre sa propre synthèse et des gènes de régulation. Ces gènes peuvent être localisés sur un transposon (exemple : nisine), sur le chromosome (exemple : subtiline) ou sur un plasmide (exemple : épidermine) (Kuipers *et al.*, 2011). Chen et Hoover (2003) ont proposé un diagramme schématique illustrant le déroulement de la biosynthèse des lantibiotiques. Ce diagramme a été repris ici sans modifications et est représenté par la Figure 8.



Source : Chen et Hoover (2003)

Figure 8 : Diagramme schématique de la biosynthèse des lantibiotiques

- (1) Formation de la prébactériocine ;
- (2) La prébactériocine est modifiée par *LanB* et *LanC*. Elle est transportée par *LanT* (transporteur ABC ou Transporteur ATP Binding Cassette) et traitée par *LanP*, entraînant la libération de bactériocine mature et fonctionnelle ;
- (3) La protéine histidine kinase (HPK) détecte la présence de bactériocine et s'autophosphoryle ;
- (4) Le groupe phosphoryle (P) est ensuite transféré vers le régulateur de réponse (RR) ;
- (5) RR active la régulation des gènes ;
- (6) *LanI* assure l'immunité de l'organisme producteur par l'intermédiaire de *LanFEG*.

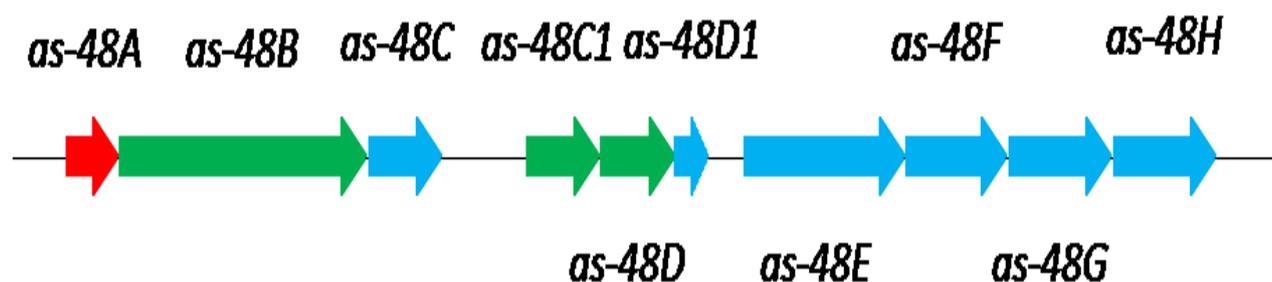
L'avancée des nouvelles techniques d'étude du génome a permis de disposer des séquences des différents acides aminés constituant les lantibiotiques ainsi que leurs séquences nucléotidiques. Ces différentes séquences sont accessibles sur BACTIBASE (<http://bactibase.pfba-lab-tun.org/bacteriocinslist.php?RecPerPage=ALL>).

1.1.6.3. Organisation génétique des bactériocines de classe II

Les gènes codant pour les bactériocines de la sous-classe IIa sont organisés en un ou deux opérons et sont localisés soit sur un plasmide ; soit sur le chromosome (Belguesmia *et al.*, 2011). En effet, généralement au moins sept gènes sont mobilisés lors de la synthèse des bactériocines de classe IIa : un gène comme inducteur, un gène codant la protéine kinase, un gène régulateur, un gène précurseur (codant pour la prébactériocine), un gène codant pour l'immunité, un gène pour le transporteur ABC et un dernier gène codant pour la protéine accessoire de transport (Morisset, 2003; Skaugen *et al.*, 2003).

La biosynthèse des bactériocines de la sous-classe IIb à deux composants nécessite plusieurs gènes dont deux gènes de structure, deux gènes précurseurs (l'un à la suite de l'autre sur le même opéron), un gène codant pour la protéine d'immunité, un gène codant pour le transporteur ABC transmembranaire et un gène codant pour la protéine accessoire (Nissen-Meyer *et al.*, 2011). Notons que les deux précurseurs sont synthétisés à quantité équivalente.

L'entéroccine AS-48, bactériocine de la sous-classe IIc, qui est la plus connue sera utilisée comme modèle dans l'illustration de l'organisation génétique des bactériocines de classe IIc. En effet, la synthèse de l'entéroccine AS-48 nécessite 10 gènes (Figure 9) qui peuvent être plasmidiques ou chromosomiques (Martin-Visscher *et al.*, 2011). On distingue alors un gène précurseur (gène *as-48A*), des gènes impliqués dans le transport et la maturation de la bactériocine (*as-48B*, *as-48C1* et *as-48D1*) et un ensemble de gènes impliqués dans l'immunité (*as-48C*, *as-48D1*, *as-48E*, *as-48F*, *as-48G* et *as-48H*).

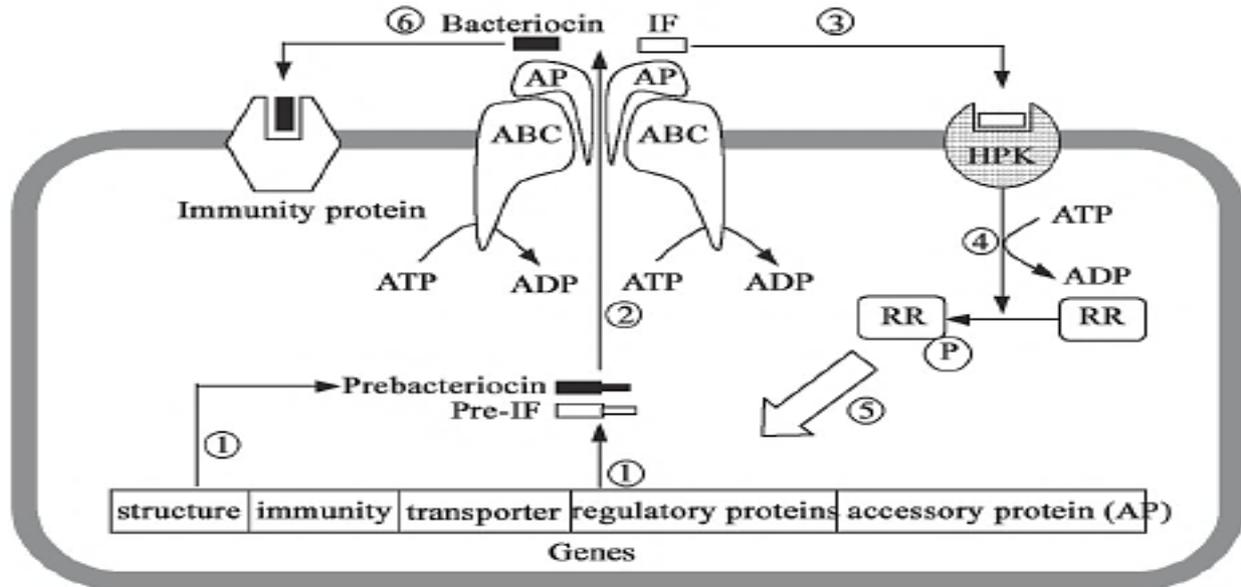


Source : Fernandez (2014)

Figure 9 : Organisation génétique de l'entéroccine AS-48

L'organisation génétique des bactériocines appartenant à la sous-classe II_d est similaire à celle des autres bactériocines de classe II. On trouve des gènes impliqués dans la synthèse du précurseur, de l'immunité, du transport et de maturation.

L'organisation génétique des bactériocines de classe II peut être résumée par le diagramme schématique proposé par Chen et Hoover en 2003 (Figure 10).



Source : Chen et Hoover (2003)

Figure 10: Diagramme schématique de la biosynthèse des bactériocines de classe II

- (1) Formation de la prébactériocine et d'IF (Induction factor) ;
- (2) Translocation de la prébactériocine et de facteur IF par le transporteur ABC, conduisant à la libération de la bactériocine mature et du facteur IF ;
- (3) Histidine protéine kinase (HPK) détecte la présence de IF et s'autophosphoryle ;
- (4) Le groupe phosphoryl P est transféré au système régulateur RR ;
- (5) Le régulateur RR active la régulation des gènes ;
- (6) Le système immunitaire du producteur

Les séquences nucléotidiques de quelques bactériocines de classe II sont accessibles sur BACTIBASE (<http://bactibase.pfba-lab-tun.org/bacteriocinslist.php?RecPerPage=ALL>).

1.1.6.4. Organisation génétique des Microcines et des Colicines

Chez les Microcines, les gènes sont localisés sur un ou plusieurs opérons dont un gène de structure pour le précurseur, un gène d'immunité distant du gène de structure, des gènes pour l'export et la sécrétion et plusieurs gènes impliqués dans les modifications post-traductionnelles (Duquesne *et al.*, 2007).

Les gènes impliqués dans la synthèse des Colicines organisés en opéron sont toujours localisés sur un plasmide dit colicinogène constitué d'un gène structural codant pour la colicine, d'un gène codant pour la protéine d'immunité et, dans certains cas, d'un gène codant pour la protéine de lyse (De Zamaroczy et Chauleau, 2011).

1.1.6.5. Organisation génétique des halocines

Les gènes des halocines sont localisés sur les mégaplasmides. Leur traduction coïncide ou démarre à quelques bases en amont du codon initiateur ATG et la préprotéine synthétisée est exportée par translocation et contient un peptide leader. Les halocines matures sont inactivées par une ou plusieurs protéases (Riley et Chavan, 2007).

1.1.7. Applications des bactériocines

Ces dernières décennies, les bactériocines compte tenu de leur innocuité ont été proposées pour plusieurs applications.

1.1.7.1. Applications en Agroalimentaire

La bioconservation d'un aliment consiste à augmenter sa durée de vie et à améliorer sa sécurité sanitaire en utilisant des microorganismes et /ou leurs métabolites (Ross *et al.*, 2002). Les bactéries lactiques produisent des substances (éthanol, peroxyde d'hydrogène, diacétyle, composés antifongiques, acides phényl-lactiques, antibiotiques et bactériocines) aux propriétés antimicrobiennes ; c'est pourquoi elles sont reconnues comme de bons agents de conservation des produits alimentaires (Klaenhammer, 1988; Abee, 1995; Corsetti *et al.*, 1998; Lavermicocca *et al.*, 2000; Atrih et Foster, 2001; Robertson *et al.*, 2003). De plus, les bactériocines ne sont pas toxiques pour les cellules eucaryotes et perdent leur activité en présence des protéases dans le tractus gastro-intestinal ; d'où l'intérêt accru porté à leurs

applications ces dernières décennies. Le tableau V illustre quelques bactériocines utilisées dans le monde pour augmenter la durée de vie de certains aliments.

Tableau V : Quelques bactériocines utilisées dans la conservation des aliments

Application	Bactériocine	Classe	Effet	
Dans les produits laitiers	Nisine	I	Prévenir la prolifération d'endospores de <i>Clostridium botulinum</i> et la contamination par <i>Listeria monocytogenes</i> dans le fromage.	
	Lacticine 3147	I	Inhibition de <i>Listeria monocytogenes</i> dans les yaourts naturels et le fromage écrémé	
	Pédiocine PA-1/AcH	IIa	Inhibition de <i>Listeria monocytogenes</i> dans les fromages blancs, crèmes et sauces à base de fromage.	
	Entéroccine AS-4S	IIc	Inhibition de <i>Listeria monocytogenes</i> et inhibition lente de <i>Staphylococcus aureus</i> dans le lait écrémé.	
Dans les viandes et les volailles	Nisine	En combinaison avec des acides organiques, lysozyme et chélateurs sous forme de film, activée par de l'EDTA	I	Décontamination des surfaces de préparations de viandes crues.
			I	Inhibition des entérobactéries et des espèces appartenant à <i>Carnobacterium</i> dans les tranches de bœuf pendant la réfrigération.
	Pédiocines	En combinaison avec Hautes Pressions Hydrostatiques (HPH)	I	Inhibition d' <i>Escherichia coli</i> et des <i>Staphylococcus</i> sp. dans le jambon cuit.
Dans les poissons	Nisine	Traitée à la chaleur (65°C)	I	Inhibition totale de <i>Listeria innocua</i> dans le caviar d'esturgeon ou de saumon (ikura).
		Immobilisée à des films plastiques	I	Inhibition de <i>Listeria monocytogenes</i> dans le saumon fumé pendant la réfrigération.

Source : Gálvez *et al.* (2011)

Après tannage, plusieurs espèces halophiles surtout les haloarchées peuvent survivre car trouvent le milieu propice à cause de la présence du sel. L'utilisation des halocines est recommandée afin de limiter la croissance de ces germes indésirables qui altèrent la qualité du cuire. Ainsi l'utilisation des archéocines dans les industries de textiles et de cuire permettrait de réduire les risques de détérioration des matières premières et surtout d'augmenter leur durée de conservation avant utilisation (Birbir et al., 2004; Charlesworth et Burns, 2015).

1.1.7.2. Applications médicales des bactériocines

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** : Utilisation de 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 (Bacteriocin Like 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.*, 2005b).
- ⇒ **Traitements de l'otite** : La nisine et la bactériocine ST4SA sont utilisées (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).
- ⇒ Les Colicines E1 et N ont montré des résultats satisfaisant in vitro dans la lutte contre les souches d'*E. coli* responsable des diarrhées chez les enfants et dans le traitement des œdèmes. Elles peuvent aussi constituer une alternative dans la prévention des infections chez les porcs (Stahl *et al.*, 2004).
- ⇒ 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 *E. coli* UPEC responsable de la majorité des infections urinaires (Trautner *et al.*, 2005; Trivedi *et al.*, 2014).
- ⇒ Les halocines sont utilisées lors des transplantations d'organes chez les chiens afin de prévenir le rejet du greffon. Dans ce cas, c'est la halocine H6 qui est la plus utilisée (Lequerica et al., 2006; Charlesworth et Burns, 2015).

1.1.7.3. Impact économique des bactériocines

Les bactériocines sont utilisées sous forme purifiée, semi-purifiée ou sous la forme d'un concentré obtenu après fermentation d'un substrat alimentaire comme le lait ou la viande (Makhloufi, 2011). Il est difficile de conditionner les bactériocines sous forme purifiée car leur purification est coûteuse parce qu'elle nécessite plusieurs étapes (précipitation – chromatographie sur colonne – HPLC en phase inverse) d'où des difficultés pour des productions à l'échelle industrielle. C'est la technique d'adsorption qui est la plus utilisée à cause du caractère cationique des bactériocines.

Outre la forme lyophilisée (Sutyak *et al.*, 2008), plusieurs formes de conditionnement des bactériocines sont de nos jours proposées : l'adsorption des bactériocines dans les particules de silicone, l'encapsulation dans les liposomes ou l'incorporation dans différents matériaux (alginates de calcium, cellulose, protéines de soja, films de polysaccharides) (Colas *et al.*, 2007). Tous ces problèmes rencontrés lors de la production et du conditionnement des bactériocines expliquent leur faible taux d'utilisation en tant que conservateur alimentaire ou pour d'autres applications.

Néanmoins, le commerce des bactériocines connaît un taux de croissance annuel de 2 – 3% et a atteint un chiffre d'affaire de plus de 24 milliards de dollars US en 2007 (Jones *et al.*, 2005). La commercialisation de la nisine occupe la part la plus importante car elle est à ce jour la seule bactériocine autorisée par la FAO à être utilisée comme additif alimentaire. Ces dernières années la production et la commercialisation des différentes bactériocines ont atteint des valeurs records car en suivant le taux de croissance annuel ; aujourd'hui on atteint un chiffre d'affaire de plus de 50 milliards de dollars US. Les principales sociétés productrices sont Danisco A/S (Danemark), Royal DSM (Hollande), Kerry Group Plc (Irlande), Rhodia S.A. (France), Sysco Foods (USA), Schreiber Foods (USA), etc.

L'utilisation des halocines dans les industries du textile permet de limiter la croissance des organismes halophiles présents à cause de l'emploi massif de sel lors des procédés de tannage. Cette utilisation réduirait les coûts de production.

1.2. Peptides NRPS (Non-Ribosomal Peptides Synthetases)

1.2.1. Historique

En 1971, Lipmann et Collaborateurs découvraient pour la première fois qu'une substance, la gramicidine S est synthétisée par la voie non-ribosomale (Lipmann *et al.*, 1971). En effet, ils découvrent qu'en présence de RNAses ou d'inhibiteur de la synthèse ribosomique, les extraits cellulaires de la bactérie étaient toujours capables de synthétiser la gramicidine S (Tambadou, 2014). Ils déduisent à partir de ces constats qu'il existait un mécanisme de synthèse peptidique indépendant de l'ARN. De plus, ils ont découvert chez la bactérie productrice (*Bacillus brevis*) des enzymes à fonctions inconnues (Marahiel *et al.*, 2003). L'isolement de ces enzymes à fonctions inconnues a permis à Lipmann et son équipe de montrer qu'elles étaient impliquées dans la synthèse de cet antibiotique. De nos jours, ces enzymes sont appelées synthétases de peptides non-ribosomiques, ou Non-Ribosomal Peptide Synthétases (NRPS).

1.2.2. Diversité des peptides NRPS

La biosynthèse non-ribosomique utilise en plus des 20 acides aminés du code génétique, d'autres molécules non protéogéniques tels que les acides aminés non protéogéniques (formes D, hydroxylés, méthylés), des acides gras, des sucres, des lipides et des hydrates de carbone issus d'autres voies de biosynthèse. C'est pour cette raison que le terme « monomères » est utilisé pour désigner ces différentes molécules précurseurs incorporées dans les peptides non-ribosomiques (Tambadou, 2014).

1.2.3. Structure des peptides NRPS

Les peptides non-ribosomiques présentent des structures particulières qualifiées souvent de complexes. On retrouve :

- des structures linéaires comme le tripeptide ACV, précurseur de la pénicilline,
- des structures branchées : exemple de la vibriobactine,
- des structures partiellement cycliques : exemple des polymyxines,
- des structures totalement cycliques comme dans le cas de la cyclosporine A,
- des structures complexes : exemple de la vancomycine (Caboche *et al.*, 2010).

Selon Schwarzer *et al.* (2003), ces structures peuvent contenir des N-méthylations, des N-formylations, des glycosylations, des insertions d'acétate ou de propionate et mêmes des acides gras.

1.2.4. Synthèses des peptides NRPS

Les peptides NRPS sont de grands complexes multienzymatiques organisés en modules. Cette organisation leur permet de produire des peptides par voie non-ribosomique dont les gènes codants sont souvent organisés en opérons (Schwarzer *et al.*, 2003).

Une synthétase est composée de plusieurs modules (2 à 20) dont chacun est responsable de l'incorporation d'un monomère spécifique dans la chaîne peptidique en formation (Stachelhaus et Marahiel, 1995). Chaque module est subdivisé en domaines catalytiques principaux responsables de l'activation du monomère (domaine d'adénylation A), de l'élongation de la chaîne peptidique (domaine de thiolation T), de la formation des liaisons peptidiques (domaine de condensation C) et de la libération du peptide (domaine thioestérase Te) (Sieber et Marahiel, 2005).

Les domaines secondaires sont responsables de modifications structurelles supplémentaires des peptides ; modifications chimiques qui leur confèrent une plus grande rigidité structurelle et une stabilité contre la dégradation protéolytique des peptides (Schwarzer *et al.*, 2003; Fischbach et Walsh, 2006; Samel *et al.*, 2008). Les domaines secondaires les plus courants sont les domaines d'épimérisation (E), de cyclisation (Cy), de méthylation (Mt), de formylation (F), d'oxydation (Ox) et de réduction (R). Le tableau VI liste les domaines principaux et secondaires et les motifs correspondants impliqués dans la synthèse des peptides non-ribosomiques.

Plusieurs travaux ont montré qu'à la différence des autres domaines qui sont présents de manière répétitive, le domaine Te n'est présent que dans le module de terminaison (Marahiel et Essen, 2009; Strieker *et al.*, 2010).

Tableau VI : Liste des domaines et motifs correspondants impliqués dans la synthèse de peptides non-ribosomique.

Domaine	Motif	Séquence de la signature	Domaine	Motif	Séquence de la signature
Domaine A	A1	L(TS)YxEL	Domaine E	E1	PIQxWF
	A2	LKAGxAYL(VL)P(LI)D		E2	HHxISDG(WV)S
	A3	LAYxxYTSG(ST)TGxPKG		E3	DxLLxAxG
	A4	FDxS		E4	EGHGRE
	A5	NxYGPTE		E5	RTVGVWFTxxYP(YV)PFE
	A6	GELxJGx(VL)ARGYL		E6	PxxGxGYG
	A7	Y(RK)TGDL		E7	FNYLG(QR)
	A8	GRxPxQVKIRGxRIELGEIE	Domaine Mt	M1	VL(DE)xGxGxG
	A9	LPxYM(IV)P		M2	NELxYRYxAV
	A10	NGK(VL)DR		M3	VExSxARQxGxLD
Domaine T	T	LGG(DH)SL	Domaine Te	Te	GxSxG
Domaine C	C1	SxAQxR(LM)(WY)xL	Domaine Cy	Cy1	FPL(TS)xxQxAYxxGR
	C2	RHExLRTxF		Cy2	RHx(IM)L(PAL)x(ND)GxQ
	C3	MHHxISDG(WV)S		Cy3	LPxxPxLPLxxxP
	C4	YxD(FY)AVW		Cy4	(TS)(PA)3x(LAF)6x(IVT)LxxW
	C5	(IV)GxFVNT(QL)(CA)xR		Cy5	(GA)DFTxLxLL
	C6	(HN)QD(YD)PFE		Cy6	PVVFTSxL
	C7	RDxSRNPL		Cy7	(ST)(QR)TPQVx(LI)D13xWD
Domaine R	R1	V(L)(L)TG(A)TG(F)(L)GxxLL	Domaine Ox	Ox1	KYxYxSxGxxY(PG)VQ
	R2	Vx(L)(L)VR(A)		Ox2	GxxxG(LV)xxGxYYY(HD)P
	R3	GPL(G)x(P)x(L)GL		Ox3	IxxxYG
	R4	V(Y)PYxYLxx(P)NVxxT			
	R5	GYxxSKW(A)(A)E			
	R6	R(P)G			
	R7	YxxxxG(LF)LxxP			

Dans un motif, la liste des acides aminés possibles à une position donnée est indiquée entre parenthèses. Le x symbolise n'importe quel acide aminé. Domaine A = domaine d'adénylation, Domaine T = domaine de thiolation, Domaine C = domaine de condensation, Domaine Te = domaine thioestérase, Domaine Ox = domaine d'oxydation, Domaine R = domaine de réduction, Domaine Cy = domaine de cyclisation, Domaine E = domaine d'épimérisation, Domaine Mt = domaine de méthylation. Source : Tambadou (2014)

1.2.5. Activités biologiques des peptides NRPS

Produits naturels, les peptides non-ribosomiques présentent un large éventail d'activités biologiques et de propriétés pharmacologiques grâce à leur structure et à leur composition en monomères (Schwarzer *et al.*, 2003; Felnagle *et al.*, 2008; Caboche *et al.*, 2010). Plusieurs groupes de peptides non-ribosomiques ont été proposés en tenant compte de leur activité biologique (Schwarzer *et al.*, 2003; Caboche *et al.*, 2010). Les antibiotiques, les toxines, les surfactants, les sidérophores, les immuno-modulateurs et les anti-tumoraux sont les principales classes proposées.

- **Les antibiotiques** sont des molécules naturelles produites par un microorganisme ou produites par synthèse chimique. Ils peuvent être :
 - (i) Antibactériens : exemple de la pénicilline, de la Curbicine R, etc..(Weis *et al.*, 2008);
 - (ii) Antifongiques car sont capables de tuer les champignons ou d'inhiber leur croissance. Exemple de la mycosubtiline (Leclère *et al.*, 2005) ;
 - (iii) Antiviraux : exemple de la surfactine, produite par *Bacillus subtilis* (Kracht *et al.*, 1999).
- **Les toxines** sont des substances qui confèrent un pouvoir pathogène à son producteur. Exemple : l'HC-toxine, produite par *Cochliobolus carbonum* et les microcystines produites par les cyanobactéries sont toxiques pour les plantes et les animaux, dont l'homme (Lam *et al.*, 2000; Walton, 2006).
- **Les surfactants** sont des substances qui améliorent la miscibilité entre les phases hydrophiles et hydrophobes. Les détergents, les agents moussants, les agents dispersants ou encore les émulsifiants sont quelques-uns des surfactants. Contrairement aux surfactants synthétiques, les biosurfactants présentent un grand intérêt car ils sont facilement dégradables. Exemple : La lichenysine, produite par *Bacillus licheniformis*, a une structure proche de celle de la surfactine (une glutamine remplace l'acide glutamique de la surfactine) produite par *Bacillus subtilis* ; mais montre un pouvoir surfactant plus élevé que celui de la surfactine (Grangemard *et al.*, 2001; Abdel-Mawgoud *et al.*, 2008).
- **Les sidérophores** sont des substances qui favorisent la chélation du fer. La capture du fer dans le milieu extérieur réduit sa disponibilité, ce qui induit un ralentissement de la croissance des microbes car c'est un élément indispensable à leur survie. Exemples : les pyoverdines, produites par différentes espèces de *Pseudomonas* (Budzikiewicz, 2004). Il existe aussi la yersiniabactine, produite par *Yersinia pestis* (Miller *et al.*, 2002) et l'entérobactine produite par différentes bactéries (Raymond *et al.*, 2003).

- **Les immuno-modulateurs** sont des molécules qui inhibent (immuno-suppresseurs) ou activent le système immunitaire. Exemple : la cyclosporine A, produite par *Tolypocladium inflatum*, est utilisée après une greffe pour réduire les risques de rejet ou dans le traitement des maladies auto-immunes (Green, 1980).
- **Les anti-tumoraux** sont des peptides non-ribosomiaux utilisés dans le traitement de certains cancers. Exemples : La bléomycine A2 et la bléomycine B2, produites par *Streptomyces verticillus*, sont utilisées dans le traitement du cancer de l'œsophage, des lymphomes, des carcinomes à cellules squameuses ou du cancer des testicules. L'actinomycine D, produite par diverses bactéries du genre *Streptomyces*, est un antibiotique présentant une activité antitumorale, car elle est utilisée dans le traitement des cancers des os, de la peau, des testicules et de l'utérus (Koba et Konopa, 2005).

1.3. Autres peptides bioactifs

Les peptides bioactifs sont des fragments de protéines ayant un impact positif sur la santé du consommateur (Espitia *et al.*, 2012). Ces peptides bioactifs sont produits par les microorganismes, les plantes, les animaux et les humains (St Georgiev, 1990; Hancock et Diamond, 2000). Plusieurs travaux ont reporté que leurs effets bénéfiques constatés sont dus à

- leur pouvoir antimicrobien (Rajanbabu et Chen, 2011) ;
- leur activité antifongique (Jenssen *et al.*, 2006). Exemple : Peptide SMAP-29, peptide Ib-AMPs, peptide di-K19Hc ;
- leur activité antivirale (Jenssen *et al.*, 2006). Exemples : peptide cecropine A, hepcidine 1–5 ;
- leur activité antitumorale (Cho *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2011). Exemples : cecropines, buforines et magainines.
- leur pouvoir anti-oxydant (Sarmadi et Ismail, 2010) ;
- leur action anti-thrombotique (Wang et Ng, 1999) ;
- leur action anti-hypertensive (Erdmann *et al.*, 2008) ;
- leurs rôles d'immunomodulateurs (St Georgiev, 1990; Gauthier *et al.*, 2006).

Quelques exemples de peptides bioactifs utilisés couramment dans l'alimentation sont : Buforine II, Cecropine A, α -Defensine, Di-K19Hc, Ib-AMPs, Magainine II, Melittine, Mucroporine-M1, Omiganan, Pleurocidine, Tachyplesine II, Peptide SMAP-29, Peptide TH2–3, Synthetic peptide 6K8L, Synthetic peptide E14LKK, Synthetic peptide TH1–5, Psacothesi (Espitia *et al.*, 2012).

2. BACTÉRIES PRODUCTRICES DE BACTÉRIOCINES

Les bactériocines sont produites à la fois par les bactéries à Gram positives, les bactéries à Gram négatives et les Archées.

2.1. Bactéries à Gram positives productrices de bactériocines

Les bactéries à Gram positive produisent des bactériocines et ses bactériocines sont les plus étudiées. Elles ne sont pas actives sur l'organisme producteur mais sur des souches phylogénétiquement proches. Cette partie du document traitera des bactéries lactiques et des bactéries du genre *Bacillus* productrices de bactériocines.

2.1.1. Bactéries lactiques

2.1.1.1. Principales caractéristiques des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont définies comme étant des cellules procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes (Hassaine, 2013).

Les bactéries lactiques (BL) sont à Gram positives et ont moins de 55 mol% de contenu G+C dans leur ADN à l'exception des Bifidobactéries. Elles sont asporulées, immobiles, anaérobies mais aérotolérantes, ne possédant ni nitrate-réductase, ni cytochrome oxydase. Elles sont aussi catalase négative mais certaines souches possèdent une pseudocatalase. Elles ne liquéfient pas la gélatine et ne produisent pas d'indole, ni d'hydrogène sulfureux. Elles ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (Holzapfel *et al.*, 2001).

Toutes les bactéries lactiques ont un métabolisme fermentaire qui repose dans sa grande partie sur l'utilisation des glucides, car en les utilisant elles peuvent produire soit de l'acide lactique exclusivement (bactéries homolactiques strictes), soit de l'acide lactique et de l'acide acétique (bactéries hétérolactiques facultatives), soit de l'acide lactique, de l'acide acétique ou de l'éthanol et du CO₂ (bactéries hétérolactiques strictes) (Vandamme *et al.*, 1996a, b). Certaines espèces de bactéries lactiques peuvent en outre produire de l'acide formique ou de l'acide succinique (Roissart et Luquet, 1994).

Les bactéries lactiques utilisées dans l'alimentation sont considérées comme non pathogènes et se font attribuer le qualificatif anglo-saxon d'organismes GRAS (Generally Regarded As Safe) (Adams et Marteau, 1995). Cependant, parmi elles, quelques espèces du genre *Streptococcus* et *Enterococcus* sont considérées comme des pathogènes opportunistes (Aguirre et Collins, 1993).

2.1.1.2. Caractéristiques morphologiques des bactéries lactiques

L'étude de la morphologie bactérienne est une étape préliminaire dans l'identification de l'espèce bactérienne. En général, l'étude morphologique des bactéries lactiques repose sur deux aspects qui sont l'aspect macroscopique et l'aspect microscopique.

- L'aspect macroscopique résulte de l'observation des colonies après culture sur milieux solides. Les colonies des bactéries lactiques peuvent être de formes circulaires, à contour régulier, à surface lisse, de couleur blanche avec un aspect laiteux et de diamètre compris entre 0,5 et 1,5 mm (Hassaine, 2013).
- L'observation microscopique des bactéries lactiques se fait à l'aide d'un microscope à partir d'une suspension bactérienne de préférence jeune. On distingue deux formes majeures : coques (0,5 à 2 µm de diamètre) ou bâtonnets (0,5 à 2 µm de diamètre ; 1 à plus de 10µm de long) (Dellaglio *et al.*, 1994). Leur mode d'association est très hétérogène (cellules isolées, paires, tétrades, amas irréguliers, longues ou courtes chaînettes) mais spécifique à chaque genre bactérien (Hassaine, 2013). Entre les deux formes on peut avoir une forme intermédiaire appelée cocobacille.

2.1.1.3. Différents genres des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques comptent 6 familles et 40 genres (Holzapfel et Wood, 2014; Mattarelli *et al.*, 2014). Ce sont :

- *Aerococcaceae* (genre *Aerococcus*, *Abiotrophia*, *Facklamia*, *Dolosicoccus*, *Eremococcus*, *Globicatella* et *Ignavigranum*).
- *Carnobacteriaceae* (genre *Carnobacterium*, *Marinilactobacillus*, *Trichococcus*, *Agitococcus*, *Alkalibacterium*, *Allofustis*, *Alloiococcus*, *Atopobacter*, *Atopococcus*, *Atopostipes*, *Bavariicoccus*, *Desemzia*, *Dolosigranulum*, *Granulicatella*, *Isobaculum* et *Lacticigenium*).
- *Enterococcaceae* (genre *Enterococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Atopobacter*, *Catelicoccus*, *Melissococcus*, et *Pilibacter*).
- *Lactobacillaceae* (genre *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* et *Pediococcus*).

- *Leuconostocaceae* (genre *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Fructolactobacillus* et *Weissella*).
- *Streptococcaceae* (genre *Streptococcus*, *Lactococcus* and *Lactovum*).

Au groupe des bactéries lactiques s'ajoutent la famille des *Bifidobacteriaceae* formée des genres *Bifidobacterium*, *Aeriscardovia*, *Alloiscardovia*, *Metascardovia*, *Parascardovia* et *Scardovia*.

Les différents genres de bactéries lactiques et leurs caractéristiques sont reportés dans le tableau VII.

Tableau VII : Caractéristiques des différents genres de bactéries lactiques

Genre	Caractéristique	Référence
<i>Aerococcus</i>	Cocci immobile associés en tétrades, acidifient le glucose sans gaz, sensibles à la vancomycine. Croissance en présence de NaCl 6,5%	(Lawson, 2014a)
<i>Bifidobacterium</i>	Bacilles immobiles, anaérobies strictes et représente 85 – 99 % de la flore intestinale d'un enfant Joue un rôle majeur dans l'équilibre et la stabilité de la flore intestinale. 32 espèces répertoriées. Apte à fermenter le lait ou à être incorporé dans les aliments. Croissance optimale à pH6,5 – 7.	(Stahl <i>et al.</i> , 2004; Mattarelli <i>et al.</i> , 2014)
<i>Carnobacterium</i>	Bacilles minces, droits/incurvés regroupés en paire/ isolé/courtes chaînes, mobiles ou immobiles. Incapable de croître sur milieu acétate et à NaCl 8%. Poussent à 10°C et parfois à 0 °C.	(Wallbanks <i>et al.</i> , 1990; Franzmann <i>et al.</i> , 1991; Collins <i>et al.</i> , 1993)
<i>Enterococcus</i>	Cocci ovoïde, isolé, courte ou longue chaînette. Plupart immobile et tolèrent des taux de sel allant jusqu'à 6,5%. Se retrouvent au niveau du colon et de l'intestin grêle. Sont hémolytiques et très saccharolytiques. Produisent de nombreuses substances à activité bactéricide et bactériostatique.	(Švec et Franz, 2014)
<i>Lactobacillus</i>	Bacilles droits/incurvés, isolés ou en chaînette Très saccharolytiques, Libèrent de l'acide lactique D, L ou DL. Colonies parfois pigmentées en rouge brique. Sont utilisés comme Probiotiques. Produisent de nombreux métabolites par métabolisme homofermentaire et hétérofermentaire d'où leur utilisation dans la conservation des aliments.	(Badis <i>et al.</i> , 2005; Pot <i>et al.</i> , 2014)

Tableau VII : Caractéristiques des différents genres de bactéries lactiques (suite)

Genre	Caractéristique	Référence
<i>Lactococcus</i>	Retrouvés essentiellement dans les produits laitiers et sont homolactiques. Cocci en chaînette de longueur variable. Sont des bactéries thermosensibles ne poussant pas en présence de NaCl 6,5% et à un pH 9,6.	(Kim, 2014)
<i>Leuconostoc</i>	Cocci en chaînette et hétérofermentaire Forment des colonies transparentes très petites et rondes. Poussent en présence de NaCl 6,5% ; (G + C) : 37 – 45 %	(Badis <i>et al.</i> , 2005; Björkroth <i>et al.</i> , 2014b)
<i>Oenococcus</i>	Cocci en courte chaînette sineuse Mésophiles et hétérofermentaires	(Endo et Dicks, 2014)
<i>Pediococcus</i>	Cocci en paires/tétrades Faible activité protéolytique et très peu métabolisent le lactose et tolèrent NaCl 6,5%.	(Badis <i>et al.</i> , 2005; Franz <i>et al.</i> , 2014)
<i>Streptococcus</i>	Cocci en chaînes dressées. Tolèrent NaCl 6,5%, température de 50°C et pH 5 – 9,6. (G + C) : 35 – 46 %	(du Toit <i>et al.</i> , 2014)
<i>Tetragenococcus</i>	Cocci en paires/tétrades et sont homofermentaires. Tolèrent des taux élevés de sel.	(Justé <i>et al.</i> , 2014)
<i>Vagococcus</i>	Cocci et possèdent l'antigène du groupe N de Lancefield. Ne poussent pas à 45°C en présence de NaCl 6,5% et à pH 9,6.	(Schleifer <i>et al.</i> , 1991; Lawson, 2014b)
<i>Weissella</i>	Cocci ou coccobacilles ou bâtonnets isolés/groupés à Gram positif aux formes variées, non mobiles, non sporulants et en général anaérobies strictes qui composent la presque totalité (85 à 99%) de la flore intestinale d'un enfant. Possèdent un peptidoglycane du type A3-alpha. Bonne croissance en bouillon MRS. Sont d'origine animale et fécale. Une diminution des bifidobactéries au profit des clostridies, des lactobacilles, des streptocoques et des entérobactéries est observée tout au long de la vie. Température optimale : 37 à 41°C ; pH optimal : 6,5 à 7.	(Stanton <i>et al.</i> , 1998; Ennahar et Cai, 2004; Björkroth <i>et al.</i> , 2014a)

2.1.1.4. Écologie des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont ubiquistes car elles se retrouvent dans différentes niches écologiques comme le lait et les produits laitiers, les végétaux, la viande, le poisson, les muqueuses humaines et animales ainsi que dans le tractus gastro-intestinal, et dans les voies génitales ; ce qui explique leur température de croissance hétérogène (Klein *et al.*, 1998; Dortu et Thonart, 2009; Makhloufi, 2011).

- **Dans l'environnement** : les bactéries lactiques sont souvent retrouvées dans le lait et ses dérivés (lait fermenté, fromages, etc.). Les différentes espèces de *Lactobacillus*, *Lactococcus* (*Lc. lactis* et *Lc. garvieae*), les plus rencontrées dans le lait et le fromage, sont communément utilisées comme ferments ou « starter culture » par l'industrie agroalimentaire pour la production de produits laitiers. Un ferment désigne un microorganisme, une bactérie ou un champignon, responsable de la fermentation. Aussi, les bactéries lactiques sont à l'origine de la fermentation utilisée pour la préparation de boissons à partir de plantes (boza, cidre, etc.). Parmi elles, on distingue des espèces appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Leuconostoc* (Gálvez *et al.*, 2011). Acidotolérantes, les bactéries lactiques sont capables de survivre dans des milieux très acides en raison de leur production d'acides organiques (Gálvez *et al.*, 2011).
- **En association avec un hôte** : Les bactéries lactiques peuvent vivre en symbiose entre elles et avec un hôte. La symbiose est une association intime et durable entre deux organismes hétérospécifiques (espèces différentes), parfois plus. Le tractus gastro-intestinal des mammifères est colonisé par des bactéries lactiques (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Weisseilla*). Par ailleurs, l'appareil génital de la femme est principalement colonisé par des bactéries lactiques (principalement le genre *Lactobacillus*) auxquelles il apporte des nutriments comme le glycogène. En acidifiant le milieu, ces bactéries apportent une protection contre des pathogènes comme *Trichomonas vaginalis* (pathogène responsable de la trichomonase vaginale) (Ruiz *et al.*, 2009), de *Candida albicans* à l'origine de la vulvo-vaginite (Falagas *et al.*, 2006).

2.1.1.5. Caractères biochimiques et physiologiques des bactéries lactiques

Toutes les bactéries lactiques ont la capacité de fermenter certains sucres en acide lactique. La première propriété est la production d'acide lactique et la réduction du pH du milieu. De plus les bactéries lactiques peuvent produire un nombre variable de substances antimicrobiennes d'une part de poids moléculaire faible comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), le dioxyde de carbone (CO₂), le diacétyle (2,3-butanedione) et d'autre part de poids moléculaire élevé comme les bactériocines et enfin des substances antimicrobiennes non encore identifiées (Savadogo *et al.*, 2006; Khay *et al.*, 2011).

Les bactéries lactiques sont dépourvues de cytochrome-oxydase et généralement de nitrate réductase. Elles ne possèdent pas de voies fonctionnelles pour la synthèse de l'hème (Miyoshi *et al.*, 2003). De plus, les bactéries lactiques ne liquéfient pas la gélatine et ne produisent pas d'indole ni d'hydrogène sulfureux (H₂S). Elles sont asporulantes, ne se développent pas en présence de 6,5% de NaCl, ou lorsque le pH est supérieur à 9,6 (Dellaglio *et al.*, 1994). Elles sont anaérobies mais souvent micro-aérophiles, et présentent des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés, les peptides, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles.

2.1.1.6. Caractères moléculaires des bactéries lactiques

Le contenu G+C des bactéries lactiques varie de 30 à 50% (Bolotin *et al.*, 2001; Makarova *et al.*, 2006; Makarova et Koonin, 2007; Wegmann *et al.*, 2007). Généralement, on considère que deux isolats bactériens appartiennent à des espèces différentes si la différence de leur contenu en G+C est supérieure à 5%. Toutefois, deux souches ayant le même G+C n'appartiennent pas forcément à la même espèce, car cette valeur ne prend pas en considération l'arrangement linéaire des nucléotides dans la molécule d'ADN. Les gènes retrouvés chez les bactéries lactiques varient de 1600 à 3000 (Makarova et Koonin, 2007). Cette diversité génétique observée chez les bactéries lactiques peut être due à la duplication, à l'acquisition ou à la perte de gènes. De plus, il a été démontré que le genre *Leuconostoc* présente une évolution accélérée d'un facteur allant de 1,7 à 1,9 comparé au genre *Pediococcus*, alors que chez *Oenococcus oeni* ce facteur est encore plus important (1,6 fois plus) comparé à celui de *Leuconostoc* (Makarova et Koonin, 2007). En conclusion, *Oenococcus oeni* est considéré comme l'espèce qui évolue le plus rapidement parmi les espèces de bactéries lactiques en accord avec l'observation des taux de mutations élevées dans le génome d'*Oenococcus oeni* (Makarova et Koonin, 2007).

2.1.1.7. Utilité des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont principalement utilisées en tant que starter dans les produits alimentaires fermentés où elles permettent de développer certaines caractéristiques organoleptiques et d'augmenter la durée de conservation (Abee, 1995; Hugenholtz et Kleerebezem, 1999; Dortu et Thonart, 2009). En effet, la fermentation lactique des aliments constitue l'une des plus anciennes formes de conservation de la nourriture. Elles produisent de nombreux métabolites : arômes comme acétoïne et diacétyle ; exopolysaccharides; acide lactique, peroxyde d'hydrogène; bactériocines (De Parasis et Roth, 1990; Savadogo *et al.*, 2004a, b, c; Savadogo *et al.*, 2006, 2007; Khay *et al.*, 2011). Ces métabolites ont des actions dirigées contre les souches proches de la souche productrice, et exercent une action déterminante sur les qualités organoleptiques des produits fermentés en agissant sur la texture et la

saveur qui se révèlent différentes de celles de l'aliment à son état originel. De plus, certaines espèces de bactéries lactiques comme les *Lb. brevis*, *Lb. plantarum*, *Lb. acidophilus* et *Lb. subsp bulgaricus* produisent des antibiotiques actifs contre les bactéries à Gram positives (*Bacillus*, *Staphylococcus*, *Sarcina*, etc.) ou à Gram négatives (*Pseudomonas*, *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Proteus*, *Vibrio*, etc.). L'élimination de microorganismes pathogènes intervient suite à la production de bactériocines et des acides organiques entraînant une inhibition du métabolisme oxydatif et une diminution de pH intracellulaire (Savadogo et Traore, 2011).

Quelques exemples :

- ⇒ *Lactococcus*, *Lactobacillus* et *Streptococcus* sont utilisés dans la fabrication des fromages à partir du lait de chèvre, vache ou de brebis.
- ⇒ *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* subsp. *delbrueckii* sont utilisés dans la fabrication du yaourt à partir du lait de vache.
- ⇒ *Pediococcus* sp., *Lactobacillus plantarum* et *Lactococcus* sp. entrent dans la fabrication de saucisse fait à partir de porc ou de bœuf.
- ⇒ On retrouve *Lactobacillus bulgaricus* subsp. *delbrueckii* dans la sauce de soja et *Leuconostoc oenos* dans le vin.
- ⇒ L'Ogi fabriqué à partir du maïs contient *Lactobacillus plantarum* et *Lactococcus lactis*.

Les souches de bactéries lactiques peuvent être utilisées dans des produits non fermentés en tant que culture protectrice. Une culture protectrice est une culture antagoniste ajoutée à un produit alimentaire pour inhiber les bactéries pathogènes et ou altérantes et ainsi prolonger sa durée de vie en changeant ses propriétés organoleptiques le moins possible (Rodgers, 2001, 2003; Vermeiren *et al.*, 2004; Dortu et Thonart, 2009).

2.1.1.8. Effets des bactéries lactiques sur la santé humaine et animale

Les bactéries lactiques sont de plus en plus utilisées en alimentation humaine et animale pour leurs effets probiotiques. Un probiotique est un microorganisme vivant qui lorsqu'il est ingéré en quantité suffisante exerce un effet positif sur la santé. C'est vraisemblablement Metchnikoff qui, le premier vers 1908 (Savadogo et Traore, 2011), a suggéré d'utiliser les laits fermentés contenant une souche de lactobacilles, capables de vivre dans le tractus intestinal, comme composants d'une alimentation utile à la santé humaine. Les effets bénéfiques des bactéries lactiques sur la santé des consommateurs sont

reconnus depuis longtemps. En effet, elles améliorent la digestion du lactose et peuvent prévenir les maladies gastrointestinales et les diarrhées. Elles sont aussi utilisées dans la prévention des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Elles possèdent des propriétés antitumorales qui pourraient être dues soit à l'inactivation ou l'inhibition des composés carcinogènes dans le tractus gastrointestinal, soit à la réduction de l'activité enzymatique des bactéries intestinales telle que celle de la β glucorinidase, l'azoréductase et de la nitroréductase.

Actuellement ce sont le yaourt et ses ferments vivants (*Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp.*bulgaricus*) et les laits fermentés contenant des bifidobactéries et *Lactobacillus acidophilus* ou *Lb. casei* qui ont fait l'objet des recherches les plus approfondies sur le transit colique, l'allergie alimentaire ou encore sur le syndrome de l'intestin irritable.

2.1.1.9. Bactériocines produites par les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont considérées comme sûres à cause du rôle prépondérant qu'elles jouent dans les produits alimentaires fermentés. C'est pourquoi les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont les plus étudiées (Verma *et al.*, 2014). Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont réparties en quatre classes comme proposé par Klaenhammer en 1993 : les lantibiotiques, les peptides non-modifiés (pseudo-pédiocines, bactériocines à deux composantes et les bactériocines activées par un thiol), les peptides de haut poids moléculaire thermolabiles et les bactériolysines.

Le tableau VIII a été proposé par Molloy *et al.* (2011) pour montrer quelques bactéries à Gram positives et les bactériocines qu'elles synthétisent. On remarque que les bactériocines produites par les bactéries à Gram positives possèdent un spectre d'action variable.

Tableau VIII: Bactériocines produites par les bactéries à Gram positives

Bactériocine	Bactérie productrice	Spectre d'activité	Nombre des acides aminés	Aliment à partir duquel l'organisme a été isolé
Nisine (A et Z)	<i>Lactococcus lactis</i>	Large	34	Lait
Lactocine S	<i>Lactobacillus sake</i>	Large	37	Saucisse fermentée
Carnocine U149	<i>Carnobacterium piscicola</i>	Large	35-37	Poisson
Variacine	<i>Micrococcus varians</i>	Large	25	Viandes fermentées
Lacticine 3147	<i>Lactococcus lactis</i>	Large	29 et 30	Grains de kéfir
Lactococcine A	<i>Lactococcus lactis</i>	Etroit	54	Fromage
Lactococcine B	<i>Lactococcus lactis</i>	Etroit	47	Fromage
Lactococcine M	<i>Lactococcus lactis</i>	Etroit	48	Fromage
Mésentérocin 52B	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Etroit	32	Lait frais
Curvaticine FS47	<i>Lactococcus curvatus</i>	Moyen	31	Bœuf
Carnobacteriocine A et B	<i>Carnobacterium piscicola</i>	Moyen	53 et 48	Viande
Sakacine A et P	<i>Lactobacillus sake</i>	Moyen	41 et 41	Viandes et saucisses fermentées
Leucocine A-UAL-187	<i>Leuconostoc gellidum</i>	Moyen	37	Viandes
Pédiocine PA-1	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Moyen	44	Viandes
Entérocin 1146/A	<i>Enterococcus faecium</i>	Moyen	47	Viande et lait fermenté
Piscicoline 126	<i>Carnobacterium piscicola</i>	Moyen	44	Jambon
Mésentérocin Y105	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Moyen	37	Lait de chèvre

Source : Molloy *et al.* (2011)

2.1.1.10. Genre *Lactobacillus*

a) Généralités sur les bactéries du genre *Lactobacillus*

Les membres du genre *Lactobacillus* sont généralement asporulogènes, immobiles de forme coccobacilli à bâtonnet s'organisant en chaîne. Leur température optimale de croissance se situe entre 30 et 40°C, pour un pH allant de 3 à 8 (Pot *et al.*, 2014).

La plupart des espèces de *Lactobacillus* sont définies par deux principaux critères génotypiques :

- Les souches présentant une similarité de 70% ou plus au niveau de leur ADN,
- La différence du gène 16S rRNA au sein des espèces ne doit pas dépasser 3%.

Par contre les caractères phénotypiques doivent être recherchés pour confirmer les groupes proposés.

b) Identification des *Lactobacillus*

Depuis les années 1990, l'identification et la description de nouvelles espèces a souvent été basée sur une approche polyphasique (Vandamme *et al.*, 1996b), impliquant à la fois la caractérisation génotypique et phénotypique. Génotypiquement, le séquençage du gène 16S rRNA était le plus étudié à cause de la disponibilité des bases de données et de nos jours à cause de la réduction du coût de séquençage. Cependant la construction des arbres phylogénétique à partir des séquences de 16S rRNA présente beaucoup de lacunes.

Ces dernières années, l'utilisation des amorces spécifiques pour amplifier non seulement les séquences conservées mais aussi en tenant compte des autres zones et le séquençage de ces zones et leur analyse en utilisant différents outils moléculaires a permis d'affiner la taxonomie des *Lactobacillus* et surtout d'établir des relations entre les différentes espèces (Naser *et al.*, 2007; De Bruyne *et al.*, 2009; Scheirlinck *et al.*, 2009).

Plusieurs méthodes sont utilisées aujourd'hui soit seules, soit en combinaison pour identifier les espèces de *Lactobacillus*. Ces méthodes sont :

- Les aspects macroscopiques et microscopiques (Hassaine, 2013; Pot *et al.*, 2014) ;
- Les méthodes phénotypiques par utilisation de galerie API 50 CH (Gancheva *et al.*, 1999; Pot *et al.*, 2014);
- Utilisation de la composition de la paroi cellulaire (Makhloufi, 2011; Pot *et al.*, 2014) ;

- Les méthodes sérologiques (Shaw et Harding, 1989; Pot *et al.*, 2014) ;
- Utilisation des marqueurs chimio-taxonomiques (Björkroth *et al.*, 2002; Pot *et al.*, 2014);
- Les méthodes génotypiques. On peut en distinguer :
 - ⇒ Hybridation ADN-ADN et quantité de base (Makhloufi, 2011; Cai *et al.*, 2012) ;
 - ⇒ Comparaison des séquences de 16S/23S rRNA (Cachat et Priest, 2005; Pot *et al.*, 2014). Aujourd'hui, la combinaison des séquences de 16S rRNA et l'hybridation ADN-ADN reste la meilleure des méthodes génotypiques.
 - ⇒ Séquençage de housekeeping genes (Sheppard *et al.*, 2012; Pot *et al.*, 2014);
 - ⇒ Comparaison de génome complet par les bases de données (Salveti *et al.*, 2013; Pot *et al.*, 2014).

2.1.2. Genre *Bacillus*

Le genre *Bacillus* a été découvert en 1835 par Ehrenberg qui donna le nom de "*Vibrio subtilis*", que Cohn renoma "*Bacillus subtilis*" en 1972 (Gordon, 1981). Phylogénétiquement, les bactéries du genre *Bacillus* appartiennent à la classe I du phylum Firmicutes, à la famille des *Bacillaceae* (Ludwig *et al.*, 2009). Selon la seconde édition de Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Vol. 3), la famille des *Bacillaceae* compte 19 genres (*Bacillus*, *Geobacillus*, *Halobacillus*, *Halolactibacillus*, *Paraliobacillus*, *Alkalibacillus*, *Amphibacillus*, *Anoxybacillus*, *Cerasibacillus*, *Filobacillus*, *Gracilibacillus*, *Lentibacillus*, *Marinococcus*, *Oceanobacillus*, *Pontibacillus*, *Saccharococcus*, *Tenuibacillus*, *Thalassobacillus* et *Virgibacillus*) (Abriouel *et al.*, 2014) et plus de 200 espèces (Logan et De Vos, 2009).

Le genre *Bacillus* comprend de nombreuses espèces de bactéries à Gram positives, en forme de bâtonnets qui sont capables de croître dans des conditions aérobies et anaérobies (ce qui les différencie des bactéries du genre *Clostridium* qui sont strictement anaérobies). Ce sont des bactéries en forme de bâtonnets, sporulantes, produisant de la catalase (Combet-Blanc *et al.*, 1995; Jenson, 2014). Les *Bacillus* se trouvent dans divers environnements tels que le sol et les argiles, les roches, les poussières, le milieu aquatique, la végétation, la nourriture et les voies gastro-intestinales de divers insectes et animaux (Nicholson, 2002).

Plusieurs espèces de *Bacillus* sont responsables de la dégradation des aliments et peuvent être pathogènes pour les humains et les animaux. Si *B. cereus* et *B. anthracis* sont considérés comme des pathogènes, toutefois la pathogénicité de *B. subtilis* et de *B. licheniformis* reste à prouver. Cependant, les maladies causées par *B. pumilus*, *B. thuringiensis* et *Brevibacillus brevis* ont été reportées (Jenson, 2014). La présence d'espèces de *Bacillus* dans les denrées alimentaires n'implique pas toujours la

détérioration ou l’empoisonnement, parce que certaines espèces sont même utilisées dans la production de certaines denrées alimentaires.

B. subtilis est utilisé comme starter dans la production de plusieurs aliments condiments africains :

- ⇒ la production de *dawadawa*, un condiment traditionnel de l’Afrique de l’Ouest obtenu à partir de la fermentation des graines de *Néré* ou *Parkia biglobosa* (Terlabie *et al.*, 2006);
- ⇒ du *Soumbala* (retrouvé au Burkina Faso) fabriqué à partir des graines de *néré* (Ouoba *et al.*, 2008; Parkouda *et al.*, 2009; Savadogo *et al.*, 2011),
- ⇒ de *Afitin*, de *Iru* et de *Sonru* (Bénin) fabriqué à partir des graines de *néré* (Azokpota *et al.*, 2006, 2008; Parkouda *et al.*, 2009; Amao *et al.*, 2013),
- ⇒ du *Bikalga* (Burkina Faso) produit à partir des graines d’*Hibiscus sabdariffa* (Ouoba *et al.*, 2007, 2008; Parkouda *et al.*, 2009; Compaoré *et al.*, 2013a, b),
- ⇒ de *Soydawadawa* (Ghana) obtenu à partir des graines de *néré* ou des graines de soja (Amoa-Awua *et al.*, 2006; Terlabie *et al.*, 2006).
- ⇒ du *Okpehe* (Nigeria) fabriqué à partir des graines de *Prosopis africana* (Oguntoyinbo *et al.*, 2007, 2010).

Dans d’autres régions du monde, on retrouve aussi ces aliments condiments produits à l’aide des souches de *Bacillus*. Elles sont utilisées dans la production de *Natto* et dans la préparation d’un met traditionnel fabriqué à base de riz et de soja au Japon (Claus, 1986; Priest, 1993; Hosoi et Kiuchi, 2003) et dans la production de *Kinema* (Népal, Inde) produits à partir des graines de *Glycine max* (Kiers *et al.*, 2000; Sarkar *et al.*, 2002; Dahal *et al.*, 2005).

Les espèces de *Bacillus* sont phénotypiquement et génotypiquement hétérogènes (Priest, 1993; Slepecky et Hemphill, 2006). D’où les différences observées pour ces différentes souches dans l’utilisation ou le métabolisme des substrats d’origine végétale et animale (cellulose, amidon, protéine, etc.) et même les hydrocarbures et les biocarburants (Lutz *et al.*, 2006). Cette diversité physiologique permet aux *Bacillus* de pouvoir coloniser diverses niches écologiques (Jensen *et al.*, 2003; Scheldeman *et al.*, 2005; Logan et De Vos, 2009; Abriouel *et al.*, 2011; Alvarez-Ordóñez *et al.*, 2014).

Selon Frankland & Frankland (Frankland et Frankland, 1887), le nom de *B. cereus* donné à ces bactéries vient de leur aspect cultural sur les milieux gélosés. La présence d’un ou de plusieurs plasmides extrachromosomaux est responsable des différences phénotypiques observées entre les différentes espèces de *B. cereus* (Tourasse et Kolstø, 2008). Les espèces de *B. cereus* se retrouvent dans diverses niches écologiques et sont souvent associées aux diverses pathologies d’où leur importance clinique

(Auger *et al.*, 2008). Par contre certaines espèces sont utilisées comme probiotique dans l'alimentation afin de réduire l'impact de *Salmonella* sur l'intestin animal (Jiménez *et al.*, 2013).

Les espèces de *Bacillus* produisent un ensemble de substances antimicrobiennes telles que les antibiotiques, les lipopeptides, les bactériocines (Stein, 2005; Abriouel *et al.*, 2011). La production de substances antimicrobiennes et la capacité à sporuler permettent aux *Bacillus* de vivre dans divers écosystèmes tels que les sols, les argiles, les roches, les poussières, le milieu aquatique, la végétation, la nourriture et le tractus gastro-intestinal de divers insectes et animaux (Abriouel *et al.*, 2011).

2.2. Bactéries à Gram négatives

Les bactériocines produites par les bactéries à Gram négatives ont été isolées pour la première fois en 1925 et sont majoritairement produites par les souches de *E. coli* (De Zamaroczy et Chauleau, 2011). Ces bactériocines sont séparées en deux groupes, celui des protéines de haut poids moléculaire appelé colicines, et celui des peptides de faible poids moléculaire, les microcines (Rebuffat, 2011). Le tableau IX donne quelques bactériocines produites par les bactéries à Gram négatives. On remarque que les espèces d'*E. coli* sont les espèces les plus productrices.

Tableau IX : Quelques Microcines et Colicines produites par les bacteries à Gram négatives

Microcine et Colicine	Bactérie productrice
Microcin J25	<i>Escherichia coli</i>
Microcine B17	<i>Escherichia coli</i>
Microcine H47	<i>Escherichia coli</i>
Microcine E492	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Colicine -V	<i>Escherichia coli</i>
Microcine-24	<i>Escherichia coli</i>
Microcine C7	<i>Escherichia coli</i>
Colicine-E1	<i>Escherichia coli</i>
Colicine-10	<i>Escherichia coli</i>
Colicine-N	<i>Escherichia coli</i>
Colicine-M	<i>Escherichia coli</i>
Colicine-Ia	<i>Escherichia coli</i>
Colicine-Ib	<i>Escherichia coli</i>

Source : BACTIBASE (<http://bactibase.pfba-lab-tun.org/bacteriocinslist.php?RecPerPage=ALL>)

Recherche de molécules bioactives d'origine microbienne : caractérisation biochimique et moléculaire des souches de bactéries isolées du Soumbala, du Bikalga et de certains yaourts consommés au Burkina Faso, productrices de bactériocines

2.3. Archées

En 1977, Woese et Fox découvrirent, chez les organismes méthanogènes d'organisation cellulaire procaryote, un nouveau type de profil d'ARNr 16S ne pouvant être assimilé ni à un profil bactérien, ni au ARNr 18S des eucaryotes (Woese et Fox, 1977). D'abord prénommé Archéobactéries, ce nouveau groupe d'organismes fut appelé Archées par Woese et Collaborateurs en 1990 lorsqu'ils proposèrent de classer les microorganismes en trois domaines : les bactéries, les eucaryotes et les Archées (Woese *et al.*, 1990; Oren, 2010).

Les Archées sont des procaryotes atypiques pouvant être subdivisés en deux groupes : le groupe vivant dans les conditions plus normales comme les Archées non cultivables du sol, des lacs et des océans et les méthanogènes de nos intestins et le second groupe renferme tous les Archées halophiles extrêmes vivant dans des conditions extrêmes du pH, de la température et de salinité (Kharroub, 2007). Les archées halophiles se retrouvent dans les lacs salés, les salines ou mares préparées pour l'évaporation de l'eau de mer conduisant à l'obtention de sel marin, dans les dépôts de sel du Permien et du Triasique, des mines de sel, les lacs hypersalés, les lacs natronés, les sols salés, le sable marin, dans les poissons et autres aliments conservés par le sel (Kharroub, 2007). Elles sont toutes halophiles et, pour la plupart, ne peuvent se développer qu'à des concentrations en NaCl supérieures à 1,5 M et la majorité des espèces a une croissance optimale à des concentrations variant de 3,5 à 4,5 M, et même proche de la saturation du NaCl (5,2 M) (Kharroub, 2007). De plus, certaines espèces exigent des pH élevés alors que d'autres des teneurs élevées en magnésium. Tous ces caractères expliquent leur adaptabilité à ces environnements très hostiles (Kharroub, 2007).

Les archées diffèrent des autres microorganismes sur plusieurs caractères : paroi cellulaire, lipides membranaires, RNA de transfert initiateur dans la synthèse protéique (méthionine contre la N-formylméthionine chez les bactéries), la structure du RNA polymérase, la structure du promoteur, résistances aux antibiotiques comme chloramphénicol, kanamycine et streptomycine, etc. (Oren, 2010). De plus, les Archées sont considérées comme non pathogènes (Cavicchioli *et al.*, 2003).

Le domaine des Archées est divisé en trois règnes :

- Le règne des Crenarchaeota regroupe les organismes les plus thermophiles, les Thermoproteales, les Pyrodictiales et les Sulfolobales métabolisant le soufre comme source d'énergie.
- Le règne des Korarchaeota renferme les organismes isolés de sources chaudes mais aucune souche n'a été isolée en culture pure.
- Le règne des Euryarchaeota ou Eocytes regroupe les phénotypes variés, les Thermococcales, les Methanococcales, les Methanobactériales et les Halobactériales.

3. DIFFÉRENTES MÉTHODES GÉNOTYPIQUES

Les méthodes génotypiques constituent l'ensemble des techniques moléculaires basées sur l'analyse de l'ADN. Elles permettent une meilleure différenciation des microorganismes à différents niveaux pouvant aller jusqu'à l'espèce et permettent même de disposer des séquences nucléotidiques conduisant ainsi à une meilleure connaissance des cellules. Mais l'inconvénient est qu'on doit au préalable disposer d'une banque de données afin de pouvoir mener une comparaison. De nos jours, les méthodes de typages basées sur l'ADN deviennent de plus en plus importantes dans l'identification des microorganismes. On peut citer le contenu en G+C, l'hybridation ADN-ADN, le RADP (Random Amplified Polymorphic DNA), l'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), l'ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis), le profil plasmidique, le ribotypage (ribotyping), la restriction de l'ADN génomique (genomic DNA restriction analysis), la *rep-PCR*, l'électrophorèse en champs pulsés de l'ADN chromosomique digéré et le séquençage. Le RADP, l'AFLP et l'ARDRA comportent une restriction enzymatique successive à une étape de PCR (Rodtong et Tannock, 1993).

3.1. Contenu en guanine et cytosine de l'ADN chromosomique

L'intérêt de la mesure du contenu en G+C (mol%) est liée à la grande diversité de la composition en guanine et en cytosine de l'ADN des microorganismes, puisqu'elle va de 25% pour *Mycoplasma capricolum* à 75% pour *Micrococcus luteus* (Muto et Osawa, 1987).

Avantages : On considère que deux isolats bactériens sont des espèces différentes si la différence de leur contenu en G+C est d'au moins 5%.

Inconvénient : La valeur de 5% ne prend pas en compte l'arrangement linéaire des nucléotides.

3.2. Hybridation ADN-ADN

Principe : L'hybridation ADN-ADN repose sur la dénaturation des ADN totaux appartenant à deux souches, puis à leur réappariement. La formation d'hétéroduplex (brin de chaque souche) sera gouvernée par le degré de ressemblance des deux génomes. Le pourcentage de réassociation hétérologues est ensuite calculé. La stabilité thermique est également un paramètre important car elle permet de mesurer le degré de mauvais réappariement au sein de l'hétéroduplex.

Avantage : Au-dessus de 70% d'homologie, les deux souches sont de la même espèce (Wayne *et al.*, 1987).

Inconvénient : Résultat influencé par le genre bactérien (Hassaine, 2013).

3.3. Amplification aléatoire d'ADN polymorphe

L'amplification aléatoire d'ADN polymorphe, plus connue sous le nom de RADP (Random Amplified Polymorphic DNA) a été introduite par Williams et Banks (1997).

Principe : Réaction de PCR dans laquelle les segments d'ADN amplifiés ne sont pas choisis par l'expérimentateur, mais amplifiés au hasard, en utilisant comme amorce un oligonucléotide d'une dizaine de bases. Afin de permettre l'hybridation de l'amorce à l'ADN cible, l'étape d'hybridation est réalisée sous des conditions limites de température de réappariement de l'ADN matrice. Il en résulte la génération de séquence d'amorces non spécifiques à l'espèce mais une empreinte spécifique à la souche.

Avantage : Adéquate en absence de données de séquences sur le génome de la souche; néanmoins, elle doit être particulièrement standardisée pour être reproductible (Tailliez *et al.*, 1998).

Inconvénient : La RAPD n'est pas appropriée pour la construction de données pour l'identification bactérienne (Hassaine, 2013).

Portée : Cette méthode a été utilisée avec succès pour identifier les souches de bactéries lactiques (Gancheva *et al.*, 1999; Yost et Nattress, 2000).

3.4. Analyse des fragments de restriction de l'ADN ribosomique amplifié (ARDRA)

Principe : C'est une technique combinant d'une part, la connaissance des séquences d'ARN ribosomique et leur amplification spécifique et d'autre part la caractérisation des souches avec leur profil de restriction. Ce type de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) a été nommé ARDRA par Vaneechoutte *et al.* (1992).

Avantages : Aucune information de séquence de l'ARN 16S amplifiée n'est nécessaire (Weidner *et al.*, 1996). L'ADN génomique total de la communauté microbienne est extrait sans cultiver les microorganismes participants. La présence de séquences universelles conservées aux extrémités 5' et 3' permet d'amplifier presque tous les fragments ARN 16S de l'ADN extrait. Le produit PCR peut donc être cloné et la bibliothèque de gènes ARN 16S résultante peut être testée par différentes méthodes. Une hybridation de colonies peut être utilisée moyennant des amorces spécifiques. Les inserts peuvent être amplifiés et caractérisés par une digestion restrictive. Alternativement, un séquençage à une ligne peut être fait pour permettre une détection de grande résolution (Ward *et al.*, 1990) suivi par un séquençage complet et une identification.

Portée : Cette méthode a été appliquée pour l'identification des bactéries lactiques isolées des vins et pour la différenciation entre sous-espèces de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* (Giraffa *et al.*, 1998; Rodas *et al.*, 2003).

3.5. Polymorphisme de longueur des fragments amplifiés (AFLP)

C'est l'un des outils les plus reproductibles permettant de discriminer les souches au niveau de l'espèce et intra-spécifique depuis son introduction par l'équipe de Vos en 1995 pour l'analyse des génomes des plantes (Vos *et al.*, 1995; Janssen *et al.*, 1996; Vancanneyt *et al.*, 2002). En effet, les variations dans les profils de bandes reflètent une relation génétique entre les souches bactériennes pouvant être analysées numériquement dans un but d'identification et de caractérisation (Janssen *et al.*, 1996).

Principe : Le principe se déroule en trois étapes qui sont :

- L'ADN génomique est coupé à l'aide de deux enzymes de restriction qui donnent des extrémités cohésives.
- Des adaptateurs d'une vingtaine de paires de bases ayant les extrémités cohésives correspondantes sont ligaturés aux fragments d'ADN coupés.
- Des amorces ciblant ces adaptateurs sont utilisées de manière à amplifier par PCR les fragments coupés. Ces amorces contiennent à l'extrémité 3' (lieu d'attachement de la polymérase) une, deux ou trois bases supplémentaires choisies au hasard, permettant d'effectuer une sélection parmi les fragments d'ADN disponibles lors de la PCR réalisée en conditions non astringentes.

Avantages : La technique peut évoluer en changeant les enzymes de restrictions, le nombre et la nature des bases supplémentaires accrochées à l'amorce. Une seule des amorces est marquée pour permettre la détection. Les fragments sont séparés par une électrophorèse en gel de polyacrylamide. Les profils sont révélés en fonction de la procédure de marquage utilisée (Janssen *et al.*, 1996; Aarts *et al.*, 1999).

3.6. Le profil plasmidique

La variation du nombre et de la taille des plasmides hébergés par des souches de la même espèce est utile pour typer les bactéries car la plupart des souches contiennent plusieurs plasmides (Hill et Hill, 1986; Holzapfel *et al.*, 2001). Cependant, cette méthode de typage est affectée par la capacité des souches à perdre ou à gagner des plasmides.

3.7. Electrophorèse en champs pulsés de l'ADN chromosomique digéré (Pulsed Field Gel Electrophoresis)

Cette technique est souvent considérée comme la meilleure des méthodes de typages moléculaires car elle a un pouvoir discriminatoire puissant et une plus grande reproductibilité (Tenover *et al.*, 1995). Cependant, cette méthode assez laborieuse nécessite une approche spécifique à chaque espèce (différentes enzymes de restriction et conditions d'électrophorèse). Elle est donc principalement utilisée pour étudier la diversité intra-spécifique et vérifier l'origine des souches (clonalité) (McCartney, 2002).

3.8. Repetitive extragenic palindromic-Polymerases Chain Reaction (rep-PCR)

Les séquences répétitives existent en multiples copies dans le génome de la plupart des bactéries à Gram négatives et à Gram positives (Lupski et Weinstock, 1992). Trois types de séquences répétitives ont été identifiées chez les bactéries : des séquences répétitives inversées REP (Sharples et Lloyd, 1990), des consensus entérobactériens à séquences répétitives intergéniques ERIC (Hulton *et al.*, 1991) et les éléments BOX (Versalovic et Lupski, 1998). Ces séquences sont localisées en orientation inverse dans des zones distinctes sur le chromosome bactérien. Ces séquences paraissent hautement conservées chez les souches apparentées et très distinctes entre les différentes espèces ou genres bactériens (Versalovic *et al.*, 1991, 1992).

L'amplification sélective des régions existant entre ces séquences conservées génèrent des amplicons de tailles variables qui seront séparés par électrophorèse sur gel d'agarose ensuite comparés aux profils des souches de référence (Heyndrickx *et al.*, 2007). Pour les bactéries lactiques l'amorce (GTG)₅ est considérée comme une très bonne approche pour le typage et l'identification de *Lactobacillus* et d'*Enterococcus* (Švec *et al.*, 2005).

3.9. Séquençage génétique de Sanger

Le séquençage génétique de Sanger est un moyen de déterminer l'ordre ou la succession des quatre nucléotides dans un brin d'ADN.

3.9.1. Principe de la méthode de SANGER

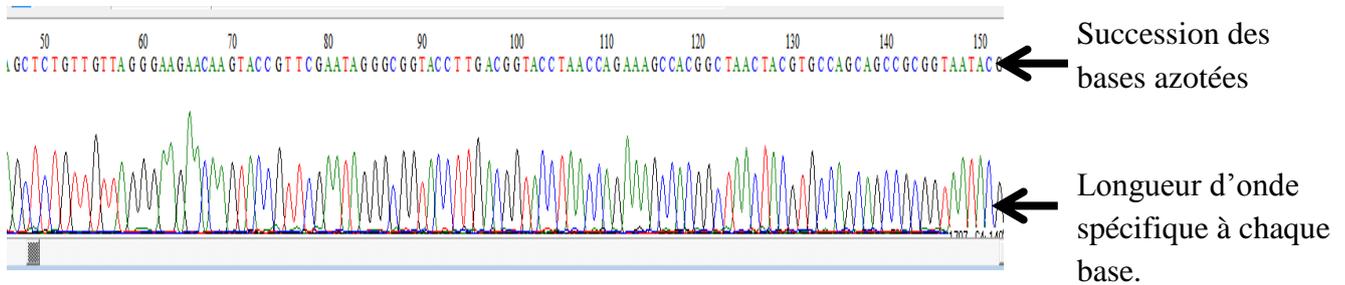
Le recopiage d'un brin matrice par une ADN polymérase ADN dépendante est initiée par la fixation d'un oligonucléotide spécifique (amorce), complémentaire du brin matrice. Cette ADN polymérase va permettre l'élongation d'un nouveau brin complémentaire du brin matrice dans le sens 5'-3'. L'ADN polymérase permet l'incorporation de nucléotides (dNTPs: déoxynucléotides triphosphates) libres présents dans le milieu réactionnel par la formation d'un pont phosphodiester entre le 3'OH de la chaîne et le 5'phosphate du dNTP suivant.

La réaction de Sanger repose sur l'incorporation alléatoire par cette ADN polymérase de didéoxynucléotides triphosphates (ddNTPs) eux aussi présents dans le milieu réactionnel. Ces ddNTPs diffèrent des dNTPs par leur extrémité 3'. L'extrémité 3'OH des dNTPs est remplacée par une extrémité 3'H. Cette modification empêche la formation de la liaison phosphodiester entre le ddNTP incorporé dans la chaîne et le nucléotide suivant. L'allongement de la chaîne est alors interrompu car il y a compétition entre les dNTPs et les ddNTPs. Le rapport spécifique ddNTP/dNTP et l'affinité de la taq pour chaque nucléotide sont optimisés de telle façon qu'un ddNTP soit statistiquement incorporé à toutes les positions possibles.

Une migration électrophorétique du produit de cette réaction de séquence sur un gel de polyacrylamide va séparer tous les fragments présents en fonction de leur taille. Les plus petits fragments vont migrer plus rapidement que les plus grands. La grande résolution du gel de polyacrylamide permet de distinguer des fragments différents entre eux d'une paire de base. L'identification du ddNTP présent à l'extrémité 3' de chaque fragment déterminera la séquence nucléotidique du brin matrice initial.

De nos jours des progrès technologiques et scientifiques ont permis d'apporter des améliorations à cette méthode afin de réduire la durée des réactions d'amplification et d'augmenter la qualité du service rendu grâce à l'incorporation de fluorophores (qui sont de petits composés chimiques dégageant des lumières colorées). En effet, en ajoutant un fluorophore coloré différent à chaque nucléotide, le séquençage peut être effectué en une seule réaction avec une seule colonne de gel pour représenter les

brins d'ADN ; la couleur de la bande indique la base située à l'extrémité du fragment d'ADN (Figure 11). Chaque fluorophore émet à une longueur d'onde bien définie.



Source : Chromatogramme obtenu lors du séquençage des souches de *Lactobacillus* utilisées dans cette étude.

Figure 11: Exemple de chromatogramme obtenu en incorporant les fluorophores dans les réactions de séquençage

Notons que chaque couleur correspond à une base azotée donnée.

3.9.2. Séquençage de l'ARNr 16S et son utilisation

La molécule de l'acide Ribonucléique ribosomal (ARNr) est considérée comme une horloge moléculaire à cause de sa présence et de sa haute stabilité à travers les espèces, d'où son utilisation dans la construction des arbres phylogéniques. L'alignement de séquences obtenues (1500 paires de bases) en utilisant les algorithmes adéquats permet d'identifier les différentes espèces bactériennes (Pot *et al.*, 2014). Les arbres phylogéniques encore appelés « arbre de vie » permettent d'établir les caractères anatomo-morphologiques c'est-à-dire faire une classification en règne, embranchement, ordre, famille, genre, espèce.

3.9.2.1. Principe général

Les séquences ribosomiques reflètent le génotype des bactéries car le séquençage direct du gène de l'ARNr 16S peut constituer un outil pour l'identification en une seule étape d'une souche inconnue ; toutefois, il existe quelques limites (Vandamme *et al.*, 1996a, b; Rossello-Mora et Amann, 2001). La stratégie de séquencer l'ARNr contenant des morceaux de régions variables et d'effectuer une analyse comparative de la séquence avec celle contenue dans les bases de données déjà existantes permet de

déterminer les régions présentant une variabilité. Ces régions variables sont utilisées pour la synthèse de sondes oligonucléotidiques ou d'amorces.

Bien que la région de l'ARNr 16S spécifique à l'espèce est localisée dans les régions V1 à V3, l'identification est plus précise si tout le gène est séquencé (Stackebrandt et Goebel, 1994). Dans certains cas l'analyse de séquence de la région entre les gènes 16S et 23S appelée ITS ou Intergenic Spacer Région a une expression beaucoup plus forte concernant la spécificité de l'espèce, que l'ARNr16S lui-même et souvent des espèces comme *Lb. plantarum*, *Lb. pentosus* et *Lb. pseudoplantarum* ou *Lb. casei* et *Lb. rhamnosus* peuvent être discriminées (Berthier et Ehrlich, 1998; Tannock *et al.*, 1999). D'autres gènes spécifiques au genre (Ke *et al.*, 1999) ou à l'espèce (Dutka-Malen *et al.*, 1995) ont été aussi séquencés.

3.9.2.2. Arbres phylogénétiques

Deux principales méthodes sont utilisées dans la construction des arbres phylogénétiques basés sur l'alignement des séquences :

- Méthodes basées sur les matrices de distances (Calcule les distances génétiques entre les paires de séquences et construction de l'arbre en se basant sur la matrice de distance).

Exemple : la méthode de neighbor-joining (= jonction successive et progressive des séquences ayant les faibles divergences).

L'avantage de ces méthodes est que seul un arbre est généré, basé sur le nombre de substitutions de nucléotides ou d'acides aminés entre séquences et les taxons sont reliés de façon à ce que la taille de l'arbre (longueur totale des branches) soit la plus petite possible.

- Méthodes basées sur les caractères évaluent tous les arbres possibles et cherche l'arbre qui optimise l'évolution. On en distingue la méthode du maximum de parcimonie et la méthode du maximum de vraisemblance.

L'inconvénient des méthodes basées sur les caractères est que plusieurs arbres peuvent rendre compte des relations phylogénétiques entre taxons.

3.9.2.3. Avantages de l'utilisation des séquences 16S rRNA

L'utilisation de séquences de gènes ARNr 16S pour étudier la phylogénie et la taxonomie bactérienne a été de loin le marqueur génétique le plus couramment utilisé pour un certain nombre de raisons: (i) sa présence dans presque toutes les bactéries, souvent existant comme une famille multigénique, ou opérons; (ii) la constance du gène ARNr 16S au fil du temps; et (iii) le gène ARNr 16S (1500 pb) est assez grand pour des fins informatiques (Janda et Abbott, 2007).

Plusieurs travaux ont montré que les différentes espèces de bactéries lactiques possèdent presque les mêmes séquences 16S rRNA (Yoon *et al.*, 2000; Cachat et Priest, 2005). Plusieurs bases de données (NCBI, GENE BANK, etc) contenant des séquences complètes et ou partielles ont été mises au point (Yarza *et al.*, 2008; Cole *et al.*, 2009). C'est fort de ce constat que les séquences du gène 16S rRNA sont considérées comme une épine dorsale pour la taxonomie moderne (Vandamme *et al.*, 2014).

L'usage des séquences de 16S rRNA a débuté dans les années 1980 et a permis de reclasser certaines espèces dans de nouvelles classes car les critères phénotypiques sont devenus insuffisants au fil des ans (Vandamme *et al.*, 2014), c'est pourquoi plusieurs taxons de bactéries lactiques ont été introduits (Holzapfel *et al.*, 2001).

Les applications de l'ARNr 16S en microbiologie sont :

- Le séquençage d'ARNr 16S du gène a été établi comme le «gold standard» pour l'identification et la classification taxonomique des espèces bactériennes.
- La comparaison de la séquence ARNr 16S bactérienne a été érigé comme une technique génétique précieuse pouvant conduire à la reconnaissance de nouveaux agents pathogènes et / ou non pathogènes.
- Les régions hypervariables de gènes ARNr 16S fournissent des signatures spécifiques aux espèces bactériennes, qui permettent une meilleure identification bactérienne.
- Dans la microbiologie médicale, le séquençage d'ARNr 16S sert comme une alternative rapide et pas cher à des méthodes phénotypiques dans l'identification bactérienne.
- Le séquençage du gène 16S rRNA d'une bactérie peut permettre de l'identifier comme une nouvelle espèce et de la reclasser dans un genre nouveau.
- Les techniques de séquençage peuvent être utilisées pour décrire de nouvelles espèces qui n'ont jamais été cultivées avec succès en laboratoire.

3.9.2.4.Limites de l'utilisation des séquences 16S rRNA

La très bonne conservation de 16S rRNA ne permet pas de faire une discrimination fiable entre les espèces et les sous-espèces (Pot *et al.*, 2014), pour les raisons suivantes :

- (i) La plupart du temps, une seule souche représentant l'espèce étudiée est utilisée. C'est pourquoi malgré la conservation de 16S rRNA, cette molécule n'est pas vraiment adaptée pour étudier les petites différences entre les espèces étroitement liées.
- (ii) De nos jours, une séquence courte ou longue de 16S rRNA est utilisable rendant les résultats obtenus peu fiables.
- (iii) Les erreurs survenues au cours du séquençage ou la présence de bases ambiguës dans les bases de références pourraient influencer la pertinence des arbres phylogénétiques construits. Dans ce cas il est conseillé d'utiliser la base de données SILVA (www.arb-silva.de).
- (iv) Les alignements de séquences, essentiels pour le calcul de similitude de séquences, sont très subjectifs. De plus, les alignements individuels peuvent varier en fonction de la sélection des souches lors des alignements multiples.
- (v) Après les alignements, plusieurs arbres peuvent être obtenus en fonction des méthodes de calcul employées.
- (vi) Le manque de variation (très peu) du gène 16S rRNA ne permet donc pas de pouvoir établir une relation efficiente entre les différents membres de l'arbre phylogénétique construit seulement sur la connaissance d'un seul gène.
- (vii) De plus l'absence de la séquence divergente du gène ARNr 16S pour refléter une phylogénie de précision, la préoccupation générale est que l'utilisation d'arbres d'un seul gène ne peut pas refléter de manière adéquate les relations phylogénétiques, en raison de différences observées dans les taux de mutation et la possibilité de transfert latéral de gènes, d'où l'intérêt manifesté ces dernières années pour la reconstruction de la phylogénie au moyen de séquences de gènes codant pour une protéine (Ueda *et al.*, 1999; den Bakker *et al.*, 2008).

CHAPITRE II : MATÉRIEL & MÉTHODES

1. Cadre et période d'étude

Le Centre de Recherche en Sciences Biologiques Alimentaires et Nutritionnelles (CRSBAN) du département de Biochimie et Microbiologie de l'UFR-SVT de l'Université Ouaga I Pr Joseph KIZERBO (Burkina Faso) et le Laboratoire de Biologie et de Typage Moléculaire en Microbiologie du département de Biochimie et Biologie Cellulaire de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey-Calavi (Bénin), ont servi de cadre pour cette étude.

Cette étude a été menée de Juin 2011 à Mai 2015.

2. Matériel biologique

Les souches bactériennes utilisées lors de cette étude ont été isolées à partir du *Soumbala*, du *Bikalga*, du lait fermenté et de yaourt local. Au total vingt deux souches bactériennes ont été utilisées. Le tableau X liste les souches bactériennes utilisées et leur provenance.

Tableau X: Origine de souches bactériennes utilisées lors de cette étude

Aliment	Souche bactérienne	Nombre
<i>Soumbala</i>	S2, S3, S4, S5	04
<i>Bikalga</i>	Bik1, Bik2, Bik3, Bik4, Bik5, Bik6, Bik7, Bik8	08
Lait fermenté	Lf1, Lf2, Lf3, Lf4, Lf5, Lf6	06
Yaourt local	Y1, Y3, Y5, Y6	04
		Total : 22

3. Méthodologie

3.1. Méthodes microbiologiques

3.1.1. Isolement des bactéries

Des dilutions de chaque échantillon du *Soumbala*, du *Bikalga*, du lait fermenté et de yaourt local ont été faites en utilisant l'eau physiologique stérile (NaCl à 9‰). Un volume de 0,1 ml des dilutions appropriées de chaque échantillon a été étalé sur des boîtes de Pétri contenant :

- le milieu PCA (Plate Count Agar) pour la recherche de la flore aérobie mésophile totale (FAMT),
- le milieu MRS (Man Rogosa Sharpe) pour la recherche des bactéries lactiques,

Toutes les boîtes ont été incubées pendant 48 heures à 37 °C.

Les 22 souches isolées ont étéensemencées par stries serrées sur milieu solide puis incubées à 37°C pendant 24 heures. Un repiquage successif en culture pure de toutes les colonies de types différents obtenues sur milieu solide a été réalisé jusqu'à obtenir des colonies pures uniformes.

3.1.2. Conservation des souches isolées

Chaque colonie obtenue sur gélose nutritive a été repiquée de manière stérile dans 1,5 ml de bouillon cœur- cervelle supplémenté de 15% de glycérol dans des cryotubes puis mis au frais à +4°C après une incubation de 24 heures en anaérobiose à 37°C.

3.1.3. Caractérisations morphologiques

3.1.3.1. Observation à l'état frais

Un aliquot de la suspension bactérienne jeune prélevée de façon stérile avec une pipette Pasteur a été déposée sur une lame propre porte objet de manière stérile. Cette préparation a été recouverte par une lamelle en prenant soin d'éviter la formation de bulles d'air. L'observation des cellules a été faite au microscope photonique au grossissement X40. Elle a consisté à noter leur forme, leur arrangement et leur mobilité.

3.1.3.2. Coloration de Gram

Les lames ayant servi à l'état frais ont été fixées à la chaleur. Le frottis préparé a été recouvert de cristal violet et laissé pendant une minute. L'eau a été ajoutée pour éliminer l'excès de colorant en veillant à ne pas détacher le frottis. Après, le frottis a été recouvert de quelques gouttes de lugol pendant 1 min, puis rincé à l'eau. L'alcool 70° a été ensuite ajouté au frottis goutte à goutte jusqu'à ce que le cristal violet disparaisse. Enfin, la safranine a été ajoutée au frottis puis laissé pendant 1 minute. La lame a été ensuite rincée à l'eau et séchée à l'air. Après avoir recouvert le frottis d'huile à immersion, la lame a été montée sur la platine puis l'objectif X100 choisi pour effectuer les observations. L'observation a consisté à noter la forme des cellules (forme longue ou forme sphérique) et à noter la coloration des cellules. Les cellules colorées en roses ou rouges sont considérées comme des bactéries à Gram négatives et les bactéries colorées en violettes ou bleues sont des bactéries à Gram positives (Madani, 2003).

3.1.4. Caractérisations biochimiques

3.1.4.1. Test à la catalase

Un aliquot de la suspension bactérienne a été transféré au moyen d'une pipette pasteur dans une goutte d'eau oxygénée déposée sur une lame. Une réaction positive se traduit par un dégagement de bulles d'air. La réaction sera notée comme négative s'il n'y a pas de bulles d'air.

3.1.4.2. Test de sporulation

La méthode de choc thermique a été utilisée. En effet, chaque tube renfermant 5 ml de culture jeune de chaque type de souche isolée a été mis au bain-marie à 100°C pendant 10 minutes. Un aliquote de chaque culture traitée a été prélevé et repiqué sur des tubes de milieu neuf. Ces tubes ont été ensuite incubés à 37°C afin de suivre leur croissance pendant 24 à 72 heures. S'il y a croissance la souche concernée est sporulante et s'il n'y a pas de croissance la souche ne sporule pas.

3.1.4.3. Test d'oxydase

Une goutte de suspension bactérienne à étudier a été déposée à l'aide d'une pipette Pasteur stérile sur un disque préimprégné du N-diméthylparaphénylenediamine. Si le papier demeure incolore au bout de quelques secondes la bactérie est alors oxydase négative par contre si le papier devient violet la bactérie est considérée comme oxydase positive (Kovacs, 1956).

3.1.4.4. Test d'urée, de l'O.N.P.G, d'indole et de production d'acétoïne

Les galeries Api 20E ont permis de réaliser ces différents tests selon les recommandations du fabricant (Biomérieux, France). L'introduction de la suspension bactérienne dans la cupule dissout les substrats déshydratés.

Le principe a consisté à introduire la suspension bactérienne dans chaque cupule à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, pointe appuyée à l'intérieur et sur le côté afin d'éviter la formation de bulles. Les tests d'urée et d'O.N.P.G sont des tests à réactions spontanées alors que les tests d'indole et d'acétoïne nécessitent l'addition de réactifs après incubation.

- Le test d'urée est considéré comme positif si la cupule vire au rouge. Si la cupule reste jaune la réaction est considérée comme négative.
- le test d'O.N.P.G. est positif s'il y a apparition de couleur jaune dans la cupule. Si la cupule est incolore, la réaction est négative.
- Si l'ajout d'une goutte de réactif JAMES ne fait pas virer la coloration incolore en rose, le test indole est négatif.
- Test acétoïne ou réaction de Vogues-Proskauer (VP) : Si après ajout de VP1 et VP2, il y a apparition de coloration rose ou rouge au bout de 15 min, la souche testée produit de l'acétoïne. (Clark et Lubs, 1915).

3.1.4.5. Fermentation des sucres et étude de la mobilité des souches

a) Fermentation du glucose et du lactose avec production de sulfure d'hydrogène et de gaz

Une suspension bactérienne de 20 heures a étéensemencée à l'aide d'une pipette Pasteur stérile sur le milieu Kligler Iron Agar (Voir annexe) par des stries sur la pente et par une piqûre centrale au culot. Ce milieu se présente en gélose inclinée. Les tubes n'ont pas été complètement serrés. L'incubation a été faite à 37°C pendant 24 heures.

- Si le culot est jaune, la bactérie utilise le glucose.
- Si la pente est jaune, la bactérie utilise le lactose.
- S'il y a noircissement au milieu du tube, la bactérie produit alors du sulfure d'hydrogène (H₂S).
- S'il y a présence d'une ou plusieurs poches (bulle) de gaz, la bactérie dégage des gaz.

b) Étude fermentaire de quelques sucres

L'étude fermentaire de quelques sucres a été réalisée grâce aux galeries Api20E selon les recommandations du fabricant (Biomérieux, France). Voir principe dans la section 3.1.4.4.

- Si après incubation, les cupules restent bleues, les réactions sont considérées comme négatives.
- Si après incubation, les cupules virent au jaune ; les souches sont considérées comme métabolisant ces divers sucres.

c) Étude de la mobilité des souches et utilisation du mannitol

Le milieu "Mannitol Motility Test Agar" se présente sous forme de gélose molle contenant du mannitol, du rouge de phénol et des nitrates (Voir annexe). Le milieu a été ensemencé par piqûre centrale unique, ce qui permet d'apprécier en plus de l'utilisation du mannitol, la mobilité du germe.

- Si le milieu prend une coloration jaune : la bactérie utilise le mannitol.
- Si le milieu reste rouge : la bactérie ne métabolise pas le mannitol.
- Si les bactéries sont mobiles, elles se dispersent à partir de la piqûre d'ensemencement créant un trouble dans le milieu, dans le cas contraire la bactérie est alors immobile.

3.1.5. Recherche des souches productrices de substances à activité antibactérienne

L'un des objectifs de cette étude est la mise en évidence de l'effet antagoniste des 22 souches par l'action des bactériocines contre *Micrococcus luteus* LMG 3293 (une cocci à Gram positive, catalase et oxydase positive). La méthode de diffusion sur gélose par les puits (Tagg *et al.*, 1976; Khay *et al.*, 2011) a été utilisée pour détecter les souches présentant une activité antibactérienne à l'encontre de *Micrococcus luteus* LMG 3293 (c'est une souche très sensible). Après 24 heures d'incubation, 10 ml de bouillon nutritif de chaque souche a été centrifugé à 6000 rpm pendant 15 minutes. Le surnageant a été recueilli et le pH ajusté à 6,5. Une culture de *Micrococcus luteus* LMG 3293 (10^6 UFC/ml, $DO_{650nm} = 0,03$) a été ensemencée par inondation sur boîte de Pétri contenant de la gélose nutritive. Quatre puits de diamètre 6 mm ont été réalisés sur chaque boîte de Pétri. Chaque puits a été rempli avec 50 μ l du surnageant de la culture bactérienne de 24 heures. Un puits témoin contenant du bouillon nutritif stérile a été réalisé. L'incubation a été faite à 37°C pendant 16 heures. Les zones d'inhibition matérialisées par

l'apparition de halos autour de chaque puits préalablement rempli de surnageant ont été mesurées puis la moyenne faite.

L'addition de NaOH 10N au surnageant obtenu après centrifugation à 6000 rpm pendant 15 minutes à la température ambiante de la suspension bactérienne de 24 heures d'une souche ; a permis d'éliminer les effets inhibiteurs des acides organiques notamment l'acide lactique et l'acide acétique et de ramener le potentiel d'hydrogène à 6,5.

3.2. Etude de l'influence du pH et de la température sur la croissance des souches appartenant au groupe des bactéries lactiques

L'étude cinétique a été principalement basée sur la détermination du pH optimal et de la température optimale de croissance des souches lactiques. La technique de microplaque de 96 puits a été utilisée. Une colonie de 24 heures de chaque souche a été repiquée de manière stérile dans 9 ml de solution physiologique stérile (NaCl 9‰) puis homogénéiser afin d'en faire l'inoculum.

3.2.1. Influence du pH sur la croissance des souches lactiques

Un volume de 0,5 ml d'inoculum de chaque souche a été introduit dans 4,5 ml de bouillon MRS stérile dans 6 tubes différents de pH respectif 5 ; 5,5 ; 6 ; 6,5 ; 7 et 7,5. Un volume de 200µl (10% v/v) de chaque tube a été introduit dans un puits de la microplaque de façon à éviter la formation de bulles d'air. Trois essais ont été effectués pour chaque tube. Un blanc a été réalisé avec 200 µl de bouillon MRS stérile.

La croissance a été suivie pendant 24 heures en mesurant à chaque heure la densité optique (DO) à 650 nm à l'aide d'un lecteur type µquant (Bio-tek instrument, N° série : 157904, USA) couplé à l'ordinateur intégré du logiciel KC junior.

3.2.2. Influence de la température sur la croissance des souches lactiques

Un volume de 0,5 ml d'inoculum de chaque souche a été introduit dans 4,5 ml de bouillon MRS stérile dans un tube dont le pH a été préalablement ajusté au pH optimal de croissance de la souche. Un volume de 200µl (10% v/v) de chaque tube a été introduit dans un puits de la microplaque de façon à éviter la formation de bulles d'air. Trois essais ont été effectués par souche par microplaque et 5 microplaques ont été utilisées. Une microplaque a été incubée à une température fixe. Les températures

d'incubation ont été : 25°C, 30°C, 37°C, 40°C et 44°C. Un blanc a été réalisé avec 200 µl de bouillon MRS stérile.

La croissance a été suivie pendant 24 heures en mesurant à chaque heure la densité optique (DO) à 650 nm à l'aide d'un lecteur type µquant (Bio-tek instrument, N° série : 157904, USA) couplé à l'ordinateur intégré du logiciel KC junior.

3.2.3. Technique de détermination de taux de croissance, du pH optimal et de la température optimale

La différence entre la densité optique de la culture (**DO_{culture}**) et la densité optique du témoin (**DO_{témoin}**) a donné la densité optique réelle (**DO_{réelle}**) de la culture selon la relation suivante :

$$\mathbf{DO_{réelle} = DO_{culture} - DO_{témoin} .}$$

Les valeurs des **DO_{réelle}** de chaque souche à pH différent et à différente température pendant 24 heures ont été utilisées pour tracer la courbe de tendance. Le tracé de la courbe de tendance définie par $\log_{10} (DO'/DO)$ en fonction du temps a permis de déterminer le taux de croissance maximale (μ_{\max}) selon la relation suivante : **$\log_{10} (DO'/DO) = \mu_{\max} .t + K$**

DO = la valeur de la densité optique en début de la phase exponentielle de croissance

DO' = la valeur de la densité optique à l'instant **t** durant la phase exponentielle de croissance.

K = correspond à une constante

Pour déterminer le pH optimal de croissance ou la température optimale de croissance de chaque souche ; on a tracé respectivement la courbe μ_{\max} en fonction du pH et la courbe μ_{\max} en fonction de la température.

3.3. Méthodes de Biologie moléculaire

3.3.1. Extraction et purification d'ADN génomique des Bacilles à Gram positifs

Cette étape a été réalisée en utilisant le QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, France) en suivant les recommandations du fabricant.

Une culture bactérienne de 1ml a été centrifugée à 5000g pendant 10 minutes puis le surnageant jeté. Un tampon de lyse de 180 µl (20 mg/ml lysozyme ; 20 mM Tris·HCl, pH 8,0 ; 2 mM EDTA ; 1,2% Triton) a été ajouté au culot en aspirant/refoulant plusieurs fois afin d'affaiblir la paroi bactérienne pour que la lyse soit totale. Le mélange réactionnel a été incubé à 37°C dans un bain-marie pendant 2heures30 minutes, puis 20 µl de protéinase K et 200 µl de tampon AL (QIAGEN, France) ont ensuite été ajoutés au mélange, et le mélange a été mixé par vortex et incubé respectivement à 56°C/30 minutes puis à 95°C/15 minutes. Après, un volume de 200 µl d'éthanol absolu a été ajouté au mélange et mixer par pulse-vortex pendant quelques secondes. Le mélange a été transvasé dans QiAamp Mini Spin Column de 2 ml (QIAGEN, France) en prenant soin de ne pas mouiller/toucher les bords, puis fermer le couvercle et centrifuger à 6000g pendant 1 minute. Le filtrat a été éliminé. L'ADN a été lavé successivement par 500µl de tampon AW1 (6000g/1 minute) et 500µl de tampon AW2 (20000g/3min et 28000g/1min). Un volume de 200µl de tampon d'élution AE (QiAAGEN, France) a été ajouté et le mélange a été incubé à la température ambiante pendant 5min. L'éluat contenant le génome extrait a été obtenu après centrifugation à 6000g/1 minute. L'éluat a été conservé à -20 °C.

3.3.2. Extraction et purification d'ADN génomique des Cocci à Gram positifs

Une suspension bactérienne de 1ml a été centrifugée à 5000g pendant 2 minutes. Un volume de 180 µl de tampon de lyse ATL (QIAGEN, France) a été ajouté au culot en aspirant et en refoulant plusieurs fois (le but de cette étape est d'affaiblir la paroi cellulaire de sorte que la lyse cellulaire puisse avoir lieu). Le mélange a été incubé à 37°C pendant 2heures30 minutes, et un volume de 20 µl de protéinase K et de 200 µl de tampon AL (QIAGEN, France) ont été ajoutés au mélange puis le mélange a été mixé par vortex et incubé de nouveau à 56°C pendant 30 minutes puis 15 min à 95°C. Ensuite, le « Protocole d'extraction et purification d'ADN génomique des bacilles à Gram positifs » à partir de l'étape de l'ajout de l'éthanol a été suivi. Tous les extraits ont été stockés à - 20 °C.

3.3.3. Dosage de l'ADN extrait

La densité optique de chaque extrait a été lue respectivement à 260nm et à 280nm avec le lecteur type μ quant (Bio-tek instrument, N° Série : 157904, USA) couplé à l'ordinateur intégré du logiciel KC junior. La qualité de chaque extrait a été évaluée en utilisant le rapport $\frac{DO_{260nm}}{DO_{280nm}}$.

L'ADN est considéré comme contaminé par de l'ARN ou des protéines si le rapport est respectivement supérieur à 2 ou inférieur à 1,8. L'ADN est considéré comme pur si le rapport est compris entre 1,8 et 2.

La concentration de l'ADN, exprimée en $\mu\text{g/ml}$, a été calculée en multipliant la DO_{260nm} par $50\mu\text{g/ml}$.

3.3.4. Amplification de l'ADN par PCR

3.3.4.1. Composition des mélanges réactionnels de la PCR

Le milieu réactionnel est constitué de $30\mu\text{l}$ de Master Mix (QiAgen, France), $4\mu\text{l}$ de chaque amorce sens et antisens, $8\mu\text{l}$ d'eau milliQ et $4\mu\text{l}$ de l'ADN extrait. Toutes les amorces utilisées lors de cette étude ont été fournies par Eurofins MWG Operon (Allemagne). Un témoin négatif et un témoin positif ont été réalisés.

3.3.4.2. Amorces utilisées

Toutes les amorces utilisées lors de cette étude sont listées dans le tableau XI.

Tableau XI: Liste des amorces utilisées

Amorce	Séquence de l'amorce (5' → 3')	Taille (bp) attendue	Genre recherché	Référence
LbF LbR	GGAATCTTCCACAATGGACG CGCTTTACGCCAATAAATCCGG	216	<i>Lactobacillus</i> sp.	(Bakar <i>et al.</i> , 2010)
LcF LcR	CTTTGAGTGATGCAATTGCAT C CACCGCTACACATGGAG	<1000*	<i>Lactococcus</i> sp.	(Ampe <i>et al.</i> , 1999; Savadogo <i>et al.</i> , 2004b)
PedF PedR	GTAAAGTGGCGTGTGTACCTCAAG CACCGCTACACATGGAG	<1000*	<i>Pédiococcus</i> sp.	(Ampe <i>et al.</i> , 1999; Savadogo <i>et al.</i> , 2004b)
B-K1/F B-K1/R1	TCACCAAGGCACGATGCG CGTATTCACCGCGGCATG	1114	<i>Bacillus</i> , <i>Paenibacillus</i> , <i>Brevibacillus</i>	(Wu <i>et al.</i> , 2006; Savadogo <i>et al.</i> , 2011)
Bsub5F Bsub3R	AAGTCGAGCGGACAGATGG CCAGTTTCCAATGACCCTCCCC	595	Groupe de <i>B.</i> <i>Subtilis</i> (<i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B.</i> <i>amyloliquefaciens</i> , <i>B. pumilus</i>)	(Wattiau <i>et al.</i> , 2001; Savadogo <i>et al.</i> , 2011)
Ba1F Ba1R	TGCAACTGTATTAGCACAAGCT TACCACGAAGTTTGTTCACTACT	533	Groupe de <i>B.</i> <i>cereus</i> (gène <i>groEL</i>)	(Chang <i>et al.</i> , 2003; Savadogo <i>et al.</i> , 2011)
BacF BacR	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAG CTACGGCTACCTTGTTACGA	1000-1500*	Bactéries productrices de bactériocines	(Diop <i>et al.</i> , 2008)

ND : Non déterminé ; * : Cette étude

3.3.4.3. Réactions d'amplifications

Ces réactions ont consistées à amplifier c'est-à-dire multiplier le matériel génétique (par un facteur de 2^n , n = nombre de cycles) disponible dans le milieu réactionnel grâce à l'utilisation des amorces sens et antisens spécifiques (Tableau XI) à une région spécifique au DNA. Les paramètres d'amplifications utilisés sont présentés dans le tableau XII.

Tableau XII : Programmes PCR

Amorces	Dénaturation initiale	30 cycles			Élongation finale
		Dénaturation	Hybridation	Élongation	
LbF et LbR	94°C pendant 5 minutes	94°C pendant 45 secondes	60°C pendant 45 secondes	72°C pendant 1 minute	72°C pendant 10 minutes
LcF et LcR	94°C pendant 5 minutes	94°C pendant 45 secondes	53°C pendant 45 secondes,	72°C pendant 1 minute	72°C pendant 10 minutes
PedF et PedR	94°C pendant 5 minutes	94°C pendant 45 secondes	58°C pendant 45 secondes,	72°C pendant 1 minute	72°C pendant 10 minutes
B-K1/F et B-K1/R	94°C pendant 5 minutes	94°C pendant 45 secondes	55°C pendant 45 secondes	72°C pendant 1 minute	72°C pendant 10 minutes
Bsub5F et Bsub3R	94°C pendant 5 minutes	94°C pendant 45 secondes	60°C pendant 45 secondes	72°C pendant 1 minute	72°C pendant 10 minutes
Ba1F et Ba1R	94°C pendant 5 minutes	94°C pendant 45 secondes	58°C pendant 45 secondes	72°C pendant 1 minute	72°C pendant 10 minutes
BacF et BacR	94°C pendant 5 minutes	94°C pendant 45 secondes	56°C pendant 45 secondes	72°C pendant 1 minute	72°C pendant 10 minutes

Tous les amplicons ont été stockés à +4°C

3.3.4.4. Électrophorèse des produits PCR sur gel d'agarose

a) Préparation du gel d'agarose 1,5%

Le gel a été préparé en mettant 1,5 g d'agarose dans 100 ml de tampon TBE 0,5X dans un erlenmeyer de 250 ml. La solution a été chauffée dans un four microonde jusqu'à dissolution complète de l'agarose, puis laissée à température ambiante pour se refroidir avant d'y ajouter 5 µl de solution de bromure d'éthidium à 10 mg/ml. Le gel a été coulé ensuite dans une cuve horizontale en prenant soin d'y mettre les peignes et a été laissé à température ambiante pour solidification.

b) Électrophorèse et révélation

Après avoir retiré les peignes et les cales, la cuve a été remplie avec 100 ml de tampon TBE 0,5X, et les puits avec 10µl d'amplicons. Le GelPilot® DNA Molecular Weight Markers (QIAGEN, France) a été déposé dans le premier puits afin de pouvoir déterminer la taille des amplicons. Le GelPilot DNA Loading Dye 5x (QiAgen, France) a été utilisé comme tampon de charge ou allourdeur. Après 1 heure de migration sous 150V et 50mA, le gel a été visualisé sous lumière ultraviolette puis photographié. Un résultat positif est matérialisé par la présence de bandes.

3.4. Séquençage

3.4.1. Purification des produits PCR

La purification des produits PCR a consisté à éliminer les différents composants du mélange réactionnel (enzyme, tampon, dNTPs, amorces, et autres impuretés). Le kit Wizard^R SV Gel and PCR Clean-up System (Promega, USA) a été utilisé. Quatre étapes ont été nécessaires pour obtenir des produits purs. Ce sont : la dissolution du gel d'agarose, la fixation, le lavage et l'élution des produits d'intérêt.

3.4.1.1. Dissolution du gel d'agarose

- Peser (m_0) un microtube vide de centrifugation.
- Exciser/couper le gel contenant le fragment d'intérêt à insérer pour mettre dans le microtube de centrifugation. Faire une nouvelle pesée (m_1). Calculer la masse du gel en utilisant la formule suivante : **Masse du gel = $m_1 - m_0$**
- Ajouter 10 μ l de Membrane Binding Solution (Promega, USA) pour 10 mg de gel d'agarose.
- Vortexer le mélange puis incuber entre 50 et 65°C jusqu'à dissolution complète du gel (vortexer de temps en temps).
- Centrifuger brièvement à température ambiante après dissolution complète.

3.4.1.2. Fixation du DNA

- Placer un SV Minicolumn (Promega, USA) dans un tube de collection (Promega, USA).
- Transférer le mélange (gel + DNA) dans le Minicolumn.
- Incuber à la température ambiante (température de la salle)/1min.
- Centrifuger à 16000g pendant 1min. Éliminer le filtrat.

3.4.1.3. Lavage

- Laver la membrane par ajout de 700 μ l de Membrane Wash Solution (Promega, USA) au Minicolumn. Centrifuger à 16000g pendant 1min. Éliminer le filtrat.
- Ajouter encore 500 μ l de Membrane Wash Solution.
- Centrifuger à 16000g pendant 5min.
- Éliminer le filtrat.
- Centrifuger à 16000g pendant 1min afin que l'excès d'éthanol s'évapore.

3.4.1.4. Elution

- Transférer Minicolumn dans un microtube stérile.
- Ajouter 50µl de Nuclease-Free Water (Promega, USA).
- Incuber pendant 1 min à la température ambiante.
- Centrifuger à 16000g pendant 1min.
- Éliminer Minicolumn et stocker l'éluat (fragment DNA d'intérêt) à 4°C/-20°C.
- Volume de fragment d'intérêt est d'environ 42 – 47 µl.

3.4.2. Les réactions de séquençage

Le séquençage d'ADN a été réalisé par la société GENOSCREEN (Lille, France). En effet, les produits PCR purifiés obtenus lors de l'utilisation des amorces LbF et LbR et BacF et BacR ont été envoyés à la société GENOSCREEN pour séquençage. Pour le séquençage les amorces LbF et BacF ont été utilisées.

Les étapes suivantes ont été utilisées par la société :

- Constitution du milieu réactionnel
- Etape de dénaturation
- Préparation de la détection automatique de séquence
- Séquençage sur séquenceur 3730XL.
- Collecte (Data collection) et analyse des données

Les résultats obtenus ont été envoyés sous forme de chromatogrammes (.abi files) et des séquences au format fasta.

3.4.3. Traitement des séquences

L'interprétation logicielle des chromatogrammes a été vérifiée manuellement en utilisant les logiciels FinchTV version 1.4.0 et BioEdit version 7.2.5 et les logiciels en ligne comme SILVA (<http://www.arb-silva.de/aligner/>), Greengenes (http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-trim_fasta_by_qual.cgi) et Uchime (http://drive5.com/usearch/manual/uchime_algo.html) afin de réperer les bases ambiguës et chimériques. Toute base de qualité supérieure ou égale à 20 a été retenue.

3.4.4. Alignement des séquences et recherche des différents opérons de plantaricines

Des alignements consécutifs des séquences nucléotidiques partielles ont été effectués en utilisant l'algorithme BLASTn de NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) dans le but d'évaluer leur degré d'homologie avec les séquences disponibles et de pouvoir ainsi les identifier. Les paramètres d'alignement suggérés par Ladunga (2009) ont été utilisés. Une souche sera identifiée au niveau espèce si sa séquence partielle présente une homologie supérieure à 95%. Si cette homologie est inférieure à 95%, elle sera identifiée au stade genre.

La recherche des différents opérons de plantaricines a été effectué en utilisant deux bases de données que sont BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Baxevanis, 2011; Gibney et Baxevanis, 2011) et Bagel3 (<http://bagel.molgenrug.nl/index.php/bagel3>) (van Heel *et al.*, 2013).

3.5. Analyses statistiques des données chiffrées

Les données chiffrées ont été analysées en utilisant le logiciel XLSTAT 2015.3.01.19349 avec un seuil de probabilité de 0,05. Les moyennes des différences ont été comparées en utilisant le test de Fisher.

CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSION

Partie I : Caractérisation des souches de bactéries lactiques productrices de substances bioactives isolées à partir d'aliments fermentés

1. Caractères morphologiques des souches étudiées

Les aspects macroscopiques (Figure 12), microscopiques et les tests de sporulation ont permis de classer les 22 souches utilisées lors de cette étude en deux groupes distincts (Tableau XIII) : le groupe 1 ou le groupe des bactéries non sporulantes et le groupe 2 ou le groupe des bactéries sporulantes.

Tableau XIII : Caractéristiques morphologiques des souches utilisées lors de cette étude

	Souche	Forme	Regroupement	Mobilité	Gram	Sporulation
Groupe 1	S3, S4, Y6	Bacille	Chaînette	-	+	-
	Lf1		Isolé	-	+	-
	S2, S5, Y1, Y3, Y5	Cocci	Paire	-	+	-
Groupe 2	Bik1, Bik2, Bik3, Bacille	Chaînette		+	+	+
	Bik4, Bik5, Bik6, Bik7, Bik8, Lf2, Lf3, Lf5, Lf6, Lf4	Bacille	Paire	+	+	+

Légende : - : Réaction négative

+ : Réaction positive

La partie I traitera des bactéries du groupe 1. Les bactéries sporulantes seront abordées dans la partie II.

2. Caractères morphologiques des bactéries du groupe 1

Les caractères morphologiques ont consisté à observer les colonies sur milieu gélosé. Les colonies formées par les 9 bactéries du groupe 1 sont de forme sphérique, de couleur blanchâtre et de diamètre variant de 0,5mm à 7mm.

La figure 12 montre les colonies formées par la souche Y3 sur milieu gélosé.



Figure 12 : Aspect des colonies de la souche Y3 sur PCA

L'étude microscopique des souches du groupe 1 a permis de les classer en 2 sous-groupes d'après leur forme : les bactéries de forme bacillaire ou en bâtonnet (4 souches) et le sous-groupe des bactéries de forme sphérique ou coccoïde (5 souches). Du point de vue mode de regroupement les souches de forme coccoïde forment des paires. Trois (3) souches de forme bacillaire forment des chaînettes contre seulement une souche dont les cellules sont isolées (Tableau XIII). Les 9 souches sont immobiles et sont des Gram positives ; deux caractéristiques propres aux bactéries lactiques qui fermentent les sucres avec production d'acide lactique. Elles sont catalase et oxydase négatives.

3. Caractéristiques biochimiques des bactéries du groupe 1

Les caractéristiques biochimiques des bactéries du groupe 1 sont répertoriées dans le tableau XIV. Toutes les souches sont catalase et oxydase négatives. Elles sont toutes des bactéries à Gram positives.

Tableau XIV: Caractéristiques biochimiques et utilisation des sucres par les souches lactiques

Caractéristique	Souche								
	S2	S3	S4	S5	Y1	Y3	Y5	Y6	Lf1
Caractéristiques biochimiques									
Mobile	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxydase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Spore	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H₂S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urée	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Gaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ONPG	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Citrate	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Utilisation/Fermentation des sucres									
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	+	-	+	-	-
Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	-	-	-	-	+	+	+	+	-
Inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rhamnose	-	-	-	-	+	+	+	+	-
Melibiose	-	+	-	-	-	+	+	-	+
Arabinose	-	-	-	-	+	+	+	-	-
Espèce suspectée	<i>Lc. sp.</i>	<i>Lb. sp.</i>	<i>Lb. sp.</i>	<i>Lc. sp.</i>	<i>Lc. sp.</i>	<i>Lc. sp.</i>	<i>Lc. sp.</i>	<i>Lb. sp.</i>	<i>Lb. sp.</i>

+ : réaction positive ; - : réaction négative ; H₂S : sulfure d'hydrogène ; VP : réaction de Vogues-Proskauer ; ONPG : Ortho Nitro Phényl Galactopyranoside ; *Lc. sp.* = Genre *Lactococcus* ; *Lb. sp.* = Genre *Lactobacillus*

Sporulation : La capacité des souches obtenues à former des spores a été testée par la méthode de choc thermique. Après 72 heures d'incubation aucune souche n'a donnée de résultats positifs au test (Tableau XIV). Les bactéries lactiques dans leur majorité ne forment pas de spores mais cependant arrivent à vivre dans des conditions extrêmes (épuisement du milieu en éléments nutritifs, température élevée ou très basse, variation de la concentration en sel, etc.) en développant des systèmes de protection efficace leur permettant d'éviter la mort après arrêt de leur croissance. L'hyperosmolarité en sel (NaCl ou KCl) par exemple dans le milieu environnant conduit les bactéries lactiques à répondre au stress osmotique par accumulation de solutés tels que la bétaïne et la glycine (Glaasker *et al.*, 1998) ou en synthétisant des solutés compatibles. Les bactéries lactiques libèrent ces solutés lorsque le milieu environnant devient hypotonique. Ainsi les métabolites synthétisés au cours de la croissance microbienne jouent le rôle de balance osmotique, de protection contre les températures extrêmes, au cours des congélations et décongélations et au cours des processus drastiques industriels comme la lyophilisation mais aussi stabilisent les enzymes (van de Guchte *et al.*, 2002).

Production de gaz et de sulfure d'hydrogène : Sur le milieu semi-solide Kliger Iron aucune souche n'a présenté de bulles ou poches de gaz ni un noircissement dû à la formation du sulfure de fer par la production de sulfure d'hydrogène. Ces résultats nous permettent de conclure qu'aucune des 9 souches ne produit ni de gaz ni de sulfure d'hydrogène au cours de la fermentation du glucose (Tableau XIV). Les bactéries lactiques ne produisent pas de sulfure d'hydrogène. Parmi les bacilles à Gram positifs et à catalase négative, la production de sulfure d'hydrogène permet de distinguer les *Lactobacillus* (H_2S^-) des *Erysipelothrix* (H_2S^+). Ainsi les bacilles à Gram positifs isolés dans cette étude appartiendraient probablement au genre *Lactobacillus* et ne seraient donc pas des entérobactéries car la majorité de ces microorganismes produisent le sulfure d'hydrogène lors du processus fermentaire. Au sein du genre *Lactobacillus* certaines souches produisent du gaz (soit CO_2 , soit H_2 , soit les deux) au cours des processus fermentaires des sucres.

Production d'acétoïne : Seules les souches S2 et S3, isolées à partir de *Soumbala*, ne produisent pas d'acétoïne d'après les résultats obtenus en réalisant le test de VP ou la réaction de Vogues-Proskauer (Tableau XIV). L'acétoïne est une molécule synthétisée par les bactéries lactiques qui participe à l'aromatisation des aliments. Son principal précurseur est l'acide citrique. En effet, l'acétoïne est l'un des composés intermédiaires volatiles synthétisé par les bactéries lactiques lors de la fermentation du lactose. Ces composés intermédiaires comme l'acétoïne, l'acétaldéhyde, le diacétyl et les lactones sont responsables des saveurs et arômes retrouvés chez les produits laitiers. Ainsi donc ce test nous permet d'évaluer la capacité de nos souches à produire ce métabolite, qui participe aux propriétés que présentent les produits laitiers et autres. Ces résultats nous permettent de conclure que les souches S4, S5, Y1, Y3, Y5, Y6 et Lf1 synthétisent l'acétoïne. De plus il ressort de ce test que les bactéries lactiques produisent

l'acétoïne non seulement en fermentant le lactose mais aussi d'autres sucres : c'est le cas des souches S4 et S5, isolées à partir de *Soumbala*, un produit non laitier. En effet, les bactéries lactiques ont évolué en s'adaptant à leur milieu de vie en conformant leur génome par perte ou apport de gènes. En 2009, O'Sullivan et Collaborateurs (O'sullivan *et al.*, 2009) ont étudié le génome de 11 bactéries lactiques provenant de diverses niches écologiques. Leurs études ont montré des gènes spécifiques aux niches : des gènes de protéolyse et des endonucléases chez les bactéries lactiques vivant dans les produits laitiers ; des gènes de résistances aux sécrétions biliaires et des gènes responsables du métabolisme des sucres chez les bactéries lactiques isolées dans le tractus gastro-intestinal. De plus en 2010, Kelly et Collaborateurs ont comparé le génome des espèces de *Lactococcus lactis* isolées à partir de produits laitiers et autres produits non-laitiers. Leurs résultats ont montré que les espèces de *Lactococcus lactis* isolées à partir de plantes pour pouvoir croître sur un milieu laitier doivent s'adapter en courtant leur chromosome et en acquérant des gènes pouvant faciliter leur survie sur ce nouveau milieu (Kelly *et al.*, 2010). D'autres travaux ont été menés pour montrer la relation entre l'origine et les caractéristiques phénotypiques chez *Lactococcus lactis* (Cai *et al.*, 2009; Gutiérrez-Méndez *et al.*, 2010).

Dégradation de l'urée : Si la bactérie possède une uréase et hydrolyse l'urée contenue dans le milieu, la production d'ammoniaque (NH₃) alcalinise le milieu et fait virer l'indicateur au rouge violacé. Aucune de ces observations n'a été faite pour les 9 souches donc les souches retenues pour cette étude ne produisent pas d'urée (Tableau XIV).

O.N.P.G : L'existence d'une bêtagalactosidase chez la bactérie lui confère la possibilité de fermenter effectivement le lactose indépendamment de la perméase bactérienne. En effet, la bêtagalactosidase hydrolyse le lactose en glucose et galactose. C'est une enzyme intracellulaire qui n'agit sur le lactose que si ce dernier pénètre à l'intérieur de la cellule. De plus, elle n'est inductible que si la bactérie est cultivée en présence de lactose. Le réactif Ortho Nitro Phényl Galactopyranoside (O.N.P.G) est utilisé pour détecter la présence de cette enzyme chez une bactérie. Après 24 heures d'incubation, les cupules de 5 sur 9 souches sont colorées en jaune. Ainsi seules les souches Y1, Y3, Y5, Y6 et Lf1 possèdent cette enzyme (Tableau XIV). Ces souches sont isolées respectivement à partir du yaourt (Y1, Y3, Y5 et Y6) et de lait fermenté (Lf1) ; deux milieux riches en lactose. Dans ces produits laitiers le lactose représente la majorité des sucres. Toutes les 4 souches (S2, S3, S4 et S5) isolées de *Soumbala* sont dépourvues de la bêtagalactosidase. Ces résultats montrent que les bactéries lactiques s'adaptent à leur milieu en fonction des nutriments disponibles en conformant leur chaîne respiratoire. La détection de la bêtagalactosidase chez certaines de nos souches permettra de les utiliser comme ferments soit sur des milieux riches en lactose soit sur des milieux qui en sont dépourvus.

Utilisation des sucres par les souches : La présence d'un sucre dans le milieu peut entraîner l'arrêt de la synthèse de nombreuses enzymes appartenant généralement à plusieurs opérons cataboliques. Cette répression est responsable de la diauxie observée chez certaines bactéries lorsqu'elles sont cultivées en présence du glucose et du lactose. En effet, lorsque le microorganisme est en présence d'un mélange de glucose et lactose ; le glucose régule la synthèse des enzymes dégradant le lactose. Le lactose ne pourra alors être utilisé comme source d'énergie qu'une fois le glucose épuisé dans le milieu. Dans cette étude, les 9 souches ont été testées pour leur capacité à utiliser le glucose et le lactose par le milieu Kliger Iron Agar. Toutes les 9 souches fermentent le glucose, le saccharose, l'inositol et le sorbitol, 4 souches (Y1, Y3, Y5, Y6) utilisent le mannitol et le rhamnose, 4 souches (S3, Y3, Y5, Lf1) métabolisent le melibiose et 3 souches (Y1, Y3, Y5) utilisent l'arabinose (tableau XIV). On note que seules 2 souches (Y1 et Y5) fermentent le lactose. Ainsi 2 souches (Y1 et Y5) sur 5 (Y1, Y3, Y5, Y6 et Lf1) isolées à partir de produits laitiers utilisent le lactose. Dans les produits laitiers le lactose, un diholoside formé de glucose et galactose ; demeure le sucre majoritaire. Sa fermentation avec production d'acides organiques (acides lactiques et acétiques) et des arômes tels que l'acétoïne par les bactéries lactiques confère aux produits laitiers des caractéristiques organoleptiques exceptionnelles. Il ressort alors de cette étude que toutes les souches lactiques de forme bacillaire (S3, S4, Y6, Lf1) métabolisent le glucose et le saccharose et pas le lactose. Notons que parmi les *Lactobacillus*, seules quelques espèces telles que *Lb. lactis*, *Lb. caucasicus*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. casei*, *Lb. plantarum* fermentent (fermentation homolactique) en général le glucose, le saccharose et le lactose. Parmi les 5 souches de *Lactococcus* seules 2 (souches Y1 et Y5) fermentent à la fois le glucose, le lactose et le saccharose. Donc ce sont les seules espèces capables de réaliser le phénomène de diauxie.

4. Activité antimicrobienne des substances produites par les souches de bactéries lactiques

Les différents diamètres d'inhibition relevés pour les 9 souches de bactéries lactiques suspectées à l'encontre de *Micrococcus luteus* LMG 3293 sont reportés dans le tableau XV.

Tableau XV: Diamètre d'inhibition des substances produites par les souches lactiques à l'encontre de *Micrococcus luteus* LMG 3293

Souche	Diamètre d'inhibition (mm)		Souche	Diamètre d'inhibition (mm)	
S2	16,17 ^b	± 2,31	Y3	15,00 ^{b, c}	± 1,41
S3	20,83 ^a	± 2,84	Y5	13,09 ^{c, d}	± 0,83
S4	13,00 ^{c, d}	± 0,00	Y6	08,25 ^e	± 0,35
S5	20,33 ^a	± 1,53	Lf1	12,50 ^d	± 0,00
Y1	10,00 ^e	± 1,80			

pH : potentiel d'hydrogène ; mm : millimètre ; ± : plus ou moins

Les valeurs qui partagent les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes selon le test de Fisher.

La figure 13 illustre l'inhibition de *Micrococcus luteus* LMG3293 par les substances produites par la souche S5 (*Lactococcus* sp.)

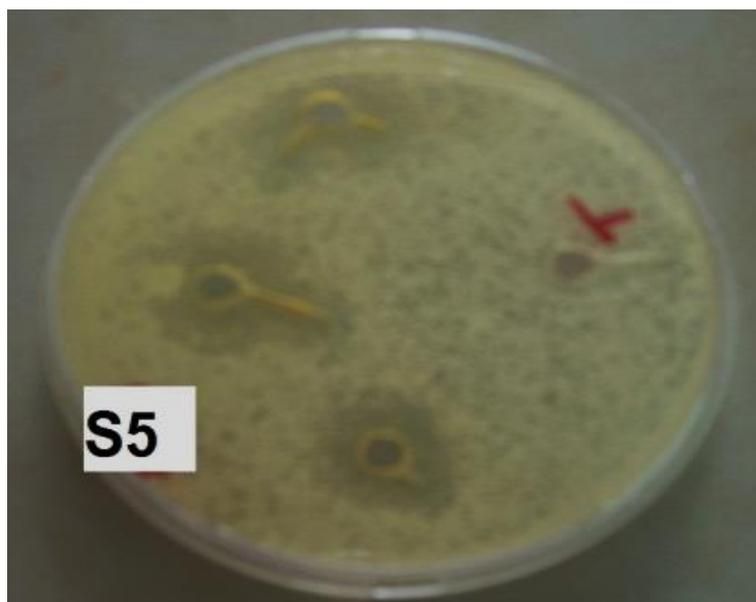


Figure 13 : Activité antimicrobienne des substances produites par la souche S5 à l'encontre de *Micrococcus luteus* LMG 3293

Les substances produites par les neuf souches ont présenté des activités antimicrobiennes à l'encontre de *Micrococcus luteus* LMG 3293 de charge 10^6 UFC/ml. Cette activité a été matérialisée par l'apparition de zone d'inhibition autour des puits par comparaison de non apparition de zone d'inhibition autour du puits témoin (Tableau XV, Figure 13). L'apparition de zone d'inhibition nous permet de dire que ces substances antimicrobiennes pourraient être assimilées aux bactériocines car les substances utilisées ont un pH neutre. Le diamètre des zones d'inhibition relevé varie de $08,25 \pm 0,35$ mm (plus faible activité observée pour la souche Y6) à $20,83 \pm 2,84$ mm (plus forte activité observée pour la souche S3).

Parmi les souches de forme bacillaire, la substance antimicrobienne produite par la souche S3 inhibite fortement *Micrococcus luteus* LMG 3293 avec un diamètre d'inhibition de $20,83 \pm 2,84$ mm contre $08,25 \pm 0,35$ mm donné par la substance antimicrobienne produite par la souche Y6. Les travaux de plusieurs auteurs ont montré que les bactéries lactiques de forme bacillaire (notamment *Lactobacillus*) produisent des substances antimicrobiennes assimilables aux bactériocines actives contre *Micrococcus luteus* (Lade *et al.*, 2006; Abo-Amer, 2007; Noonpakdee *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2012). Les souches de *Lactobacillus* (*Lactobacillus plantarum*) isolées à partir du yogourt traditionnel égyptien produisent des substances antimicrobiennes assimilables aux bactériocines à action dirigée contre *M. luteus* (Abo-Amer, 2007) dont les diamètres d'inhibition sont semblables à ceux obtenus dans cette étude pour les souches S4, Y6 et Lf1.

La souche S3 isolée à partir du *Soumbala* a le diamètre d'inhibition le plus élevé. Le *Soumbala* est un condiment traditionnel africain obtenu par fermentation alcaline spontanée non contrôlée des graines de néré (*Parkia biglobosa*). Cette fermentation utilise préférentiellement les bactéries du genre *Bacillus* (Azokpota *et al.*, 2006; Parkouda *et al.*, 2009) mais on trouve aussi les bactéries lactiques (Ouoba *et al.*, 2010).

Parmi les souches de forme sphérique, la souche S5 produit la substance inhibitrice la plus active dont le diamètre d'inhibition est de $20,33 \pm 1,53$ mm contre $10,00 \pm 1,80$ mm pour la souche Y1 à l'encontre de *Micrococcus luteus* LMG 3293. Les bactéries lactiques de forme sphérique produisent des substances inhibitrices assimilables aux bactériocines comme la nisine (Badr *et al.*, 2005; Tuncer et Ozden, 2010), la lactococcine produite par les espèces du genre *Lactococcus* ou la pédiocine par *Pediococcus* sp.

Les 9 souches inhibent la croissance de *Micrococcus luteus* LMG 3293 mais à différent spectre d'activité de $08,25 \pm 0,35$ mm à $20,83 \pm 2,84$ mm. Le spectre d'action varie au sein du même genre.

Ainsi parmi les bacilles (probablement *Lactobacillus*), le diamètre d'inhibition va de 08,25 mm à 20,83 mm. Cette différence observée au niveau des spectres d'activité des bactériocines produites par les 9 souches pourrait être due à la diversité structurale et à la quantité des bactériocines synthétisées. En effet, les différentes classes de bactériocines (Klaenhammer *et al.*, 2005) ont des structures différentes et des modes d'action variés.

5. Détermination des paramètres de croissance des souches de bactéries lactiques

5.1. Détermination du pH optimal de croissance des souches de bactéries lactiques

Les neuf souches lactiques poussent à des pH différents (Tableau XVI). Les souches S5 et Y5 ont un pH optimal de croissance respectif de pH 7 et pH 5,5. Il est respectivement de pH 6 pour les souches S3, S4 et Lf1 ; et pH 6,5 pour les souches S2, Y1, Y3 et Y6. Le taux de croissance maximal varie de 0,072 h⁻¹ (plus faible valeur observée pour la souche S2 à pH 6,5) à 0,222 h⁻¹ (plus grande valeur observée pour la souche S4 à pH6). Plusieurs travaux ont montrés que les bactéries lactiques ont un pH optimal de croissance variant en fonction de l'espèce (Messens *et al.*, 2002, 2003; Yuwono et Kokugan, 2008; Palaniraj et Nagarajan, 2012).

Tableau XVI: Taux de croissance maximale de chaque souche de bactérie lactique en fonction du pH

Souche	Taux de croissance maximale (μ_{\max} en h ⁻¹)					
	pH5	pH5,5	pH6	pH6,5	pH7	pH7,5
S2	ND	0,021 ± 0,00	0,051 ± 0,011	0,072 ± 0,013	0,071 ± 0,021	0,044 ± 0,003
S5	0,01 ± 0,000	0,011 ± 0,00	0,032 ± 0,001	0,042 ± 0,008	0,077 ± 0,018	0,045 ± 0,001
Y1	0,047 ± 0,000	0,083 ± 0,01	0,142 ± 0,02	0,166 ± 0,01	0,141 ± 0,01	0,121 ± 0,01
Y3	0,023 ± 0,019	ND	0,03 ± 0,004	0,079 ± 0,001	0,051 ± 0,021	0,046 ± 0,008
Y5	0,087 ± 0,014	0,175 ± 0,074	0,116 ± 0,005	0,112 ± 0,017	0,111 ± 0,005	0,087 ± 0,027
S3	0,012 ± 0,004	0,019 ± 0,004	0,059 ± 0,018	0,052 ± 0,017	0,04 ± 0,004	0,04 ± 0,04
S4	0,059 ± 0,011	0,157 ± 0,034	0,222 ± 0,017	0,209 ± 0,013	0,136 ± 0,069	0,104 ± 0,009
Y6	0,007 ± 0,000	0,015 ± 0,001	0,083 ± 0,069	0,127 ± 0,003	0,094 ± 0,047	0,041 ± 0,005
Lf1	0,031 ± 0,013	ND	0,149 ± 0,007	0,135 ± 0,016	0,066 ± 0,002	0,055 ± 0,003

pH : potentiel d'hydrogène ; ND : Non déterminé

Les valeurs chiffrées trouvées sont significativement différentes car $p < 0,0001$.

La figure 14 illustre les différents pH de croissance pour chaque souche à un taux de croissance maximal. La souche S5 croît mieux à un pH 7 alors que les souches S3, S4 et Lf1 ont un pH optimal de croissance de pH 6. Deux catégories de bactéries lactiques peuvent être distinguées : les bactéries acidophiles et les bactéries neutrophiles. Les souches S3, S4, Lf1 et Y5 sont des bactéries acidophiles.

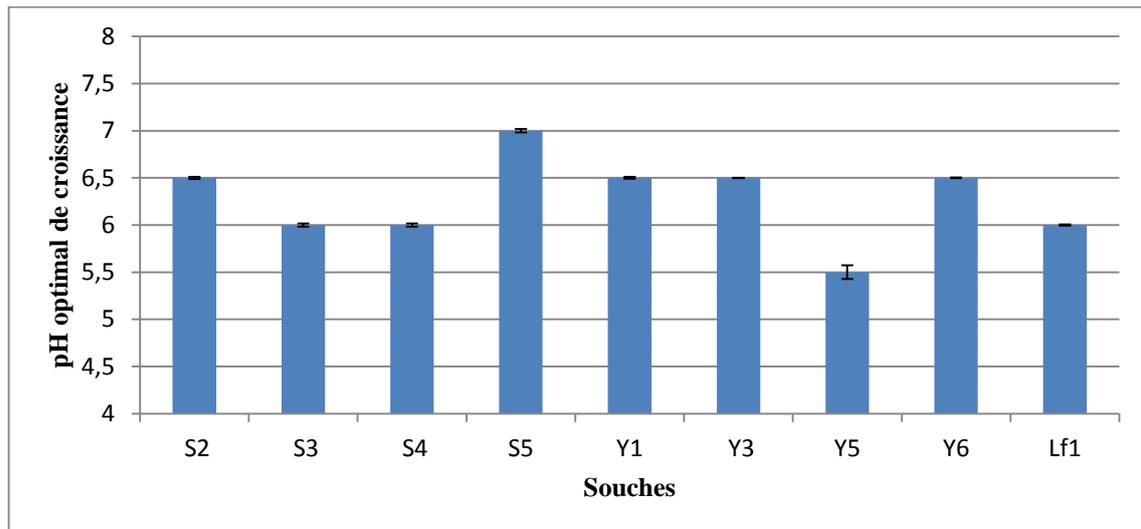


Figure 14: pH optimal de croissance de chaque souche de bactérie lactique

5.2. Détermination de la température optimale de croissance des souches de bactéries lactiques

Les températures 30°C, 37°C et 40°C sont les températures adéquates (Tableau XVII) de croissance des 9 souches soumises à cette étude.

Tableau XVII: Taux de croissance maximale de chaque souche de bactérie lactique en fonction de la température

Souches	Taux de croissance maximale (μ_{\max} en h^{-1})				
	25°C	30°C	47°C	40°C	44°C
S2	0,069 ± 0,035	0,093 ± 0,023	0,096 ± 0,049	0,068 ± 0,035	0,031 ± 0,008
S5	0,002 ± 0,001	0,145 ± 0,036	0,153 ± 0,025	0,099 ± 0,024	0,044 ± 0,009
Y1	0,079 ± 0,007	0,114 ± 0,082	0,078 ± 0,060	0,037 ± 0,000	0,026 ± 0,004
Y3	0,057 ± 0,031	0,068 ± 0,010	0,026 ± 0,003	0,024 ± 0,015	0,024 ± 0,000
Y5	ND	0,092 ± 0,006	0,150 ± 0,006	0,077 ± 0,013	0,052 ± 0,003
S3	0,042 ± 0,015	0,081 ± 0,013	0,151 ± 0,009	0,259 ± 0,016	0,047 ± 0,003
S4	0,025 ± 0,017	0,029 ± 0,000	0,032 ± 0,000	0,097 ± 0,048	0,025 ± 0,002
Y6	ND	0,010 ± 0,001	0,013 ± 0,000	0,123 ± 0,005	0,083 ± 0,003
Lf1	0,080 ± 0,022	0,162 ± 0,021	0,057 ± 0,061	0,021 ± 0,008	ND

ND : Non déterminé

Les valeurs chiffrées trouvées sont significativement différentes car $p < 0,0001$.

Les souches S3, S4 et Y6 ont une température optimale de croissance de 40°C alors qu'elle est de 30°C pour la souche Lf1 qui est alors mésophile. Plusieurs travaux ont montré que les espèces de *Lactobacillus* poussent à une température optimale de 40°C (Trontel *et al.*, 2010).

Les souches S2, S5 et Y5 poussent mieux à 37°C ; contre 30°C pour les souches Y1 et Y3. Elles sont alors des souches mésophiles.

Le taux de croissance maximal varie de 0,068 h^{-1} (plus faible valeur observée pour la souche Y3 à 30°C) à 0,259 h^{-1} (plus grande valeur observée pour la souche S3 à 40°C) (Tableau XVII).

L'influence de la température et du pH sur la croissance des souches de bactéries lactiques a fait l'objet de plusieurs travaux et divers modèles de modélisation de la croissance ont été proposés (Messens *et al.*, 2002, 2003; Yuwono et Kokugan, 2008; Palaniraj et Nagarajan, 2012).

La figure 15 présente les différentes températures optimales de croissance de chaque souche de bactérie lactique.

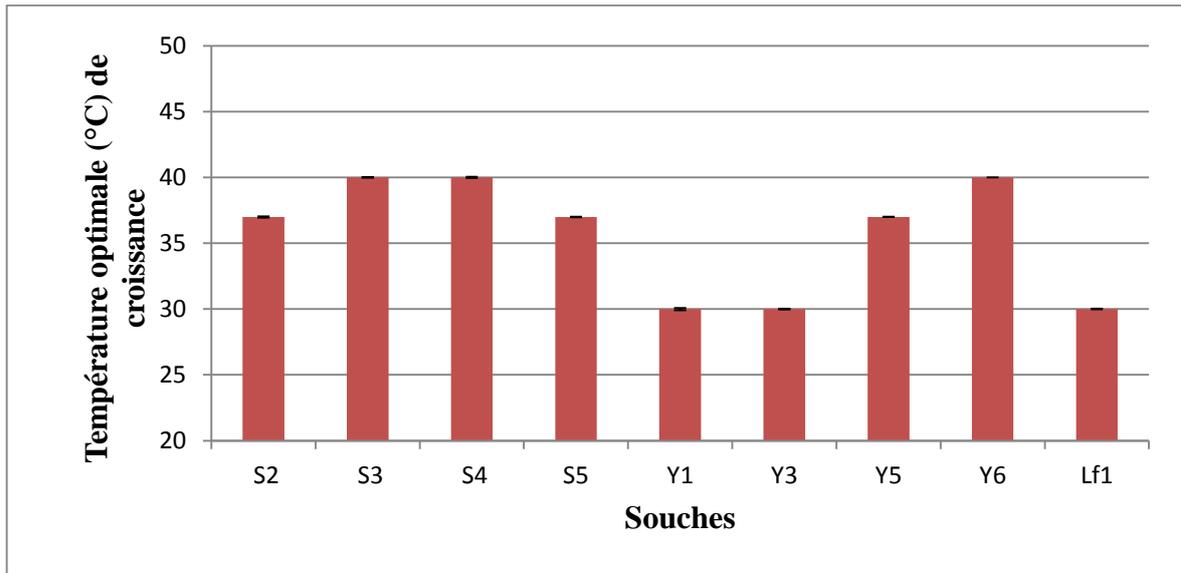


Figure 15: Température optimale de croissance

La figure 16 présente le taux maximal de croissance à pH optimal et température optimale de croissance de chaque souche de bactérie lactique. Le taux maximal de croissance varie de $0,059 \text{ h}^{-1}$ (la souche S3) à $0,222 \text{ h}^{-1}$ (la souche S4).

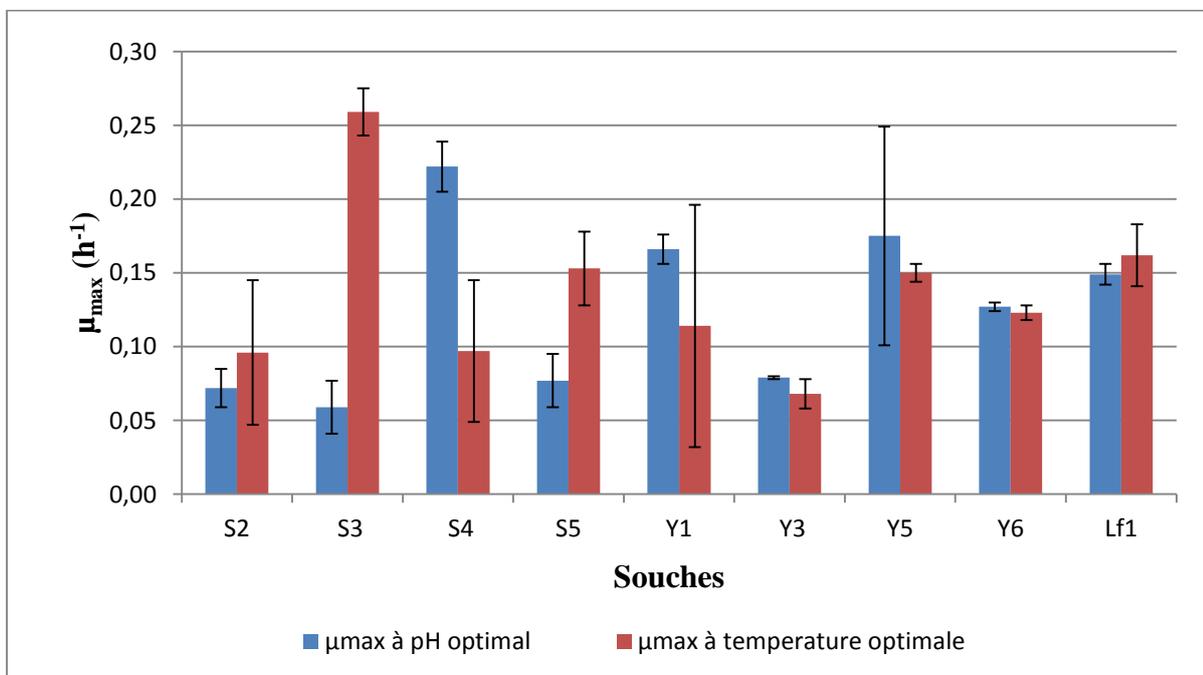


Figure 16: Taux de croissance maximale de chaque souche à pH optimal et température optimale de croissance

6. Identification des souches de bactérie lactiques

6.1. Identification des souches lactiques de forme bacillaire

Le couple d'amorces LbF et LbR (Tableaux XI) spécifique au gène 16S rRNA des *Lactobacillus* sp. (Bakar *et al.*, 2010) a été utilisé. Les amplicons obtenus après amplification du DNA des 4 souches de forme bacillaire (S3, S4, Y6 et Lf1) ont présenté chacun une bande nette et claire de taille 200 – 300 bp (Figure 17). Les mêmes résultats ont été trouvés par Bakar *et al.* (2010). Ils ont travaillé sur des échantillons composés de sauces à base de poissons et de crevette produites par les thaïlandais et les malaisiens. Ces amorces leur ont permis de pouvoir identifier les souches de *Lactobacillus* dans une communauté microbienne diversifiée. Les 4 souches de forme bacillaire soumises à cette étude appartiennent au genre *Lactobacillus* car la taille des produits PCR trouvés est la même que celle trouvée par Bakar *et al.* (2010). Ces résultats viennent confirmer ceux fournis par les tests biochimiques et confirment la diversité écologique des *Lactobacillus* car plusieurs études ont montré que ce genre de bactéries lactiques a plusieurs habitats. Dans cette étude, ces bactéries ont été isolées du *Soumbala* (S3 et S4), du yaourt (Y6) et du lait fermenté (Lf1).

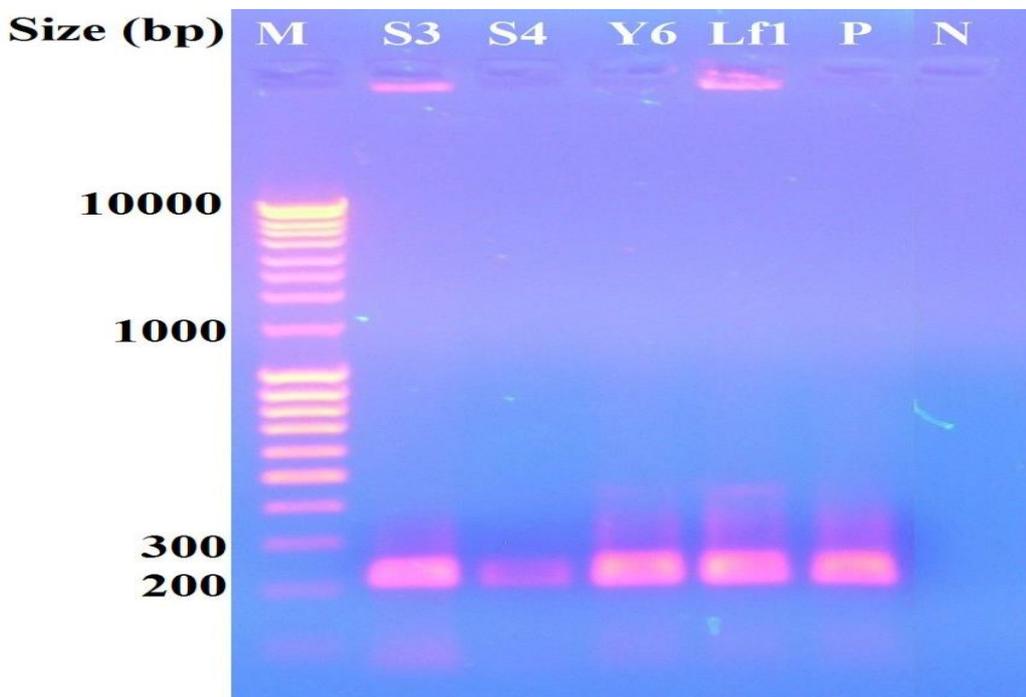


Figure 17: Résultats de l'amplification par les amorces spécifiques aux *Lactobacillus* des souches lactiques de forme bacillaire

M : Marqueur de poids moléculaire ; Souches : S3, S4, Y6 et Lf1 ; P: Ferment lactique (*Lactobacillus* sp.) utilisé comme contrôle positif ; N: Contrôle négatif ; bp : Paires de bases.

6.2. Identification des souches de forme coccoïde

6.2.1. Utilisation du couple d'amorces LcF et LcR spécifiques aux *Lactococcus* sp.

Les cinq souches de forme coccoïde (S2, S5, Y1, Y3 et Y5) ont été identifiées à l'aide d'amorces spécifiques LcF et LcR spécifiques aux genres *Lactococcus* (Ampe *et al.*, 1999; Savadogo *et al.*, 2004b). Des bandes de taille inférieure à 1000 paires de bases ont été obtenues (Figure 18). Donc les 5 souches de forme sphérique appartiendraient au genre *Lactococcus*.

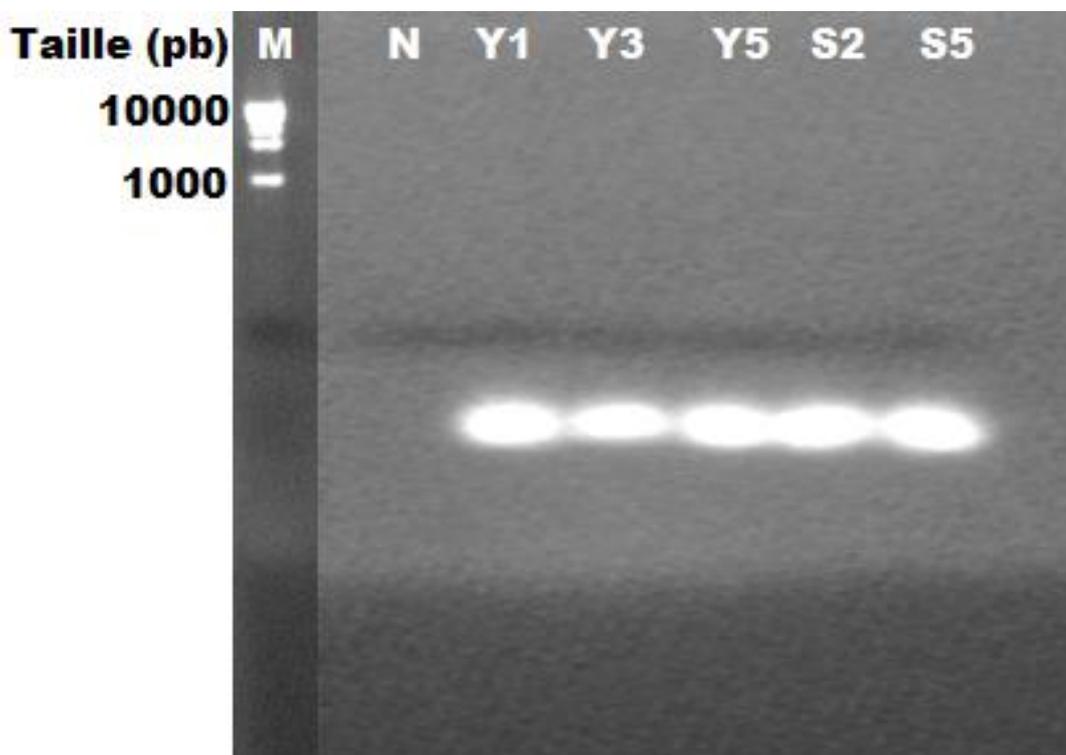


Figure 18: Résultats de l'amplification par les amorces spécifiques aux *Lactococcus* des souches de forme sphérique

M : Marqueur de poids moléculaire ; N : Témoin négatif ; Souches : S2, S5, Y1, Y3 et Y5

6.2.2. Utilisation du couple d'amorces PedF et PedR spécifiques aux *Pediococcus* sp.

Les amorces PedF et PedR spécifiques au genre *Pediococcus* (Ampe *et al.*, 1999; Savadogo *et al.*, 2004b) ont été utilisées afin de savoir si les souches de forme sphériques appartiennent à ce genre de groupe de bactéries. Les amplicons des 5 souches (S2, S5, Y1, Y3 et Y5) n'ont pas répondu positivement (Figure 19) car aucune bande n'a été observée après visualisation du gel. Les 5 souches de formes sphériques n'appartiendraient pas au genre *Pediococcus*.

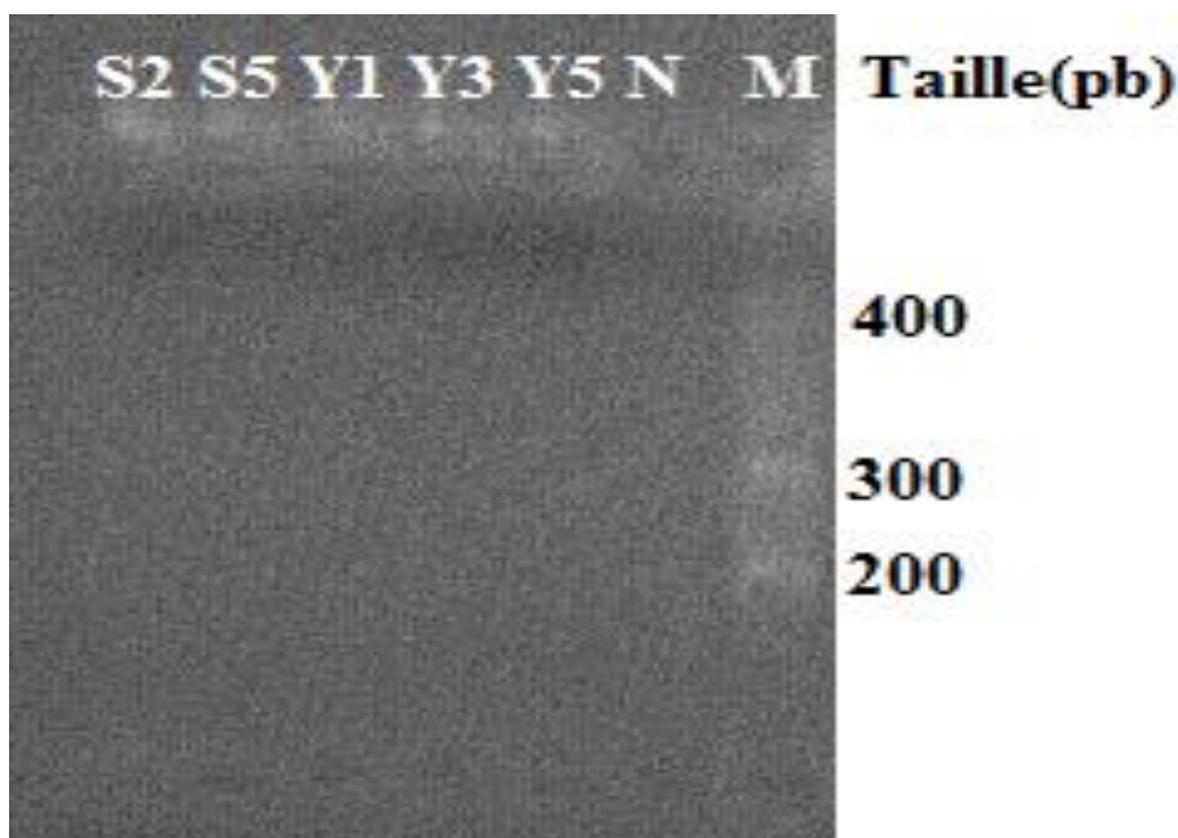


Figure 19: Résultats de l'amplification par les amorces spécifiques aux *Pediococcus* des souches de forme sphérique

M : Marqueur de poids moléculaire ; N : Témoin négatif ; Souches : S2, S5, Y1, Y3 et Y5

6.3. Recherche des gènes des bactériocines chez les souches de bactéries lactiques

Des amorces universelles BacF et BacR (Diop *et al.*, 2008) spécifiques aux gènes codants pour les bactériocines ont été utilisées dans le but de rechercher l'existence potentielle de ces gènes chez les 9 souches de bactéries lactiques soumises à cette étude (Figure 20). Cette portion de l'ADN ribosomal code pour les substances antimicrobiennes comme les bactériocines. En effet, ces amorces ont été choisies par référence à Diop *et al.* (2008) qui en utilisant ces amorces ont réussi à identifier les souches de bactéries lactiques productrices de bactériocines isolées à partir d'aliments locaux sénégalais. Ces résultats montrent alors que les souches S2, S3, S4, S5, Y3, Y5, Y6 et Lf1 peuvent être considérées comme étant des souches productrices de bactériocines. La transcription et la traduction du gène 16S rRNA sont responsables des différentes bactériocines produites par ces différentes bactéries pour leur survie possédant un spectre d'action étroit et/ou large.

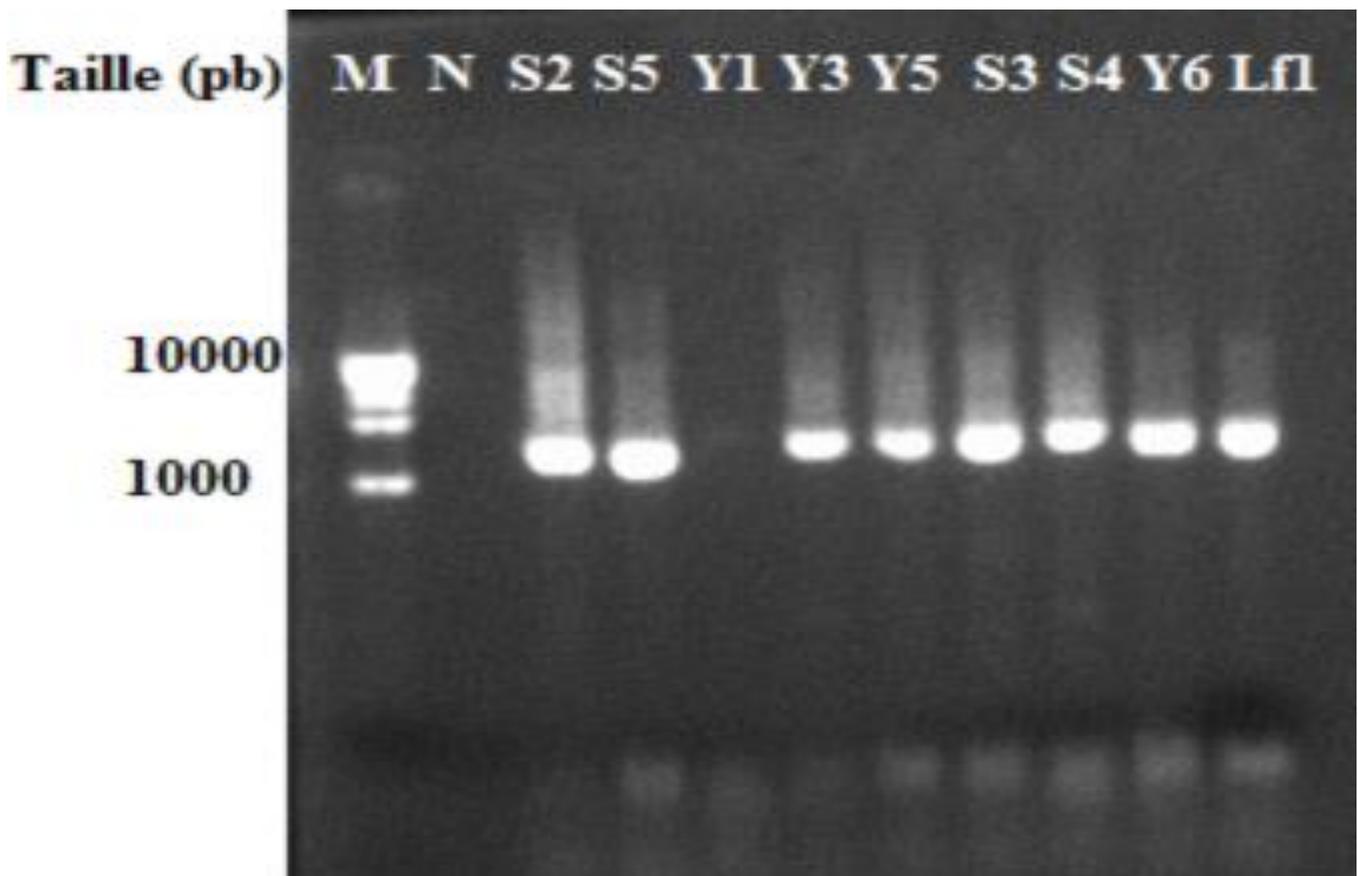


Figure 20: Amplification des gènes 16S rDNA des bactériocines chez les bactéries lactiques

M : Marqueur de poids moléculaire ; N: Témoin négatif ; 3 : Souches : S2, S3, S4, S5, Y1, Y3, Y5, Y6 et Lf1

Conclusion partielle

Vingt-deux (22) souches bactériennes ont été isolées à partir d'aliments fermentés (*Soumbala*, *Bikalga*, lait fermenté, yaourt local) consommés au Burkina Faso. Après une étude morphologique et biochimique, 9 souches ont été retenues comme présumées bactéries lactiques. Les 9 souches ont été identifiées par les techniques moléculaires à l'aide d'amorces spécifiques amplifiant le gène 16S rRNA des bactéries lactiques. Quatre (4) souches (S3, S4, Y6, Lf1) appartiennent au genre *Lactobacillus* et 5 souches (S2, S5, Y1, Y3, Y5) au genre *Lactococcus*. Les 9 souches produisent des substances inhibitrices assimilables aux bactériocines à l'encontre de *Micrococcus luteus* LMG 3293. La technique de diffusion sur gélose par les puits a été utilisée pour les tests d'inhibition dans des conditions permettant d'éliminer l'effet des acides organiques et du peroxyde d'hydrogène. La souche S3 produit les substances inhibitrices les plus actives avec une zone d'inhibition de 20,83 mm à l'encontre de *Micrococcus luteus*. La souche Y6 inhibe très faiblement la croissance de *Micrococcus luteus* LMG 3293 avec une zone d'inhibition de 08,25 mm. Une recherche de gènes codant pour les bactériocines a été menée chez les 9 souches grâce aux amorces spécifiques. La migration sur gel d'agarose puis visualisation à la plaque UV nous permet de conclure que 8 sur 9 souches possèdent ce gène dont l'amplification a donné des bandes de 1000 à 1500 bp. Ainsi seule la souche Y1 produit des substances inhibitrices non assimilables aux bactériocines. L'étude cinétique a consisté à rechercher le pH et la température optimale de croissance de chaque souche afin d'optimiser la production de bactériocines. Seule la souche Y5 peut croître à un pH de 5,5 avec un taux de croissance maximal de 0,175 h⁻¹.

Les résultats de ces travaux ont été publiés dans le journal "*Current Research in Microbiology and Biotechnology*"

Taale E., Savadogo A., Zongo C., Ilboudo A. J. and Traore A. S. (2013). Bioactive molecules from bacteria strains: case of bacteriocins producing bacteria isolated from foods. *Current Research in Microbiology and Biotechnology*, 1(3): 80-88.

Partie II: Caractérisation de souches de *Bacillus* productrices de Bacteriocin-Like Inhibitory Substances (BLIS)

1. Caractères morphologiques des bactéries appartenant au genre *Bacillus*

Les treize bactéries du groupe 2 (Tableaux XIII) de forme bacillaire et sporulantes feront l'objet de cette partie. Toutes les treize se regroupent soit en chaînette, soit en paires (souche Lf4). Elles sont toutes mobiles et à Gram positives.

2. Caractéristiques biochimiques des souches de *Bacillus*

Les différentes caractéristiques biochimiques des bactéries sporulantes du groupe 2 sont reportées dans le tableau XVIII.

Toutes les 13 souches sont catalase, oxydase, nitrates et à Gram positives, alors que seules les souches Bik4, Bik5, Lf2 et Lf5 possèdent l'uréase (Tableau XVIII).

Aucune des souches ne produit de gaz ou de sulfure d'hydrogène (H₂S) en métabolisant le glucose (Tableau XVIII).

Les 13 souches sont mobiles et forment des spores (Tableau XVIII). En effet, La formation de spores est une propriété qui permet de distinguer les *Bacillus* des autres genres bactériens. Les spores formées par les *Bacillus* sont résistantes aux UV, à la chaleur, aux acides et à la dessiccation (Dufrenne *et al.*, 1994; Cortezzo et Setlow, 2005; Carlin *et al.*, 2006; Luecking *et al.*, 2013; Jenson, 2014), c'est pourquoi les bactéries du genre *Bacillus* formant des endospores ne sont pas éliminées après une pasteurisation ou lors de l'utilisation des détergents, des antiseptiques et des désinfectants ; donc, constituent un problème de santé publique. Dans des conditions appropriées, les spores germent et les cellules végétatives résultantes se multiplient par scissiparité. De plus, le cycle de vie et la survie des bacilles dépendent de leur capacité à former des spores. La formation des spores par le genre *Bacillus* a lieu au cours de la phase stationnaire de croissance. En général, la sporulation (formation des spores) peut être induite par la privation de nourriture, ou la densité cellulaire et peut être affectée par de nombreux facteurs, comme la température, le pH, le taux d'oxygène et la disponibilité des différents nutriments (Jenson, 2014).

Tableau XVIII : Caractéristiques biochimiques et utilisation des sucres par les souches de *Bacillus*

Caractéristiques	Souche												
	Bik1	Bik2	Bik3	Bik4	Bik5	Bik6	Bik7	Bik8	Lf2	Lf3	Lf4	Lf5	Lf6
Caractéristiques biochimiques													
Mobile	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxydase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Spore	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gas and H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NO ₂	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urée	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-
Acétoïne (VP)	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gélatine	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Esculine	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Métabolisme des sucres													
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sucrose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Identification présumptive	<i>Bacillus</i> sp.												

Légende : + : Réaction positive - : Réaction négative

Seulement deux souches (Bik1 et Bik2) ne sont pas en mesure de produire de l'acétoïne (Tableau XVIII). L'acétoïne est un produit du métabolisme de fermentation chez de nombreux micro-organismes procaryotes et eucaryotes ainsi que chez les *Bacillus* spp. (Nakano *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 1999). L'acétoïne est l'un des composés intermédiaires produit par des bactéries, responsables de la saveur et de l'arôme retrouvés dans les aliments fermentés comme *Bikalga*.

Le virage de la couleur rouge au jaune de la gélose molle de Kligler indique que toutes les souches sont capables de métaboliser le glucose. Par contre les souches Bik1 et Lf4 ne métabolisent pas le saccharose.

3. Activité antimicrobienne des souches du genre *Bacillus* à l'encontre de *Micrococcus luteus* LMG 3293

L'activité antimicrobienne des substances produites par les souches de *Bacillus* a été évaluée à l'encontre de *Micrococcus luteus* LMG 3293. Les différents diamètres d'inhibition produit par chaque souche sur *Micrococcus luteus* LMG 3293 est relevé dans le tableau XIX. On remarque que le diamètre d'inhibition diffère d'une souche à une autre. Les marges d'erreurs sont élevées car on a un écartype de 4,82 avec le diamètre d'inhibition produit par les substances synthétisées par la souche Lf4. Ces marges d'erreur constatées peuvent être expliquées par le fait que la réalisation des puits sur les géloses et la mesure des halos d'inhibition sont des opérations effectuées manuellement. De plus, il faudra aussi tenir compte du fait que les halos formés ne sont pas parfaitement sphérique dû peut être à la diffusion des substances produites à travers la gélose.

Tableau XIX : Diamètre d'inhibition des souches de *Bacillus* sp. à l'encontre de *Micrococcus luteus* LMG 3293

Souche	Diamètre d'inhibition (mm)	Souche	Diamètre d'inhibition (mm)
Bik1	12,00 ^{b,c,d} ± 2,65	Lf2	11,00 ^{b, c, d, e} ± 1,41
Bik2	12,33 ^{b,c,d} ± 2,52	Lf3	14,17 ^b ± 2,12
Bik3	11,50 ^{b,c,d,e} ± 0,00	Lf4	22,00 ^a ± 4,82
Bik4	10,00 ^{c, d, e} ± 1,80	Lf5	11,50 ^{b,c,d,e} ± 1,41
Bik5	13,28 ^{b,c} ± 0,78	Lf6	12,67 ^{b,c,d} ± 0,58
Bik6	8,33 ^{e,f} ± 0,58		
Bik7	9,33 ^{d,e,f} ± 2,31		
Bik8	6,00 ^f ± 0,00		

Diamètre des puits est inclus. mm : millimètre

Les valeurs qui partagent les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes selon le test de Fisher.

Toutes les souches ont inhibé la croissance de *Micrococcus luteus* LMG 3293 (Tableau XIX). En effet, les espèces de *Bacillus* peuvent produire une diversité de substances antimicrobiennes, y compris peptides et lipopeptides, antibiotiques et bactériocines (Abriouel *et al.*, 2011). Le diamètre d'inhibition ou du halo varie de 6,00 ± 0.00 mm (plus faible activité observée pour la souche Bik8) à 22,00 ± 4,82

mm (plus forte activité observée pour la souche Lf4). L'addition de NaOH 10N au surnageant obtenu après centrifugation à 6000 rpm pendant 15 minutes à la température ambiante de la suspension bactérienne de 24 heures d'une souche ; a permis d'éliminer les effets inhibiteurs des acides organiques et de ramener le potentiel d'hydrogène à 6,5 ; et aussi de pouvoir travailler avec des substances potentiellement de nature protéique (bactériocines, lipopeptides, etc.). Ces substances antibactériennes produites présentent un degré de spécificité élevé et possèdent un spectre d'action élargie car agissent sur *Micrococcus luteus* LMG 3293, une bactérie pas proche du genre *Bacillus*. Notons que les espèces de *Bacillus* produisent aussi des substances antimicrobiennes par voies non ribosomique appelées "Peptides NRPS (Non Ribosomal Peptide Synthetase)", telles que Fengycines, plipastatines, surfactines, lichenysines, iturines, bacillomycines, et mycosubtilines (Marahiel *et al.*, 1997; Ongena et Jacques, 2008; Marahiel et Essen, 2009; Savadogo *et al.*, 2011; Compaoré *et al.*, 2013a). Leur structure primaire et leur organisation génétique ainsi que les différents opérons sont déjà connus (Nakano *et al.*, 1991; Menkhaus *et al.*, 1993; Galli *et al.*, 1994; Tosato *et al.*, 1997; Duitman *et al.*, 1999; Konz *et al.*, 1999; Tsuge *et al.*, 2001; Koumoutsi *et al.*, 2004; Savadogo *et al.*, 2011). Les substances antibactériennes dont la nature protéique n'est pas prouvée sont appelées « Bacteriocin-like inhibitory substances » ou BLIS (Abriouel *et al.*, 2011). C'est fort de ce constat que les substances antimicrobiennes produites par les souches de *Bacillus* sont qualifiées de BLIS car leur nature protéique reste à confirmer même si leur pH est de 6,5. Ainsi, les substances antimicrobiennes produites par les 13 souches caractérisées comme *Bacillus subtilis* ou *Bacillus cereus* (Figures 21-24) peuvent être assimilées aux BLIS. Les bactériocines/BLIS produites par le genre *Bacillus* sensu lato peuvent être considérer comme la deuxième plus importante après les bactériocines produites par les bactéries lactiques. Plusieurs travaux ont montré que les espèces de *Bacillus* peuvent produire des bactériocines/BLIS actives contre *Micrococcus luteus* (Lee *et al.*, 2001; Ouoba *et al.*, 2007; Saleem *et al.*, 2009; Savadogo *et al.*, 2011).

4. Identification des souches de *Bacillus*

4.1. Identification du genre bactérien

Les amorces B-K1/5F et B-K1/5R sont des amorces universelles spécifiques au genre *Bacillus*. Dans cette étude les 13 souches de forme bacillaire ne répondant pas aux caractères primaires des bactéries lactiques ont été amplifiées avec ce couple d'amorces. Les produits PCR obtenus ont une taille entre 1000 – 1200 bp (Figure 21). Ce couple d'amorces a été utilisé par Wu *et al.* (2006) et Savadogo *et al.* (2011) pour identifier leurs souches de *Bacillus* et les mêmes résultats ont été trouvés, soit des amplicons de 1114 bp.

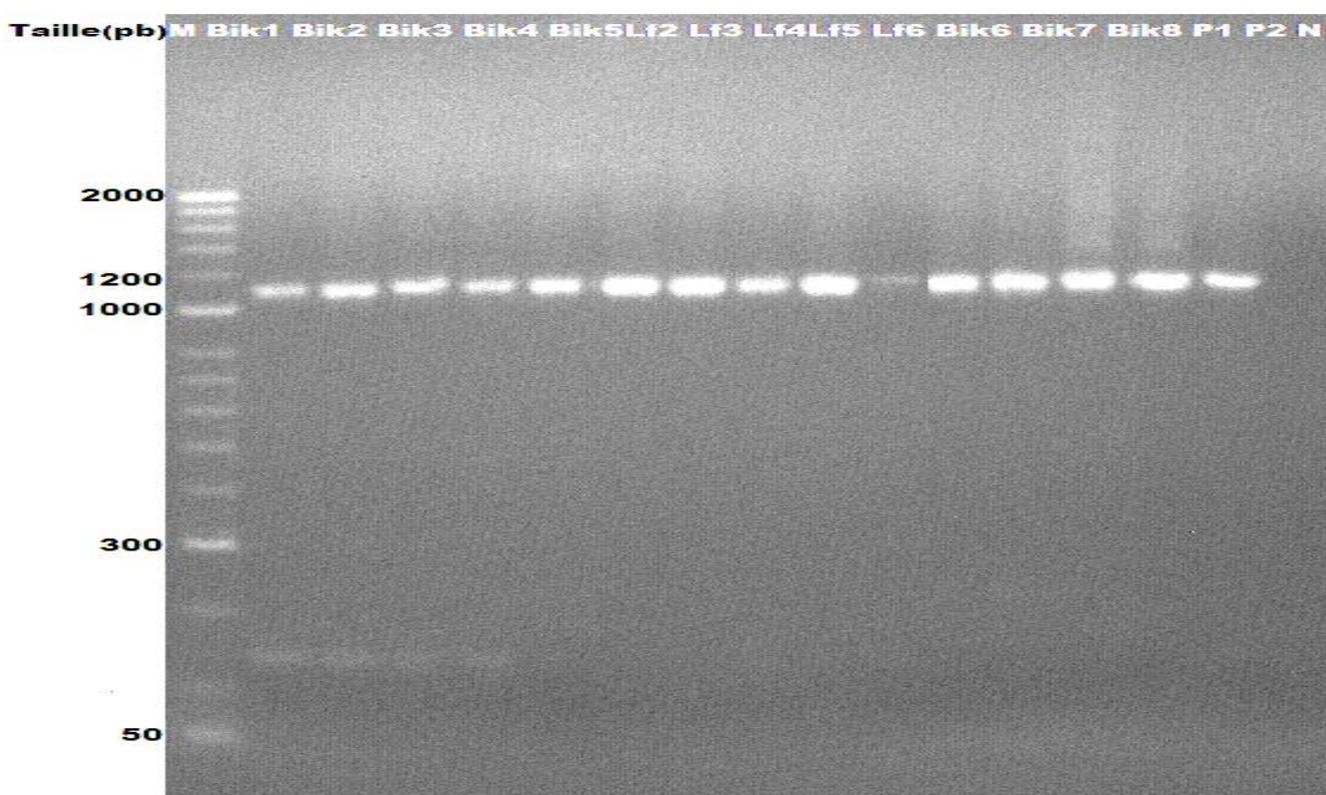


Figure 21: Résultats de l'amplification des 13 bactéries du groupe 2 avec les amorces B-K1/5F et B-K1/3R spécifiques aux *Bacillus* sp.

M : Marqueur de poids moléculaire ; N : Contrôle négatif ; Contrôle positif (P1 : *Bacillus subtilis* ATCC6633 ; P2 : *Bacillus licheniformis* ATCC14850) ; bp : paires de bases ; Souches : Bik1, Bik2, Bik3, Bik4, Bik5, Bik6, Bik7, Bik8, Lf2, Lf3, Lf4, Lf5 et Lf6.

Toutes les souches de forme bacillaire qui forment des spores sont des bactéries appartenant au genre *Bacillus*. Des bandes plus nettes et des bandes moins nettes ont été trouvées. Cette différence dans la netteté des bandes résulterait de la concentration initiale du matériel génétique au début des réactions

d'amplification. Les résultats obtenus dans cette section viennent confirmer les caractéristiques biochimiques et physiologiques des souches obtenues plus haut reporté dans le tableau XIX

Pour confirmer les résultats de la figure 21, une autre réaction d'amplification a été réalisée en utilisant les 13 souches sporulantes avec les amorces LbF et LbR spécifiques au genre *Lactobacillus*. Les résultats obtenus sont représentés par la figure 22. Une seule bande de 200 à 300 paires de bases a été obtenue. Les résultats de la figure 22 viennent donc confirmer les résultats obtenus représentés par la figure 21. De ces observations, découle que les 13 souches de forme bacillaire formant des spores appartiendraient au genre *Bacillus*.

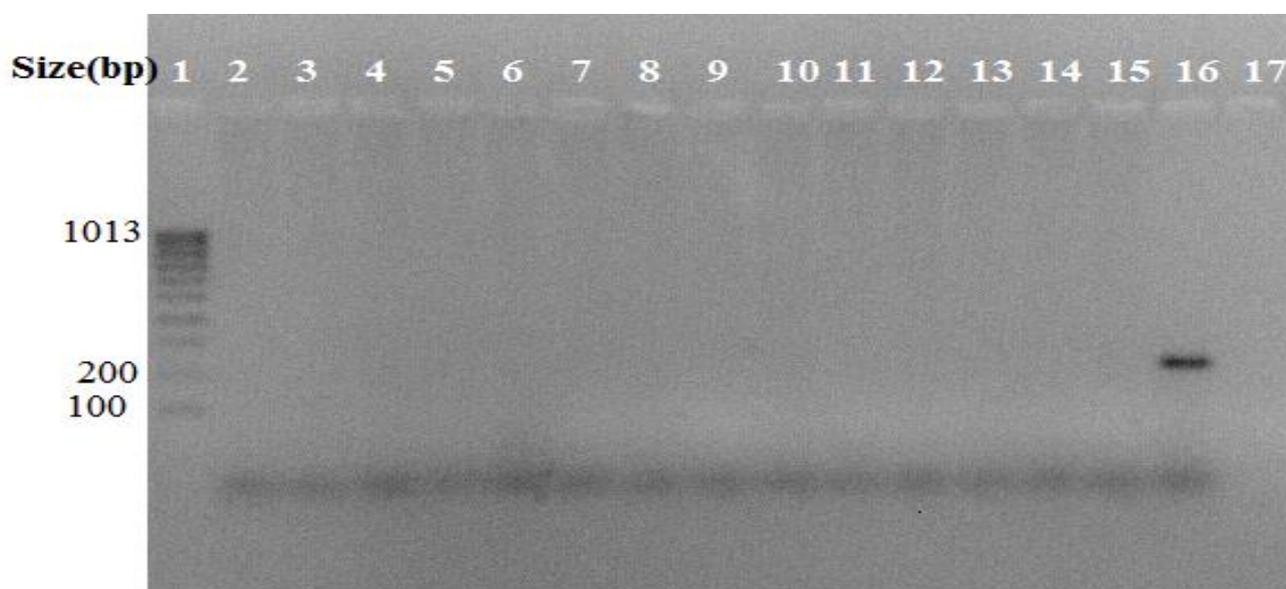


Figure 22: Identification des souches de *Bacillus* au stade genre avec les amorces LbF and LbR spécifiques au genre *Lactobacillus*.

1: Marqueur de poids moléculaire ; 2: Souche Bik1 ; 3: Souche Bik2; 4: Souche Bik3; 5: Souche Bik4; 6: Souche Bik5; 7: Souche Lf2; 8: Souche Lf3; 9: Souche Lf4; 10: Souche Lf5; 11: Souche Lf6; 12: Souche Bik6; 13: Souche Bik7; 14 : Souche Bik8; 15 : *Bacillus subtilis* ATCC6633; 16 : *Lactobacillus* sp. comme contrôle positif ; 17 : Contrôle négatif ; bp : paires de bases.

4.2. Identification des espèces de *Bacillus*

Deux couples d'amorces ont été utilisés pour identifier les souches de *Bacillus* au stade espèce.

4.2.1. Identification des espèces appartenant au groupe de *Bacillus subtilis*

Le couple d'amorce Bsub5F et Bsub3R (Wattiau *et al.*, 2001; Savadogo *et al.*, 2011) spécifique au groupe de *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*) a été utilisé. Les produits PCR résultants ont une longueur de 500 à 600 bp. Sur les 13 souches soumises à l'étude, les amplicons des souches Bik4, Bik8 et Lf1 ont une taille comprise entre 500 et 600 bp (Figure 23). Ces résultats sont semblables à ceux obtenus par Wattiau *et al.* (2001) et Savadogo *et al.* (2011) qui ont eu à utiliser ce couple d'amorce pour identifier une partie de leurs souches de *Bacillus* comme *B. subtilis*. Les résultats obtenus ont permis donc d'identifier les souches Bik4, Bik8 et Lf6 comme étant *B. subtilis*.

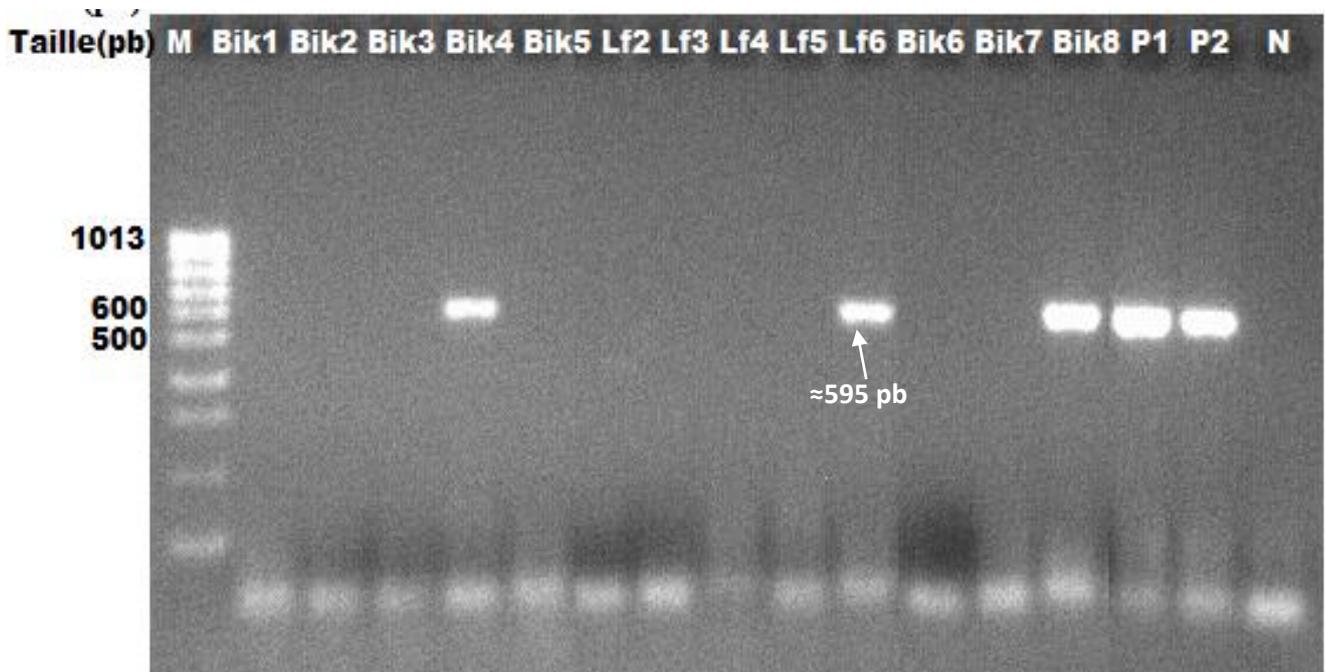


Figure 23: Résultats de l'amplification des 13 bactéries du groupe 2 avec les amorces Bsub5F et Bsub3R spécifiques aux *Bacillus subtilis*

M : Marqueur de poids moléculaire ; N : Contrôle négatif ; Contrôle positif (P1: *Bacillus subtilis* ATCC6633 ; P2 : *Bacillus licheniformis* ATCC14850) ; bp: paires de bases ; Souches : Bik1, Bik2, Bik3, Bik4, Bik5, Bik6, Bik7, Bik8, Lf2, Lf3, Lf4, Lf5 et Lf6

Le groupe de *B. subtilis* regroupe *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. licheniformis*, *B. mojavensis*, *B. pumilus*, *B. sonorensis* et *B. vallismortis*. Ce groupe diffère de celui de *B. cereus* sur divers critères physiologiques et morphologiques (Wunschel *et al.*, 1995). *B. subtilis* est utilisé industriellement à cause de sa capacité à produire un nombre varié de protéases et autres type d'enzymes utiles à l'Homme. Ces enzymes leur confèrent la capacité à dégrader diverses substances. C'est pourquoi les espèces de *B. subtilis* sont utilisées dans la production industrielle des amylases, des protéases, des inosines, des ribosides et des acides aminés.

4.2.2. Identification des espèces appartenant au groupe de *Bacillus cereus*

Le couple d'amorces Ba1F et Ba1R spécifiques au groupe de *Bacillus cereus* a été utilisé. En effet, dans cette partie c'est le gène *groEL* (Chang *et al.*, 2003; Savadogo *et al.*, 2011) qui a été amplifié et une bande de 500 bp a été obtenue comme taille des amplicons des souches Bik1, Bik2, Bik3, Bik5, Bik6, Bik7, Lf2, Lf3, Lf4 et Lf5. Les résultats obtenus en utilisant le couple d'amorce Ba1F et Ba1R sont reportés par la figure 24.

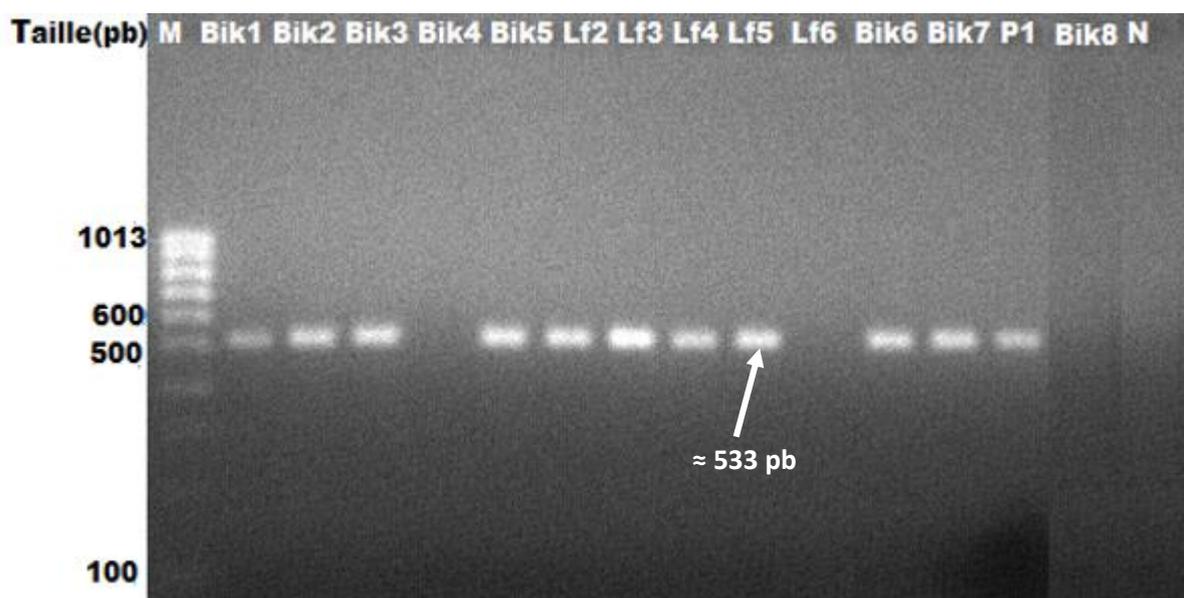


Figure 24: Résultats de l'amplification des 13 bactéries du groupe 2 avec les amorces Ba1F et Ba1R spécifiques aux *Bacillus cereus*

M : Marqueur de poids moléculaire ; N : Contrôle négatif ; Contrôle positif (P1: *Bacillus cereus* LMG 168) ; bp: paires de bases ; Souches :Bik1, Bik2, Bik3, Bik4, Bik5, Bik6, Bik7, Bik8, Lf2, Lf3, Lf4, Lf5 et Lf6

Dix Amplicons de taille comprise entre 500 et 600 bp ont été obtenus correspondant respectivement aux souches Bik1, Bik2, Bik3, Bik5, Bik6, Bik7, Lf2, Lf3, Lf4 et Lf5. Toutes les bandes obtenues sont nettes et claires. Chang *et al.* (2003) et Savadogo *et al.* (2011) ont eu à utiliser ce même couple d'amorces pour identifier une partie de leurs souches de *Bacillus* comme étant *B. cereus* et les résultats qu'ils ont eu sont similaires à ceux trouvés lors de cette étude. Les souches Bik1, Bik2, Bik3, Bik5, Bik6, Bik7, Lf2, Lf3, Lf4 et Lf5 peuvent donc être considérée comme *B. cereus* selon les tests réalisés.

5. Recherche des gènes de substances BLIS

Les 13 souches de *Bacillus* ont inhibé la croissance de *Micrococcus luteus* LMG 3293. Pour essayer de connaître ces potentielles substances antimicrobiennes, une recherche de gènes codant pour les bactériocines en amplifiant le gène ARNr16S avec les amorces BacF et BacR a été menée. Les produits PCR obtenus ont entre 50 et 100 bp. Ces résultats obtenus seraient dû au fait que les amorces ont été au préalable spécifique aux bactéries lactiques productrices de bactériocines. En plus, la taille des amplicons relativement faible obtenue seraient due au non spécificité des amorces au genre *Bacillus* et que l'amplification aurait pris en compte uniquement que les séquences universelles. Ces résultats montrent que les souches Bik1 et Lf4 ne renfermeraient pas ces types de gènes (Figure 25). Les autres souches produiraient donc des substances à activité antimicrobienne assimilables aux bactériocines ou Bactériocins-like Inhibitory Substances (BLIS).

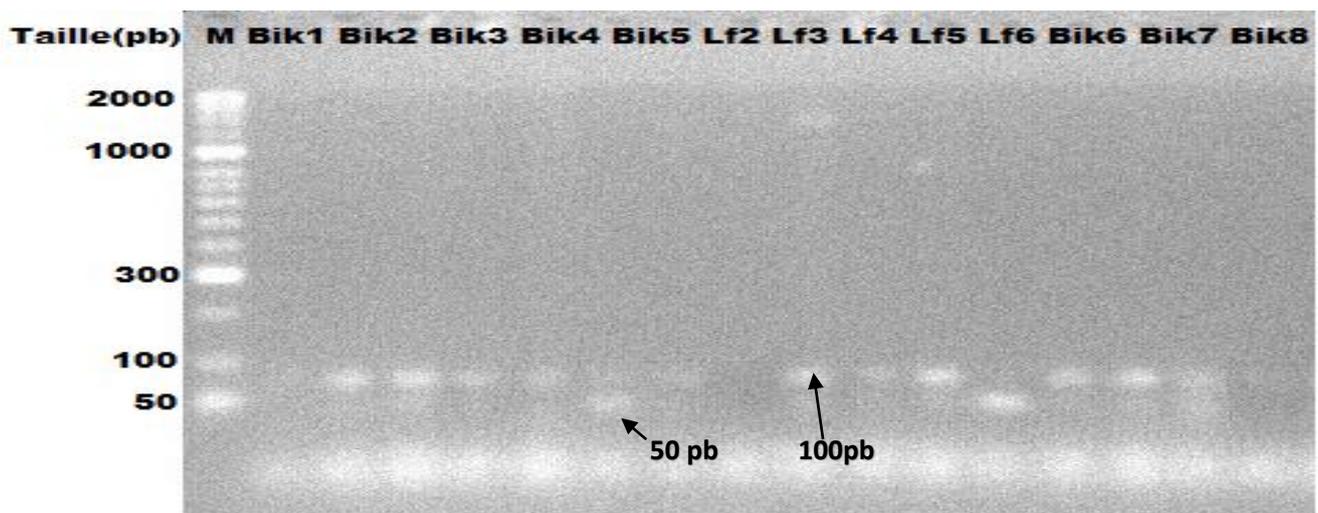


Figure 25: Résultats de l'amplification des 13 souches de *Bacillus* avec les amorces spécifiques aux souches bactériennes productrices de bactériocines

M : Marqueur de poids moléculaire ; N : Contrôle négatif ; bp: paires de bases ; Souches : Bik1, Bik2, Bik3, Bik4, Bik5, Bik6, Bik7, Bik8, Lf2, Lf3, Lf4, Lf5 et Lf6

Conclusion partielle

Treize souches de *Bacillus* ssp. isolées du *Bikalga* et du lait fermenté ont été caractérisées par les techniques de microbiologie et de biologie moléculaire (PCR). La migration des différents amplicons sur gel d'agarose et visualisation sur plaque UV a permis de classer les 13 souches en deux groupes : le groupe de *Bacillus subtilis* (souches Bik4, Bik8 et Lf6) et le groupe de *Bacillus cereus* (souches Bik1, Bik2, Bik3, Bik5, Bik6, Bik7, Lf2, Lf3, Lf4 et Lf5). Toutes ces souches produisent des substances à activité antibactérienne à l'encontre de *Micrococcus luteus* LMG 3293 et les substances produites sont qualifiées de BLIS c'est-à-dire Bacteriocin-like Inhibitory Substances car leur nature protéique reste à confirmer. Les diamètres d'inhibition varient de $6,00 \pm 0,00$ mm (activité inférieure observée pour *Bacillus subtilis* Bik8) à $22,00 \pm 4,82$ mm (activité la plus élevée observée pour *Bacillus cereus* Lf4). Les souches Bik1 et Lf4 ne sont pas considérées comme souches productrices de substances BLIS d'après les résultats obtenus en cherchant le gène 16S rRNA codant pour ces substances. Cette étude a montré que les espèces de *Bacillus* produisant des BLIS peuvent coloniser les aliments fermentés locaux comme le *Bikalga* et le lait fermenté. Ainsi les espèces de *Bacillus* au-delà du rôle toxique qui leur est souvent attribué, constituent aussi des ferments ou starters alimentaires contribuant à produire des aliments appréciés des consommateurs à cause non seulement de leurs qualités organoleptiques mais aussi pour leurs richesses en protéines.

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*.

Article publié :

Taale E., Savadogo A., Zongo C., Somda M. K., Sereme S. S., Karou S. D., Soulama I. and Traore A. S. (2015). Characterization of *Bacillus* species producing Bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) isolated from fermented food in Burkina Faso. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, 2(4): 279-290.

Partie III : Détermination de séquences partielles du gène 16S rRNA de quatre souches lactiques de forme Bacillaire/*Lactobacillus*

1. Détermination des séquences nucléotidiques partielles des souches de *Lactobacillus*

Les produits PCR de quatre souches de *Lactobacillus* ont été séquencés et les séquences nucléotidiques partielles obtenues sont présentées en annexe. La vérification des chromatogrammes a été faite manuellement par FinchTV version 1.4.0. et BioEdit version 7.2.5 et en ligne avec SILVA (<http://www.arb-silva.de/aligner/>), Greengenes (http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-trim_fasta_by_qual.cgi) et Uchime (http://drive5.com/usearch/manual/uchime_algo.html) afin de repérer les bases ambiguës et chimériques avant de procéder aux différents alignements. La qualité des bases retenues est supérieure ou égale à 20. Toutes les bases ambiguës et les bases de qualité inférieure à 20 ont été éliminées.

2. BLAST ou alignement des séquences nucléotidiques partielles du gène 16S rRNA des souches de *Lactobacillus*

Des alignements consécutifs des séquences nucléotidiques partielles de chacune des quatre souches de *Lactobacillus* en utilisant l'algorithme BLASTn de NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ont été réalisés dans le but de les identifier. Après le premier BLAST, l'espèce présentant le taux d'identité le plus élevé est utilisée pour réaliser un second BLAST des séquences nucléotidiques partielles obtenues. Les résultats obtenus ont permis d'établir le tableau XX. Les paramètres d'alignement utilisés sont ceux suggérés par Ladunga (2009).

Tableau XX : Résultats des alignements consécutifs des séquences nucléotidiques partielles du gène 16S rRNA des quatre souches de *Lactobacillus*

Souche	1 ^{er} BLASTn		2 ^{ème} BLASTn		Identification
	Description	Identité	Description	Identité	
Souche S3	<i>Lactobacillus acidophilus</i> strain FSI4, complete genome	95%	<i>Lactobacillus acidophilus</i> strain FSI4, complete genome	95%	<i>Lactobacillus</i> sp. strain S3
	<i>Lactobacillus acidophilus</i> La-14, complete genome	95%	<i>Lactobacillus acidophilus</i> La-14, complete genome	95%	
Souche S4	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain SSK03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain CCB-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	<i>Lactobacillus</i> sp. strain S4
	<i>Lactobacillus murinus</i> strain FAM-01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	93%	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain 1A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	
Souche Y6	<i>Lactobacillus brevis</i> strain IMAU11348 (YM43-1) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	89%	<i>Lactobacillus brevis</i> strain IMAU11348 (YM43-1) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	89%	<i>Lactobacillus</i> sp. strain Y6
	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain KMMSU 519 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	89%	<i>Lactobacillus brevis</i> strain NPS-QW-145 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	89%	
Souche Lf1	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain SSK03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain J11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain Lf1
	<i>Lactobacillus murinus</i> strain FAM-01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain CSCWL 6-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	

La comparaison des séquences nucléotidiques partielles du gène 16S rRNA disponibles à travers l'internet via GENE BANK (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) par alignement a permis d'obtenir des taux d'identification ou d'homologie variant de 89% à 98%. Le taux d'identité de 89% obtenu pour la souche Y6 étant faible et inférieur à 95% permet d'identifier cette dernière comme appartenant au groupe de *Lactobacillus* sp. Le taux d'homologie des souches S3 et S4 avec les séquences de gènes 16S rRNA disponibles dans la base de données est de 95%. Ce taux n'est ni supérieur ni inférieur à 95%, donc l'identification des souches S3 et S4 ne peut se faire au stade espèce mais plutôt au stade genre c'est-à-dire appartiendraient au genre *Lactobacillus* sp.

Par contre le taux d'identité obtenue pour la souche Lf1 est égal à 98%. Dans le cas de la souche Lf1, ses séquences partielles ont donc une homologie de 98% avec *Lactobacillus plantarum* strain J11. D'après le taux d'homologie trouvé, la souche Lf1 peut être identifiée comme *Lactobacillus plantarum* strain Lf1.

Les résultats de l'alignement des séquences partielles de la souche Lf1 (*Lactobacillus plantarum* strain Lf1) a permis de construire un arbre phylogénétique illustré par la figure 26.

Les Bases de données biologiques jouent un rôle central dans la bioinformatique car elles offrent aux scientifiques l'occasion d'accéder à une grande variété de données biologiquement pertinentes, y compris un large éventail de séquences génomiques de divers organismes (Baxevanis, 2011).

Les séquences partielles ont été obtenues en utilisant la technique de séquençage mise au point par Sanger dans les années 1970 et améliorée par la société française GenoScreen. En effet, le séquençage génétique de Sanger est un moyen de déterminer l'ordre des quatre nucléotides dans un brin d'ADN. Il est devenu indispensable dans les domaines de la recherche de base, de la biotechnologie, de la médecine légale et du diagnostic médical. Le principe de la méthode de Sanger repose sur l'idée que, en copiant des brins d'ADN par ajout de nucléotides un par un, on trouve la séquence du brin. Cette méthode s'oppose à celle proposée par ses contemporains Maxam et Gilbert, qui utilise des produits chimiques pour rompre l'ADN et déterminer sa séquence. Dans la réaction de Sanger, le milieu réactionnel comprend le brin d'ADN ou de produit PCR à séquencer, une amorce (LbF et BacF dans cette étude), les quatre nucléotides et une enzyme nommée ADN polymérase qui a pour rôle d'incorporer de nouvelles bases en respectant le principe de complémentarité.

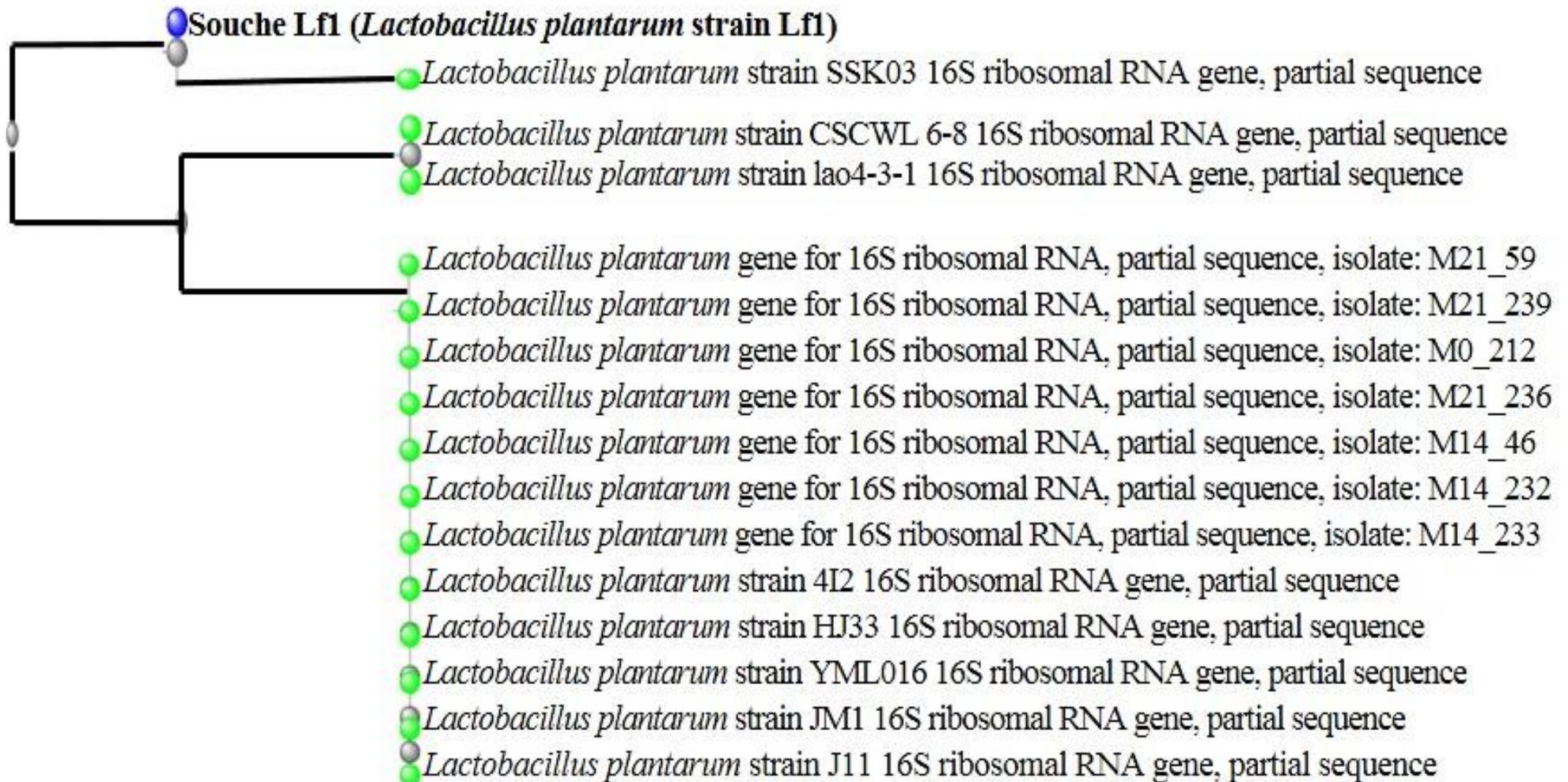


Figure 26 : Arbre phylogénétique construit à partir de l’alignement des séquences nucléotidiques partielles de 16S rRNA de *Lactobacillus plantarum* strain Lf1

Dans cette étude, la cible a été le gène 16S RNA ribosomien. En effet, les ribosomes, organites trouvés dans toutes les cellules vivantes jouent un rôle primordial dans la synthèse des protéines. Chaque ribosome est constitué de deux sous-unités, dont chacune est composée de protéines et de l'ARN connu sous le nom d'ARN ribosomique (noté ARNr ou rRNA). Les Ribosomes des procaryotes tels que les Bactéries sont constitués de petite sous-unité 30S (composé d'ARNr 16S et de 21 chaînes polynucléotidiques) et de grande sous-unité 50S (composé d'ARNr 5S et de l'ARNr 23S) formant un ensemble de 70S.

La présence de régions hypervariables du gène ARNr 16S fournit une signature spécifique pour l'espèce, donc utile lors de l'identification de cette dernière. Des régions fortement conservées encadrent souvent ces régions hypervariables. D'où la conception des amorces spécifiques pouvant se lier à ces régions conservées et de permettre ainsi l'amplification des régions variables. C'est pourquoi, le gène 16S rRNA est largement utilisé dans des études microbiologiques pour identifier les diversités dans des organismes procaryotes ainsi que d'autres organismes et de ce fait à étudier les relations phylogénétiques entre eux.

Cette étude montre une fois encore la présence de *Lactobacillus* spp. dans le *Soumbala* produit au Burkina Faso. Plusieurs travaux ont montré que les aliments condiments obtenus par fermentation alcaline incontrôlée comme le *Soumbala* sont reconnus comme niches des bactéries du genre *Bacillus* (Odunfa et Oyewole, 1986; Ouoba *et al.*, 2004; Azokpota *et al.*, 2006; Oladunmoye 2007; Ouoba *et al.*, 2007, 2008; Parkouda *et al.*, 2009; Uaboi-Egbenni *et al.*, 2009; Savadogo *et al.*, 2011), mais aussi des bactéries lactiques comme les espèces de *Lactobacillus* joueraient un rôle clé dans la transformation des graines de néré en *Soumbala* (Olasupo *et al.*, 1997; Parkouda *et al.*, 2009; Uaboi-Egbenni *et al.*, 2009; Ouoba *et al.*, 2010; Savadogo *et al.*, 2011; Ajayi, 2014; Ukwuru et Ibeneme, 2014).

3. Relation phylogénétique entre les souches de *Lactobacillus* étudiées

La figure 27 représente la relation phylogénétique potentielle entre trois souches de Lactobacilles étudiées. La disposition des branches montre que les souches S4 et Lf1 sont distantes mais seraient plus proches et la souche Y6 serait plus proche de *Lactobacillus plantarum* WCSF1. Toutes les trois souches ont un ancêtre commun. Les souches S4 et Lf1 ont un nœud commun. Par contre la souche Y6 et *Lactobacillus plantarum* WCSF1 ont un même nœud.

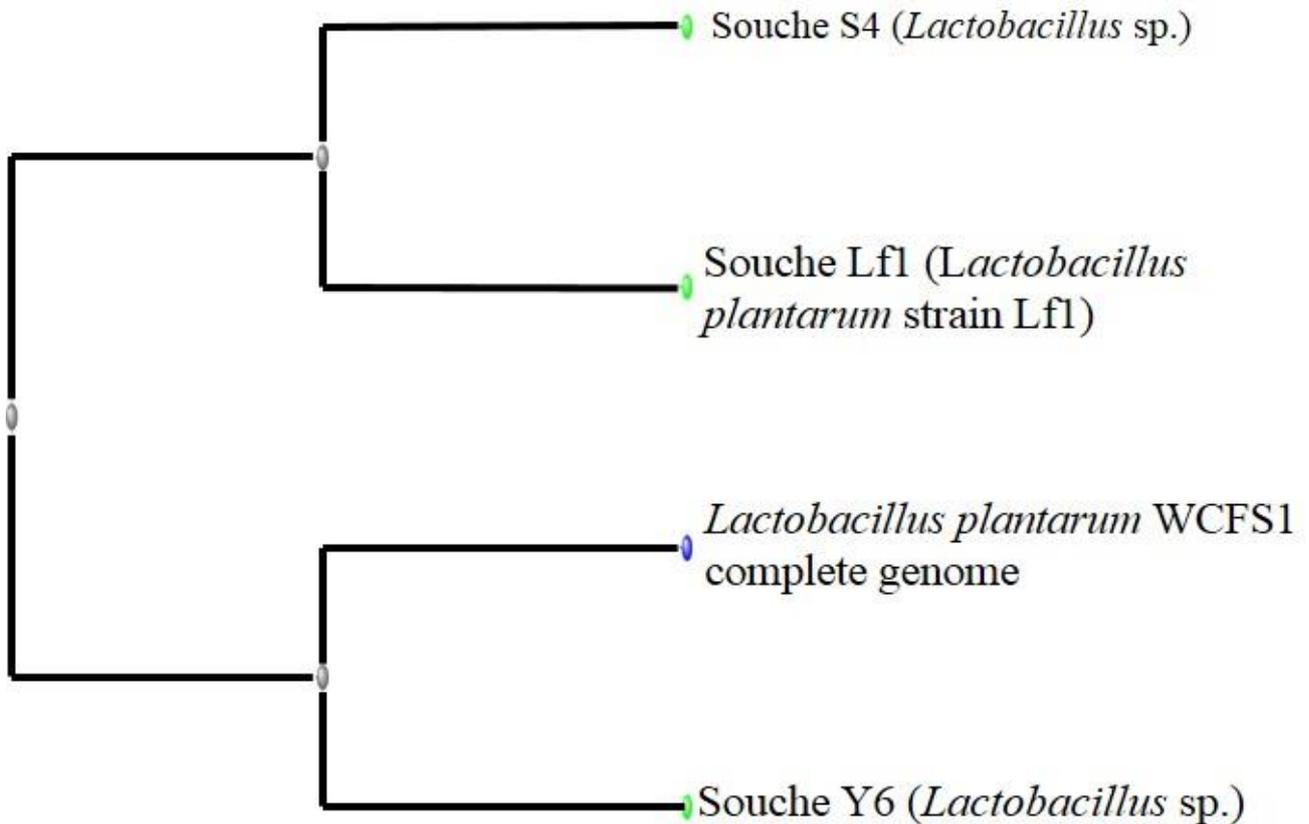


Figure 27: Relation phylogénétique potentielle entre les souches de *Lactobacillus* étudiées

4. Screening des différents gènes du locus *pln* codant pour les plantaricines chez les espèces de *Lactobacillus plantarum*

Les séquences partielles du gène 16S rRNA obtenues ont été alignées avec des séquences de bactériocines disponibles dans deux bases de données que sont NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Baxevanis, 2011; Gibney et Baxevanis, 2011) et Bagel3 (<http://bagel.molgenrug.nl/index.php/bagel3>) (van Heel *et al.*, 2013) afin de déterminer si les souches d'intérêt renfermeraient le gène de la bactériocine plantaricine (locus *pln*) synthétisée par les espèces de *Lactobacillus plantarum*. La plantaricine est une bactériocine appartenant aux bactériocines de classe IIb qui est une bactériocine à deux composantes. L'activité est maximale lorsque les deux composantes sont mobilisées. Les différents résultats obtenus sont listés dans le tableau XXI.

Tableau XXI : Résultats des alignements à partir de BLASTn et BAGEL3 des séquences partielles du gène 16S rRNA

Gène de plantaricine	<i>Lactobacillus</i> sp. strain S3		<i>Lactobacillus</i> sp. strain S4		<i>Lactobacillus</i> sp. strain Y6		<i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i> strain Lf1	
	NCBI ^a	BAGEL3 ^b	NCBI ^a	BAGEL3 ^b	NCBI ^a	BAGEL3 ^b	NCBI ^a	BAGEL3 ^b
<i>plnA</i>	100%	2.10 ⁻¹⁰	80%	2.10 ⁻¹⁰		2.10 ⁻¹⁰	80%	2.10 ⁻¹⁰
<i>plnB</i>		0.0		0.0		0.0		0.0
<i>plnC</i>	100%	^c	100%		87%	^c	100%	
<i>plnD</i>	87%	0.0		0.0	100%	0.0	100%	0.0
<i>plnE</i>	85%	7.10 ⁻³⁷	91%	7.10 ⁻³⁷	91%	7.10 ⁻³⁷	91%	7.10 ⁻³⁷
<i>plnF</i>	100%	6.10 ⁻³⁵		6.10 ⁻³⁵		6.10 ⁻³⁵		6.10 ⁻³⁵
<i>plnG</i>	92%	0.0	100%	0.0	100%	0.0	93%	0.0
<i>plnH</i>	100%	0.0	100%	0.0	100%	0.0	94	0.0
<i>plnI</i>	100%	0.0		0.0		0.0	100%	0.0
<i>plnJ</i>	100%	6.10 ⁻³⁷	86%	6.10 ⁻³⁷		6.10 ⁻³⁷	100%	6.10 ⁻³⁷
<i>plnK^d</i>	90%	1.10 ⁻³⁷	100%	1.10 ⁻³⁷	100%	1.10 ⁻³⁷	100%	1.10 ⁻³⁷
<i>plnL</i>	92%	3.10 ⁻¹⁵⁹	100%	3.10 ⁻¹⁵⁹	92%	3.10 ⁻¹⁵⁹	100%	3.10 ⁻¹⁵⁹
<i>plnM</i>	92%		100%		100%		100%	
<i>plnN</i>		3.10 ⁻³⁵	100%	3.10 ⁻³⁵		3.10 ⁻³⁵	92%	3.10 ⁻³⁵
<i>plnO</i>	100%	3.10 ⁻¹³		3.10 ⁻¹³		3.10 ⁻¹³	3.10 ⁻¹³	3.10 ⁻¹³
<i>plnP</i>		0,0094		0,0094		0,0094		0,0094
<i>plnQ</i>	93%		100%		100%		100%	
<i>plnR</i>	^c	^c	100%		100%	^c	100%	
<i>plnS</i>	100%		100%	^c	100%		92%	^c
<i>plnT</i>		9.10 ⁻¹⁶⁷	100%	9.10 ⁻¹⁶⁷	92%	9.10 ⁻¹⁶⁷	92%	9.10 ⁻¹⁶⁷
<i>plnU</i>		2.10 ⁻¹⁰⁵	100%	2.10 ⁻¹⁰⁵		2.10 ⁻¹⁰⁵	88%	2.10 ⁻¹⁰⁵
<i>plnV</i>		6.10 ⁻¹⁶³		6.10 ⁻¹⁶³		6.10 ⁻¹⁶³	87%	6.10 ⁻¹⁶³
<i>plnW</i>	92%	4.10 ⁻¹⁶¹		4.10 ⁻¹⁶¹	100%	4.10 ⁻¹⁶¹	93%	4.10 ⁻¹⁶¹
<i>plnX</i>		4.10 ⁻⁵²	87%	4.10 ⁻⁵²		4.10 ⁻⁵²		4.10 ⁻⁵²
<i>plnY</i>		2.10 ⁻⁶⁸		2.10 ⁻⁶⁸		2.10 ⁻⁶⁸		2.10 ⁻⁶⁸
<i>pln gene</i>	100%		^c	^c	^c	^c	100%	
<i>ABC Tr</i>	100%		^c	^c	100%		100%	

ABC Tr= ABC Transporter ^aIdentity^bE-value ^C Absent ^d Putative bacteriocin

L'alignement des séquences partielles 16S rRNA codant pour les bactériocines dans les bases de données NCBI et Bagel3 a permis d'identifier l'existence potentielles des différents gènes codant pour les bactériocines à deux composantes nommées plantaricine. L'alignement a montré que certains gènes sont décelables en fonction de la base de données utilisée (Tableau XXI). Les gènes *plnC* et *plnM* sont absents chez les espèces de *Lactobacilles* lorsqu'on utilise la base de données NCBI. De même le gène *plnP* est présent chez toutes les quatre souches de *Lactobacilles* d'après la base de données BAGEL3.

Les gènes *pln A, E, F, K, L, T, U, V, W, X* et *Y* sont présents chez toutes les quatre souches avec un e-value constant. Cette mosaïque de locus codant pour les différentes plantaricines a été montré par plusieurs études antérieures menées chez différentes espèces de *Lactobacillus plantarum* (Diep et Nes, 1995; Ben Omar *et al.*, 2008; Knoll *et al.*, 2008; Diep *et al.*, 2009). Le choix de ces gènes réside dans le fait que l'espèce *Lactobacillus plantarum* était l'espèce la plus représentée constatée lors des alignements des séquences partielles.

D'après les résultats, l'organisation génétique des différentes plantaricines des quatres souches de *Lactobacillus* peut être résumée par le tableau XXII.

Tableau XXII : Organisation génétique possible du gène *pln*

Opéron	Gènes	Molécule bioactive (bactériocine)
<i>plnABCD</i>	4	Plantaricine A ou IP Protéine Histidine kinase (HKP) Protéine RR
<i>plnEFI</i>	3	Plantaricine E,
<i>plnJKLR</i>	4	Plantaricine F, Plantaricine J, Plantaricine K, Protéine d'immunité
<i>plnGHSTUVW</i>	7	Transport
<i>plnMNOP</i>	4	Produisent 4 protéines avec GG à leur N-terminale

L'organisation génétique du gène *pIn* peut être subdivisée en cinq différents opérons : opéron *pInABCD* ; opéron *pInEFI* ; opéron *pInGHSTUVW*, opéron *pInMNOP* et opéron *pInJKLR*.

L'opéron *pInABCD* code pour les protéines régulatrices : la plantaricine A, la protéine histidine kinase (HPK) et la protéine régulatrice de réponse (RR). Ces différentes protéines régulent la synthèse de plantaricines par induction ou par répression en fonction de la concentration en plantaricine dans le milieu extérieur.

Les opérons *pInEFI* et *pInJKLR* codent pour les plantaricines E, F, J, K et la protéine d'immunité. Ces différentes plantaricines seraient à l'origine de l'effet antagoniste observé par les substances produites par les quatre souches de *Lactobacillus* sur *M. luteus* LMG3293. La protéine d'immunité est indispensable car c'est elle qui confère une immunité à la souche productrice.

L'opéron *pInGHSTUVW* est un opéron impliqué dans le transport et l'exportation des plantaricines produites vers le milieu extracellulaire. Les plantaricines synthétisées sous forme inactives pré-plantaricines sont activées au cours de leur exportation par clivage du peptide leader. L'opéron *pInGHSTUV* contient deux ORF (*pInGH*) apparemment codant pour le *transporteur ABC* et sa protéine accessoire, respectivement, impliqués dans la synthèse et l'exportation de peptide en double-glycine-type leaders (Håvarstein *et al.*, 1995; Diep *et al.*, 1996; Diep *et al.*, 2009).

Ces différents opérons contiendraient des Open Reading Frame (ORFs) (Diep *et al.*, 1996).

Conclusion partielle

Les alignements consécutifs des séquences partielles obtenues par séquençage ont permis d'une part d'identifier les quatre souches de Lactobacilles comme étant *Lactobacillus* sp. strain S3, *Lactobacillus* sp. strain S4, *Lactobacillus* sp. strain Y6 et *Lactobacillus plantarum* strain Lf1 ; et d'autre part de montrer que le gène *pln* codant pour les plantaricines chez ces souches est un gène mosaïque. Le gène *pln* est composé de plusieurs opérons : opéron *plnABCD*; opéron *plnEFI*; opéron *plnGHSTUVW* , opéron *plnMNOP* et opéron *plnJKLR*. Ces différents opérons renferment des Open Reading Frame (ORFs). Ces souches de *Lactobacillus* produiraient comme molécules bioactives : protéine Histidine kinase (HKP), protéine régulatrice de réponse (RR), plantaricine A ou IP, plantaricine E, plantaricine F, plantaricine J, plantaricine K et une protéine d'immunité. Cette étude vient attester une fois encore de la présence d'espèces de *Lactobacillus* dans les aliments fermentés où elles jouent un rôle prépondérant. Ces souches peuvent donc être proposer comme starter.

Cette partie a fait l'objet d'un article soumis dans *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*.

Article accepté pour publication sous réserve de correction :

Taale E., Savadogo A., Sina A.O., Zongo C., Karou S. D., Baba-Moussa L.S. and Traore A. S. (2015). Searching for bacteriocin *pln* loci from *Lactobacillus* spp. isolated from fermented food in Burkina Faso by molecular methods. Article soumis dans *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

Comme annoncé dans l'introduction, le but de cette étude est de rechercher de nouvelles souches bactériennes productrices de bactériocines ou de substances BLIS afin de les utiliser comme rempart contre les souches multirésistances aux différents antibiotiques.

Au cours de cette étude, dix neuf souches ont été identifiées comme souches bactériennes productrices de substances BLIS :

- Quatre souches de *Lactobacillus* (*Lactobacillus* sp. strain S3, *Lactobacillus* sp. strain S4, *Lactobacillus* sp. strain Y6 et *Lactobacillus plantarum* strain Lf1) ;
- Quatre souches de *Lactococcus* sp. (Souches S2, S5, Y3 et Y5) ;
- Trois souches de *Bacillus subtilis* (Bik4, Bik8 et Lf6) ;
- Huit souches de *Bacillus cereus* (Bik2, Bik3, Bik5, Bik6, Bik7, Lf2, Lf3 et Lf5).

La recherche de substances bioactives de type bactériocines produites par les *Lactobacillus* sp. strain S3, *Lactobacillus* sp. strain S4, *Lactobacillus* sp. strain Y6 et *Lactobacillus plantarum* strain Lf1 a consisté à procéder par alignements des séquences nucléotidiques partielles du gène 16S rRNA. L'organisation du gène *pln* codant pour les plantaricines est constituée de cinq opérons (opéron *plnABCD* ; opéron *plnEFI* ; opéron *plnGHSTUVW*, opéron *plnMNOP* et opéron *plnJKLR*) et plus d'une vingtaine de gènes. Les plantaricines synthétisées par les quatre souches de *Lactobacillus* sont : plantaricine A ou IP, protéine Histidine kinase (HKP), protéine régulatrice de réponse (protéine RR), plantaricine E, plantaricine F, plantaricine J, plantaricine K et une protéine d'immunité.

A la lumière des résultats obtenus, les souches de *Lactobacillus* peuvent être proposées aux différentes unités de production d'aliments fermentés pour une utilisation éventuelle. Cependant il faudra approfondir les études afin :

- d'évaluer l'activité antibactérienne de toutes les souches à l'encontre d'autres bactéries reconnues comme pathogènes.
- d'étudier leur résistance aux antibiotiques les plus couramment utilisés dans l'élevage et dans le traitement de certaines pathologies chez l'Homme et chez les animaux.
- de procéder au séquençage du génome complet de la souche Lf4 (*Bacillus cereus*) et de *Lactobacillus* sp. strain S3 ayant les diamètres d'inhibition les plus élevés.
- de doser les bactériocines dans les aliments.
- de faire des designs d'amorces spécifiques aux *Bacillus* producteurs de bactériocines.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aarts HJM, Hakemulder LE et Van Hoef AMA (1999). Genomic typing of *Listeria monocytogenes* strains by automated laser fluorescence analysis of amplified fragment length polymorphism fingerprint patterns. *International Journal of Food Microbiology*, 49(1): 95-102. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605\(99\)00057-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605(99)00057-4)
- Abdel-Mawgoud AM, Aboulwafa MM et Hassouna NA-H (2008). Characterization of surfactin produced by *Bacillus subtilis* isolate BS5. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 150(3): 289-303. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-008-8153-z>
- Abee T (1995). Pore-forming bacteriocins of Gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms. *FEMS Microbiology Letters*, 129(1): 1-9. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07548.x>
- Abo-Amer AE (2007). Characterization of a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Lactobacillus plantarum* isolated from Egyptian home-made yogurt. *Science Asia*, 33(3): 313-319. doi: <http://dx.doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.1998.33.313>
- Abriouel H, Benomar N, Huch M, Franz CMAP et Gálvez A (2014). The genera *Bacillus*, *Geobacillus* and *Halobacillus*. In Holzapfel WH et Wood BJB (Ed.), *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*. Chichester, UK.: John Wiley & Sons, Ltd, p555-570. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/9781118655252.ch31>
- Abriouel H, Franz CMAP, Omar NB et Gálvez A (2011). Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(1): 201-232. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x>
- Acuña L, Morero RD et Bellomio A (2011). Development of wide-spectrum hybrid bacteriocins for food biopreservation. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6): 1029-1049. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s11947-010-0465-7>
- Adams MR et Marteau P (1995). On the safety of lactic acid bacteria from food. *International Journal of Food Microbiology*, 27(2): 263-264. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00067-t](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605(95)00067-t)
- Aguirre M et Collins MD (1993). Lactic acid bacteria and human clinical infection. *Journal of Applied Bacteriology*, 75(2): 95-107. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb02753.x>
- Ajayi OA (2014). Bacteriology and Qualitative Study of African Locust Bean (*Parkia biglobosa*). *Open Journal of Social Sciences*, 2(11): 73-78. doi: <http://dx.doi.org/10.4236/jss.2014.211010>
- Alvarez-Ordóñez A, Begley M, Clifford T, Deasy T, Considine K, O'Connor P, Ross RP et Hill C (2014). Investigation of the Antimicrobial Activity of *Bacillus licheniformis* Strains Isolated from Retail Powdered Infant Milk Formulae. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 6(1): 32-40. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s12602-013-9151-1>

- Amao JA, Abel OO et Agboola J (2013). Proximate Analysis and Sensory Evaluations of Iru Produced By *Staphylococcus* Sp. And *Bacillus* Sp. Separately. *IOSR Journal Of Environmental Science, Toxicology And Food Technology*, 6(2): 26-30. doi: <http://dx.doi.org/10.9790/2402-0622630>
- Amoa-Awua WK, Terlabie NN et Sakyi-Dawson E (2006). Screening of 42 *Bacillus* isolates for ability to ferment soybeans into dawadawa. *International Journal of Food Microbiology*, 106(3): 343-347. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.08.016>
- Ampe F, ben Omar N, Moizan C, Wachter C et Guyot J-P (1999). Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 65(12): 5464-5473.
- Atrih A et Foster SJ (2001). Analysis of the role of bacterial endospore cortex structure in resistance properties and demonstration of its conservation amongst species. *Journal of Applied Microbiology*, 91(2): 364-372. doi: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01394.x>
- Auger S, Galleron N, Bidnenko E, Ehrlich SD, Lapidus A et Sorokin A (2008). The genetically remote pathogenic strain NVH391-98 of the *Bacillus cereus* group is representative of a cluster of thermophilic strains. *Applied and Environmental Microbiology* 74(4): 1276-1280. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.02242-07>
- Azokpota P, Hounhouigan DJ, Nago MC et Jakobsen M (2006). Esterase and protease activities of *Bacillus* spp. from afitin, iru and sonru: three African locust bean (*Parkia biglobosa*) condiments from Benin. *African Journal of Biotechnology*, 5(3): 265-272.
- Azokpota P, Hounhouigan JD, Annan NT, Nago MC et Jakobsen M (2008). Diversity of volatile compounds of afitin, iru and sonru, three fermented food condiments from Benin. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(6): 879-885. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-007-9542-0>
- Azpiroz MF, Rodriguez E et Lavina M (2001). The structure, function, and origin of the microcin H47 ATP-binding cassette exporter indicate its relatedness to that of colicin V. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45: 969-972. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/aac.45.3.969-972.2001>
- Badis A, Laouabdia-Sellami N, Guetarni D, Kihal M et Ouzrout R (2005). Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait de chèvre de deux populations caprines locales "Arabia et Kabyle". *Sciences & Technologie C*(23): 30-37.
- Badr S, Karem A, Hussein H et El-Hadedy D (2005). Characterization of nisin produced by *Lactococcus lactis*. *International Journal of Agriculture and Biology*, 7(3): 499-503.

- Bakar FA, Nordin N, Yoke TS et Abdulmir AS (2010). Detection and quantification of probiotic bacteria using optimized DNA extraction, traditional and real-time PCR methods in complex microbial communities. *African Journal of Biotechnology*, 9(10): 1481-1492. doi: <http://dx.doi.org/10.5897/AJB09.1322>.
- Baxevanis AD (2011). The Importance of Biological Databases in Biological Discovery. In Bateman A, Draghici S, Pearson WR, Stein LD et Yates III JR (Ed.), *Current Protocols in Bioinformatics* John Wiley & Sons, Inc., p1.3.1-1.3.25. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/0471250953.bi0103s34>.
- Belguesmia Y, Naghmouchi K, Chihib N-E et Drider D (2011). Class IIa bacteriocins: current knowledge and perspectives. In Drider D et Rebuffat S (Ed.), *Prokaryotic antimicrobial peptides: From genes to applications*. New York: Springer, p171-195. doi: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-7692-5_10
- Ben Omar N, Abriouel H, Keleke S, Sánchez Valenzuela A, Martínez-Cañamero M, Lucas López R, Ortega E et Gálvez A (2008). Bacteriocin-producing *Lactobacillus* strains isolated from poto poto, a Congolese fermented maize product, and genetic fingerprinting of their plantaricin operons. *International journal of food microbiology*, 127(1-2): 18-25. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.05.037>.
- Berthier F et Ehrlich SD (1998). Rapid species identification within two groups of closely related lactobacilli using PCR primers that target the 16S/23S rRNA spacer region. *FEMS Microbiology Letters*, 161(1): 97-106. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb12934.x>
- Bierbaum G et Sahl H-G (2009). Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10(1): 2-18. doi: <http://dx.doi.org/10.2174/138920109787048616>.
- Birbir M, Eryilmaz S et Ogan A (2004). Prevention of halophilic microbial damage on brine cured hides by extremely halophilic halocin producer strains. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 88(3): 99-104.
- Björkroth J, Dicks LMT et Endo A (2014a). The genus *Weissella*. In Holzapfel WH et Wood BJB (Ed.), *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy* (First ed.). New York: John Wiley & Sons, p391-404. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/9781118655252.ch25>
- Björkroth J, Dicks LMT, Endo A et Holzapfel WH (2014b). The genus *Leuconostoc*. In Holzapfel WH et Wood BJB (Ed.), *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*. New York: : John Wiley & Sons, p391-404. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/9781118655252.ch23>
- Björkroth KJ, Schillinger U, Geisen R, Weiss N, Hoste B, Holzapfel WH, Korkeala HJ et Vandamme P (2002). Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(1): 141-148. doi: <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-52-1-141>

- Bolotin A, Wincker P, Mauger S, Jaillon O, Malarne K, Weissenbach J, Ehrlich SD et Sorokin A (2001). The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Research*, 11(5): 731-753. doi: <http://dx.doi.org/10.1101/gr-1697r>
- Bradley AJ (2002). Bovine mastitis: an evolving disease. *The Veterinary Journal*, 164(2): 116-128. doi: <http://dx.doi.org/10.1053/tvjl.2002.0724>
- Budzikiewicz H (2004). Siderophores of the *Pseudomonadaceae* sensu stricto (fluorescent and non-fluorescent *Pseudomonas* spp.). In Herz W, Falk H et Kirby GW (Ed.), *Progress in the chemistry of organic natural products*. Vienna: Springer, p81-237. doi: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-7091-0581-8_2
- Caboche S, Leclère V, Pupin M, Kucherov G et Jacques P (2010). Diversity of monomers in nonribosomal peptides: Towards the prediction of origin and biological activity. *J Bacteriol*, 192(19): 5143-5150. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/jb.00315-10>
- Cachat E et Priest FG (2005). *Lactobacillus suntoryeus* sp. nov., isolated from malt whisky distilleries. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(1): 31-34. doi: <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.63266-0>
- Cai H, Thompson R, Budinich MF, Broadbent JR et Steele JL (2009). Genome sequence and comparative genome analysis of *Lactobacillus casei*: insights into their niche-associated evolution. *Genome Biology and Evolution*, 1: 239-257. doi: <http://dx.doi.org/10.1093/gbe/evp019>
- Cai Y, Pang H, Kitahara M et Ohkuma M (2012). *Lactobacillus nasuensis* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from silage, and emended description of the genus *Lactobacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(Pt5): 1140–1144. doi: <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.031781-0>
- Calcuttawala F, Hariharan C, Pazhani GP, Ghosh S et Ramamurthy T (2015). Activity Spectrum of Colicins Produced by *Shigella sonnei* and Genetic Mechanism of Colicin Resistance in Conspecific *S. sonnei* Strains and *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(1): 152-158. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/aac.04122-14>
- Carlin F, Fricker M, Pielat A, Heisterkamp S, Shaheen R, Salonen MS, Svensson B, Nguyen-the C et Ehling-Schulz M (2006). Emetic toxin-producing strains of *Bacillus cereus* show distinct characteristics within the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Food Microbiology*, 109(1): 132-138. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.022>
- Cavicchioli R, Curmi PM, Saunders N et Thomas T (2003). Pathogenic archaea: do they exist? *Bioessays*, 25(11): 1119-1128. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/bies.10354>
- Chang W-T, Pan C-Y, Rajanbabu V, Cheng C-W et Chen J-Y (2011). Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) antimicrobial peptide, hepcidin 1–5, shows antitumor activity in cancer cells. *Peptides*, 32(2): 342-352. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2010.11.003>

- Chang Y-H, Shangkuan Y-H, Lin H-C et Liu H-W (2003). PCR assay of the groEL gene for detection and differentiation of *Bacillus cereus* group cells. *Applied and Environmental Microbiology* 69(8): 4502-4510. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.69.8.4502-4510.2003>
- Charlesworth JC et Burns BP (2015). Untapped Resources: Biotechnological Potential of Peptides and Secondary Metabolites in Archaea. *Archaea*, 2015: 1-7. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/282035>
- Chen H et Hoover DG (2003). Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(3): 82-100. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00016.x>.
- Cho JH, Sung BH et Kim SC (2009). Buforins: histone H2A-derived antimicrobial peptides from toad stomach. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1788(8): 1564-1569. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.10.025>
- Cho Y-J, Choi JK, Kim J-H, Lim Y-S, Ham J-S, Kang D-K, Chun J, Paik H-D et Kim G-B (2011). Genome sequence of *Lactobacillus salivarius* GJ-24, a probiotic strain isolated from healthy adult intestine. *Journal of Bacteriology*, 193(18): 5021-5022. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/jb.05616-11>
- Claesson MJ, van Sinderen D et O'Toole PW (2008). *Lactobacillus* phylogenomics—towards a reclassification of the genus. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(12): 2945-2954. doi: <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.65848-0>
- Clark W et Lubs H (1915). The identification of bacteria of the colony aerogenes family by use of indicators. *Journal of Infectious Diseases*, 17: 160-173.
- Claus D (1986). Genus *Bacillus* Cohn 1872 *Bergey's manual of systematic bacteriology* (Vol. 2), p1105-1139.
- Colas J-C, Shi W, Rao VM, Omri A, Mozafari MR et Singh H (2007). Microscopical investigations of nisin-loaded nanoliposomes prepared by Mozafari method and their bacterial targeting. *Micron*, 38(8): 841-847. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2007.06.013>
- Cole JR, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, Farris RJ, Kulam-Syed-Mohideen AS, McGarrell DM, Marsh T et Garrity GM (2009). The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 37(suppl 1): D141-D145. doi: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkn879>
- Collins MD, Samelis J, Metaxopoulos J et Wallbanks S (1993). Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *Journal of Applied Bacteriology*, 75(6): 595-603. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb01600.x>

- Combet-Blanc Y, Ollivier B, Streicher C, Patel BKC, Dwivedi PP, Pot B, Prensier G et Garcia J-L (1995). *Bacillus thermoamylovorans* sp. nov., a moderately thermophilic and amyolytic bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(1): 9-16. doi: <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-45-1-9>
- Compaoré CS, Nielsen DS, Ouoba LII, Berner TS, Nielsen KF, Sawadogo-Lingani H, Diawara B, Ouédraogo GA, Jakobsen M et Thorsen L (2013a). Co-production of surfactin and a novel bacteriocin by *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* H4 isolated from Bikalga, an African alkaline *Hibiscus sabdariffa* seed fermented condiment. *International Journal of Food Microbiology*, 162(3): 297-307. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.01.013>
- Compaoré CS, Nielsen DS, Sawadogo-Lingani H, Berner TS, Nielsen KF, Adimpong DB, Diawara B, Ouédraogo GA, Jakobsen M et Thorsen L (2013b). *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* strains as potential protective starter cultures for the production of Bikalga, an alkaline fermented food. *Journal of Applied Microbiology*, 115(1): 133-146. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/jam.12214>
- Corsetti A, Gobbetti M, Rossi J et Damiani P (1998). Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50(2): 253-256. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s002530051285>
- Cortezzo D et Setlow P (2005). Analysis of factors that influence the sensitivity of spores of *Bacillus subtilis* to DNA damaging chemicals. *Journal of Applied Microbiology*, 98(3): 606-617.
- Cotter PD, Hill C et Ross RP (2005a). Bacterial lantibiotics: strategies to improve therapeutic potential. *Current Protein and Peptide Science*, 6(1): 61-75. doi: <http://dx.doi.org/10.2174/1389203053027584>.
- Cotter PD, Hill C et Ross RP (2005b). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10): 777-788. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1273>.
- Dahal NR, Karki TB, Swamylingappa B, Li Q et Gu G (2005). Traditional foods and beverages of Nepal—a review. *Food Reviews International*, 21(1): 1-25. doi: <http://dx.doi.org/10.1081/fri-200040579>
- De Bruyne K, Camu N, De Vuyst L et Vandamme P (2009). *Lactobacillus fabifermentans* sp. nov. & *Lactobacillus cacaonum* sp. nov., isolated from Ghanaian cocoa fermentations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59: 7-12. doi: <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.001172-0>
- De Kwaadsteniet M, Ten Doeschate K et Dicks LMT (2008). Characterization of the structural gene encoding nisin F, a new lantibiotic produced by a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolate from freshwater catfish (*Clarias gariepinus*). *Applied and Environmental Microbiology* 74(2): 547-549. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01862-07>

- De Parasis J et Roth DA (1990). Nucleic acid probes for identification of phyto-bacteria: identification of genus-specific 16S rRNA sequences. *Phytopathology*, 80(7): 618-621.
- De Vuyst L et Vandamme EJ. (1994). *Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and applications* Glasgow: Blackie Academic & Professional, UK, 539p.
- De Zamaroczy M et Chauleau M (2011). Colicin killing: foiled cell defense and hijacked cell functions. In Drider D et Rebuffat S (Ed.), *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From genes to applications*. New York: Springer, p255-287. doi: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-7692-5_14
- Dellaglio F, De Roissart H, Torriani S, Curk M et Janssens D (1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques. *Bactéries lactiques*, 1: 25-116.
- den Bakker HC, Didelot X, Fortes ED, Nightingale KK et Wiedmann M (2008). Lineage specific recombination rates and microevolution in *Listeria monocytogenes*. *BMC Evolutionary Biology*, 8(1): 277. doi: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2148-8-277>
- Dicks LMT, Heunis TDJ, van Staden DA, Brand A, Noll KS et Chikindas ML (2011). Medical and personal care applications of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. In Drider D et Rebuffat S (Ed.), *Prokaryotic Antimicrobial Peptides : From genes to applications*. New York: Springer, p391-421. doi: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-7692-5_19.
- Diep DB, Håvarstein LS et Nes IF (1996). Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *Journal of Bacteriology*, 178(15): 4472-4483.
- Diep DB et Nes IF (1995). A bacteriocin-like peptide induces bacteriocin synthesis in *Lactobacillus plantarum* C11. *Molecular Microbiology*, 18(4): 631-639. doi: http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_18040631.x
- Diep DB et Nes IF (2002). Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Current Drug Targets*, 3(2): 107-122. doi: <http://dx.doi.org/10.2174/1389450024605409>.
- Diep DB, Skaugen M, Salehian Z, Holo H et Nes IF (2007). Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(7): 2384-2389. doi: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0608775104>
- Diep DB, Straume D, Kjos M, Torres C et Nes IF (2009). An overview of the mosaic bacteriocin pln loci from *Lactobacillus plantarum*. *Peptides*, 30(8): 1562-1574. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2009.05.014>.
- Diop MB, Dubois Dauphin R, Dortu C, Destain J, Tine E et Thonart P (2008). In vitro detection and characterization of bacteriocin-like inhibitory activity of lactic acid bacteria (LAB) isolated from Senegalese local food products. *African Journal of Microbiology Research* 2(8): 206-216.
- Dortu C et Thonart P (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques: caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnologie Agronomie Société et Environnement*, 13(1): 143-154.

- du Toit M, Huch M, Cho G-S et Franz CMAP (2014). The genus *Streptococcus*. In Holzapfel WH et Wood BJB (Ed.), *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy* (First ed.). New York: John Wiley & Sons, p457-505. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/9781118655252.ch28>
- Dufrenne J, Soentoro P, Tatini S, Day T et Notermans S (1994). Characteristics of *Bacillus cereus* related to safe food production. *International Journal of Food Microbiology*, 23(1): 99-109.
- Duitman EH, Hamoen LW, Rembold M, Venema G, Seitz H, Saenger W, Bernhard F, Reinhardt R, Schmidt M et Ullrich C (1999). The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC6633: a multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(23): 13294-13299.
- Duquesne S, Destoumieux-Garzón D, Peduzzi J et Rebuffat S (2007). Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Natural Product Reports*, 24(4): 708-734. doi: <http://dx.doi.org/10.1039/b516237h>
- Dutka-Malen S, Evers S et Courvalin P (1995). Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(1): 24-27.
- Endo A et Dicks LMT (2014). The genus *Oenococcus*. In Holzapfel WH et Wood BJB (Ed.), *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy* (First ed.). New York: John Wiley & Sons, p405-415. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/9781118655252.ch24>
- Ennahar S et Cai Y (2004). Genetic evidence that *Weissella kimchii* Choi et al. 2002 is a later heterotypic synonym of *Weissella cibaria* Björkroth et al. 2002. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(2): 463-465. doi: <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.02783-0>
- Erdmann K, Cheung BW et Schröder H (2008). The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 19(10): 643-654. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2007.11.010>
- Espitia PPJ, Soares dFFN, Coimbra dRJS, de Andrade NJ, Cruz SR, Medeiros A et Antonio E (2012). Bioactive peptides: synthesis, properties, and applications in the packaging and preservation of food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(2): 187-204. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00179.x>
- Falagas ME, Betsi GI et Athanasiou S (2006). Probiotics for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis: a review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58(2): 266-272. doi: <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkl246>
- Felnagle EA, Jackson EE, Chan YA, Podevels AM, Berti AD, McMahon MD et Thomas MG (2008). Nonribosomal peptide synthetases involved in the production of medically relevant natural products. *Molecular Pharmaceutics*, 5(2): 191-211. doi: <http://dx.doi.org/10.1021/mp700137g>

- Feng G, Guron GKP, Churey JJ et Worobo RW (2009). Characterization of mundticin L, a class IIa anti-*Listeria* bacteriocin from *Enterococcus mundtii* CUGF08. *Applied and Environmental Microbiology* 75(17): 5708-5713. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00752-09>.
- Ferchichi M, Fathallah M, Mansuelle P, Rochat H, Sabatier J-M, Manai M et Mabrouk K (2001a). Chemical synthesis, molecular modeling, and antimicrobial activity of a novel bacteriocin, MMFII. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289(1): 13-18. doi: <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.2001.5908>
- Ferchichi M, Frère J, Mabrouk K et Manai M (2001b). Lactococcin MMFII, a novel class IIa bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* MMFII, isolated from a Tunisian dairy product. *FEMS Microbiology Letters*, 205(1): 49-55. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10924.x>.
- Fernandez B (2014). Activité biologique et impact sur le microbiote intestinal des bactéries lactiques bactériocinogènes. PhD thesis, Université Laval, Québec, 143p.
- Fischbach MA et Walsh CT (2006). Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms. *Chemical Reviews*, 106(8): 3468-3496. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/chin.200644265>
- Frankland GC et Frankland PF (1887). Studies on some new micro-organisms obtained from air. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B*: 257-287. doi: <http://dx.doi.org/10.1098/rspl.1887.0028>
- Franz CMAP, Endo A, Abriouel H, Van Reenen CA, Galvez A et Dicks LMT (2014). The genus *Pediococcus*. In Holzapfel WH et Wood BJB (Ed.), *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy* (First ed.). New York: John Wiley & Sons, p359-376. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/9781118655252.ch21>
- Franzmann PD, Höpfl P, Weiss NAM et Tindall BJ (1991). Psychrotrophic, lactic acid-producing bacteria from anoxic waters in Ace Lake, Antarctica; *Carnobacterium funditum* sp. nov. and *Carnobacterium alterfunditum* sp. nov. *Archives of Microbiology*, 156(4): 255-262. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/bf00262994>
- Fremaux C, Yann H et Cenatiempo Y (1995). Mesentericin Y105 gene clusters in *Leuconostoc mesenteroides* Y105. *Microbiology*, 141(7): 1637-1645. doi: <http://dx.doi.org/10.1099/13500872-141-7-1637>
- Fujita K, Ichimasa S, Zendo T, Koga S, Yoneyama F, Nakayama J et Sonomoto K (2007). Structural analysis and characterization of lacticin Q, a novel bacteriocin belonging to a new family of unmodified bacteriocins of gram-positive bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 73(9): 2871-2877. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.02286-06>

- Galli G, Rodriguez F, Cosmina P, Pratesi C, Nogarotto R, de Ferra F et Grandi G (1994). Characterization of the surfactin synthetase multi-enzyme complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1205(1): 19-28. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0167-4838\(94\)90087-6](http://dx.doi.org/10.1016/0167-4838(94)90087-6)
- Gálvez A, Abriouel H, Omar NB et Lucas R (2011). Food applications and regulation. In Drider D et Rebuffat S (Ed.), *Prokaryotic Antimicrobial Peptides : From genes to applications*. New York: Springer, p353-390. doi: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-7692-5_18.
- Gancheva A, Pot B, Vanhonacker K, Hoste B et Kersters K (1999). A polyphasic approach towards the identification of strains belonging to *Lactobacillus acidophilus* and related species. *Systematic and Applied Microbiology*, 22(4): 573-585. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/s0723-2020\(99\)80011-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0723-2020(99)80011-3)
- Gauthier SF, Pouliot Y et Saint-Sauveur D (2006). Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins. *International Dairy Journal*, 16(11): 1315-1323. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.06.014>
- Gibney G et Baxevanis AD (2011). Searching NCBI Databases Using Entrez. In Bateman A, Draghici S, Pearson WR, Stein LD et Yates III JR (Ed.), *Current Protocols in Bioinformatics* John Wiley & Sons, Inc., p1.3.1-1.3.25. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/0471250953.bi0103s34>.
- Giraffa G, De Vecchi P et Rossetti L (1998). Note: identification of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies bulgaricus and subspecies lactis dairy isolates by amplified rDNA restriction analysis. *Journal of Applied Microbiology*, 85(5): 918-918. doi: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00606.x>
- Glaasker E, Tjan FSB, Ter Steeg PF, Konings WN et Poolman B (1998). Physiological response of *Lactobacillus plantarum* to salt and nonelectrolyte stress. *Journal of Bacteriology*, 180(17): 4718-4723.
- Gordon R. (1981). *One hundred and seven years of the genus Bacillus* London: Academic Press, doi:
- Grangemard I, Wallach J, Maget-Dana R et Peypoux F (2001). Lichenysin : A More Efficient Cation Chelator Than Surfactin. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 90(3): 199-210. doi: <http://dx.doi.org/10.1385/abab:90:3:199>
- Gratia A (1925). Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *CR Séances Soc. Biol. Fil.*, 93: 1040-1041.
- Green C (1980). Immunosuppression with cyclosporin A: a review. *Diagnostic histopathology/published in association with the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 4(2): 157-174.
- Gutiérrez-Méndez N, Rodríguez-Figueroa JC, González-Córdova AF, Nevárez-Moorillón GV, Rivera-Chavira B et Vallejo-Cordoba B (2010). Phenotypic and genotypic characteristics of *Lactococcus lactis* strains isolated from different ecosystems. *Canadian Journal of Microbiology*, 56(5): 432-439. doi: <http://dx.doi.org/10.1139/w10-026>

- Hancock REW et Diamond G (2000). The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol* 8(9): 402-410. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/s0966-842x\(00\)01823-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0966-842x(00)01823-0)
- Hassaine O (2013). Caractéristiques d'intérêt technologiques de souches de bactéries lactiques isolées de lait camélien du Sud Algérien. PhD thesis, Université d'Oran Es-sénia, Oran, 180p.
- Haugen HS, Kristiansen PE, Fimland G et Nissen-Meyer J (2008). Mutational analysis of the class IIa bacteriocin curvacin A and its orientation in target cell membranes. *Applied and Environmental Microbiology* 74(21): 6766-6773. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01068-08>
- Håvarstein LS, Diep DB et Nes IF (1995). A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Molecular Microbiology*, 16: 229-240. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02295.x>
- Heng NC, Wescombe PA, Burton JP, Jack RW et Tagg JR (2007). The diversity of bacteriocins in Gram-positive bacteria. In Riley MA et Chavan MA (Ed.), *Bacteriocins: Ecology and Evolution*. Berlin: Springer, p45-92. doi: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-36604-1_4.
- Heng NCK et Tagg JR (2006). What's in a name? Class distinction for bacteriocins. *Nature Reviews Microbiology*, 4(2). doi: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1273-c1>.
- Heyndrickx M, Herman L, Vlaes L, Butzler J-P, Wildemaue C, Godard C et De Zutter L (2007). Multiple typing for the epidemiological study of the contamination of broilers with *Salmonella* from the hatchery to the slaughterhouse. *Journal of Food Protection*, 70(2): 323-334.
- Hill HA et Hill JE (1986). The value of plasmid profiling in monitoring *Lactobacillus plantarum* in silage fermentations. *Current Microbiology*, 13(2): 91-94.
- Holo H, Jeknic Z, Daeschel M, Stevanovic S et Nes IF (2001). Plantaricin W from *Lactobacillus plantarum* belongs to a new family of two-peptide lantibiotics. *Microbiology*, 147: 643-651. doi: <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-147-3-643>
- Holzappel WH, Haberer P, Geisen R, Björkroth J et Schillinger U (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2): 365s-373s.
- Holzappel WH et Wood BJB (2014). Introduction to the LAB. In Holzappel WH et Wood BJB (Ed.), *Lactic acid bacteria: Biodiversity and Taxonomy* (First ed.). New York: John Wiley & Sons, p1-12.
- Hosoi T et Kiuchi K (2003). Natto—A food made by fermenting cooked soybeans with *Bacillus subtilis* (natto) *Handbook of fermented functional foods*, p227-245.
- Hu C-B, Malaphan W, Zendo T, Nakayama J et Sonomoto K (2010). Enterocin X, a novel two-peptide bacteriocin from *Enterococcus faecium* KU-B5, has an antibacterial spectrum entirely different from those of its component peptides. *Applied and Environmental Microbiology* 76(13): 4542-4545. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02264-09>

- Huang M, Oppermann-Sanio FB et Steinbüchel A (1999). Biochemical and Molecular Characterization of the *Bacillus subtilis* Acetoin Catabolic Pathway. *Journal of Bacteriology*, 181(12): 3837-3841.
- Hugenholtz J et Kleerebezem M (1999). Metabolic engineering of lactic acid bacteria: overview of the approaches and results of pathway rerouting involved in food fermentations. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(5): 492-497. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/s0958-1669\(99\)00016-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0958-1669(99)00016-6)
- Hühne K, Axelsson L, Holck A et Kröckel L (1996). Analysis of the sakacin P gene cluster from *Lactobacillus sake* Lb674 and its expression in sakacin-negative Lb. sake strains. *Microbiology*, 142(6): 1437-1448. doi: <http://dx.doi.org/10.1099/13500872-142-6-1437>.
- Hulton CSJ, Higgins CF et Sharp PM (1991). ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Molecular Microbiology*, 5(4): 825-834.
- Iwatani S, Zendo T et Sonomoto K (2011). Class IId or linear and non-pediocin-like bacteriocins. In Drider D et Rebuffat S (Ed.), *Prokaryotic Antimicrobial Peptides : From genes to applications*. New York: Springer, p237-252. doi: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-7692-5_13.
- Janda JM et Abbott SL (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9): 2761-2764. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01228-07>.
- Janssen P, Coopman R, Huys G, Swings J, Bleeker M, Vos P, Zabeau M et Kersters K (1996). Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology*, 142(7): 1881-1893.
- Jasniewski J (2008). Étude des mécanismes d'action de bactériocines de la sous classe IIa. PhD thesis, Nancy-Université, Nancy, 155p.
- Jensen GB, Hansen BM, Eilenberg J et Mahillon J (2003). The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environmental Microbiology*, 5(8): 631-640. doi: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00461.x>
- Jenson I (2014). *Bacillus*. In Dahl MK (Ed.), *Encyclopedia of Food Microbiology* (Vol. 1): Elsevier, USA, p111-119. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00018-5>.
- Jenssen H, Hamill P et Hancock RE (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3): 491-511. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/9781555815929.ch30>
- Jiang J, Shi B, Zhu D, Cai Q, Chen Y, Li J, Qi K et Zhang M (2012). Characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* LSJ618 isolated from traditional Chinese fermented radish. *Food Control*, 23(2): 338-344.

- Jiménez G, Urdiain M, Cifuentes A, López-López A, Blanch AR, Tamames J, Kämpfer P, Kolstø A-B, Ramón D et Martínez JF (2013). Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. *Systematic and Applied Microbiology*, 36(6): 383-391. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2013.04.008>
- Jones E, Salin V et Williams GW. (2005). Nisin and the market for commercial bacteriocins *TAMRC Consumer and Product Research Report No. CP-01-05* (pp. 25). Texas: Texas A&M University.
- Justé A, Lievens B, Rediers H et Willems KA (2014). The genus *Tetragenococcus*. In Holzapfel WH et Wood BJB (Ed.), *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy* (First ed.). New York: John Wiley & Sons, p213-227. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/9781118655252.ch16>
- Kazakov T, Vondenhoff GH, Datsenko KA, Novikova M, Metlitskaya AZ, Wanner BL et Severinov K (2008). *Escherichia coli* peptidase A, B, or N can process translation inhibitor microcin C. *Journal of Bacteriology*, 190: 2607-2610. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/jb.01956-07>
- Ke D, Picard FJ, Martineau F, Ménard C, Roy PH, Ouellette M et Bergeron MG (1999). Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(11): 3497-3503.
- Kelly WJ, Ward LJH et Leahy SC (2010). Chromosomal diversity in *Lactococcus lactis* and the origin of dairy starter cultures. *Genome Biology and Evolution*, 2: 729-744.
- Kharroub K (2007). Identification et étude moléculaire des bactéries et des archéobactéries aérobies halophiles de la sebkha Ezzemoul (Ain M'Lila). PhD Thesis Microbiologie et Biologie Moléculaire, Constantine, Université Mentouri - Constantine, 229p.
- Khay EO, Idaomar M, Castro L, Bernárdez P, Senhaji N et Abrini J (2011). Antimicrobial activities of the bacteriocin-like substances produced by lactic acid bacteria isolated from Moroccan dromedary milk. *African Journal of Biotechnology*, 10(51): 10447-10455. doi: <http://dx.doi.org/10.5897/AJB11.1328>.
- Kiers J, Rombouts F et Nout M (2000). In vitro digestibility of *Bacillus* fermented soya bean. *International journal of food microbiology*, 60(2): 163-169. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605\(00\)00308-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605(00)00308-1)
- Kim W (2014). The genus *Lactococcus*. In Holzapfel WH et Wood BJB (Ed.), *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy* (First ed.). New York: John Wiley & Sons, p429-443. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/9781118655252.ch26>
- Kjos M, Salehian Z, Nes IF et Diep DB (2010). An extracellular loop of the mannose phosphotransferase system component IIC is responsible for specific targeting by class IIa bacteriocins. *Journal of Bacteriology*, 192(22): 5906-5913. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00777-10>

- Klaenhammer TR (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70(3): 337-349. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0300-9084\(88\)90206-4](http://dx.doi.org/10.1016/0300-9084(88)90206-4).
- Klaenhammer TR (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12(1-3): 39-85. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.1993.tb00012.x>
- Klaenhammer TR, Barrangou R, Buck BL, Azcarate-Peril MA et Altermann E (2005). Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(3): 393-409.
- Klein G, Pack A, Bonaparte C et Reuter G (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 41(2): 103-125. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605\(98\)00049-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605(98)00049-x)
- Knoetze H, Todorov SD et Dicks LMT (2008). A class IIa peptide from *Enterococcus mundtii* inhibits bacteria associated with otitis media. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31(3): 228-234. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.10.010>.
- Knoll C, Divol B et Du Toit M (2008). Genetic screening of lactic acid bacteria of oenological origin for bacteriocin-encoding genes. *Food Microbiology*, 25(8): 983-991.
- Koba M et Konopa J (2005). Actinomycin D and its mechanisms of action. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 59: 290-298.
- Konz D, Doekel S et Marahiel MA (1999). Molecular and biochemical characterization of the protein template controlling biosynthesis of the lipopeptide lichenysin. *Journal of bacteriology*, 181(1): 133-140.
- Koumoutsis A, Chen X-H, Henne A, Liesegang H, Hitzeroth G, Franke P, Vater J et Borriss R (2004). Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *Journal of Bacteriology*, 186(4): 1084-1096.
- Kovacs N (1956). Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Letters to Nature* 178: 703. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/178703a0>
- Kracht M, Rokos H, Özel M, Kowal M, Pauli G et Vater J (1999). Antiviral and hemolytic activities of surfactin isoforms and their methyl ester derivatives. *The Journal of Antibiotics*, 52(7): 613-619. doi: <http://dx.doi.org/10.7164/antibiotics.52.613>
- Kuipers A, Rink R et Moll GN (2011). Genetics, biosynthesis, structure, and mode of action of lantibiotics. In Drider D et Rebuffat S (Ed.), *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. New York: Springer, USA, p147-169. doi: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-7692-5_9.

- Lade H, Chitanand M, Gyananath G et Kadam T (2006). Studies on some properties of bacteriocins produced by *Lactobacillus* species isolated from agro-based waste. *The Internet J. Microbiol*, 2(1): 1937-8289.
- Ladunga I (2009). Finding Similar Nucleotide Sequences Using Network BLAST Searches. In Bateman A, Draghici S, Pearson WR, Stein LD et Yates III JR (Ed.), *Current Protocols in Bioinformatics*.: John Wiley & Sons, Inc., p3.3.1-3.3.26. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/0471250953.bi0303s26>.
- Lam PK, Yang M et Lam MH (2000). Toxicology and evaluation of microcystins. *Therapeutic drug monitoring*, 22(1): 69-72. doi: <http://dx.doi.org/10.1097/00007691-200002000-00015>
- Lavermicocca P, Valerio F, Evidente A, Lazzaroni S, Corsetti A et Gobbetti M (2000). Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9): 4084-4090.
- Lawson PA (2014a). The genus *Aerococcus*. In Holzapfel WH et Wood BJB (Ed.), *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy* (First ed.). New York: John Wiley & Sons, p81-90. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/9781118655252.ch7>
- Lawson PA (2014b). The genus *Vagococcus*. In Holzapfel WH et Wood BJB (Ed.), *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy* (First ed.). New York: John Wiley & Sons, p229-237. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/9781118655252.ch17>
- Leclère V, Béchet M, Adam A, Guez J-S, Wathelet B, Ongena M, Thonart P, Gancel F, Chollet-Imbert M et Jacques P (2005). Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(8): 4577-4584. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.71.8.4577-4584.2005>
- Lee K-H, Jun K-D, Kim W-S et Paik H-D (2001). Partial characterization of polyfermenticin SCD, a newly identified bacteriocin of *Bacillus polyfermenticus*. *Letters in Applied Microbiology*, 32(3): 146-151.
- Lequerica JL, O'Connor J, Such L, Alberola A, Meseguer I, Dolz M, Torreblanca M, Moya A, Colom F et Soria B (2006). A halocin acting on Na⁺/H⁺ exchanger of *Haloarchaea* as a new type of inhibitor in NHE of mammals. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 62(4): 253-262. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/BF03165754>.
- Limonet M, Revol-Junelles A-M, Cailliez-Grimal C et Milliere J-B (2004). Synergistic mode of action of mesenterocins 52A and 52B produced by *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* FR 52. *Current Microbiology*, 48(3): 204-207. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-003-4165-7>
- Lipmann F, Gevers W, Kleinkauf H et Roskoski R (1971). Polypeptide synthesis on protein templates: the enzymatic synthesis of gramicidin S and tyrocidine. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 35: 1-34.

- Logan NA et De Vos P (2009). *Bacillus*. In De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FR, Schleifer K-H et Whitman WB (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Second ed.). New York: Springer, p21-128. doi:
- Ludwig W et Klenk H-P (2001). Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for procaryotic systematics. In Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT et Garrity GMSD (Ed.), *Bergey's manual® of systematic bacteriology*: Springer US, p49-65. doi: http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-21609-6_8
- Ludwig W, Schleifer K-H et Whitman WB (2009). Revised road map to the phylum Firmicutes *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*: Springer, p1-13. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/9781118960608.bm00025>
- Luecking G, Stoeckel M, Atamer Z, Hinrichs J et Ehling-Schulz M (2013). Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and product spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, 166(2): 270-279. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.07.004>
- Lupski JR et Weinstock GM (1992). Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *Journal of Bacteriology*, 174(14): 4525.
- Lutz G, Chavarría M, Arias ML et Mata-Segreda JF (2006). Microbial degradation of palm (*Elaeis guineensis*) biodiesel. *Revista de Biología Tropical*, 54(1): 59-63. doi: <http://dx.doi.org/10.15517/rbt.v54i1.13994>
- Madani K (2003). Dr. Hans Christian Joachim Gram: inventor of the Gram stain. *Primary Care Update for OB/GYNs*, 10(5): 235-237. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1068-607X\(03\)00055-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1068-607X(03)00055-6).
- Makarova K, Slesarev A, Wolf Y, Sorokin A, Mirkin B, Koonin E, Pavlov A, Pavlov N, Karamychev V, Polouchine N, Shakhov V, Grigoriev I, Lou Y, Rohksar D, Lucas S, Huang K, Goodstein DM, Hawkins T, Plengvidhy V, Welker D, Hughes J, Goh Y, Benson A, Baldwin K, Lee J-H, Diaz-Muñiz I, Dosti B, Smeianov V, Wechter W, Barabote R, Lorcaf G, Altermann E, Barrangou R, Ganesan B, Xie Y, Rawsthorne H, Tamir D, Parker C, Breidt F, Broadbent J, Hutkins R, O'Sullivan D, Steele J, Unlu G, Saier M, Klaenhammer T, Richardson P, Kozyavkin S, Weimerd B et Mills D (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(42): 15611-15616. doi: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0607117103>.
- Makarova KS et Koonin EV (2007). Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. *Journal of Bacteriology*, 189(4): 1199-1208. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/jb.01351-06>
- Makhloufi KM (2011). Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. PhD Thesis, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI, Paris, 228p.

- Maldonado A, Ruiz-Barba JL et Jiménez-Díaz R (2004). Production of plantaricin NC8 by *Lactobacillus plantarum* NC8 is induced in the presence of different types of gram-positive bacteria. *Archives of Microbiology*, 181(1): 8-16. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-003-0606-8>
- Marahiel M, Kessler N et Linne U (2003). Demain, des antibiotiques à façon? *La Recherche*(370): 54-58.
- Marahiel MA et Essen L-O (2009). Nonribosomal peptide synthetases: mechanistic and structural aspects of essential domains. *Methods in Enzymology*, 458: 337-351.
- Marahiel MA, Stachelhaus T et Mootz HD (1997). Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chemical Reviews*, 97(7): 2651-2674.
- Martin-Visscher LA, van Belkum MJ et Vederas JC (2011). Class IIc or circular bacteriocins. In Drider D et Rebuffat S (Ed.), *Prokaryotic antimicrobial peptides: From genes to applications*. New York: Springer, p213-236. doi: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-7692-5_12.
- Mattarelli P, Biavati B, Hammes W et H Holzapfel W (2014). Guidelines for characterizing LAB, bifidobacteria and related genera for taxonomic purposes. In Holzapfel WH et Wood BJB (Ed.), *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*. Chichester, UK.: John Wiley & Sons, Ltd, p583-592. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/9781118655252.app1>
- McCartney A (2002). Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. *British Journal of Nutrition*, 88(S1): s29-s37. doi: <http://dx.doi.org/10.1079/bjn2002627>
- Meindl K, Schmiederer T, Schneider K, Reicke A, Butz D, Keller S, Gühring H, Vértesy L, Wink J et Hoffmann H (2010). Labyrinthopeptins: a new class of carbacyclic lantibiotics. *Angewandte Chemie International Edition*, 49(6): 1151-1154. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/anie.200905773>.
- Menkhaus M, Ullrich C, Kluge B, Vater J, Vollenbroich D et Kamp R (1993). Structural and functional organization of the surfactin synthetase multienzyme system. *Journal of Biological Chemistry*, 268(11): 7678-7684.
- Messens W, Neysens P, Vansieleghem W, Vanderhoeven J et De Vuyst L (2002). Modeling growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 in response to temperature and pH values used for sourdough fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(3): 1431-1435.
- Messens W, Verluyten J, Leroy F et De Vuyst L (2003). Modelling growth and bacteriocin production by *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 in response to temperature and pH values used for European sausage fermentation processes. *International Journal of Food Microbiology*, 81(1): 41-52. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00168-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00168-X).
- Miller DA, Luo L, Hillson N, Keating TA et Walsh CT (2002). Yersiniabactin synthetase: a four-protein assembly line producing the nonribosomal peptide/polyketide hybrid siderophore of *Yersinia pestis*. *Chemistry & Biology*, 9(3): 333-344.

- Miyoshi A, Rochat T, Gratadoux J-J, Le Loir Y, Oliveira SC, Langella P et Azevedo V (2003). Oxidative stress in *Lactococcus lactis*. *Genetics and Molecular Research*, 2(4): 348-359.
- Molloy EM, Hill C, Cotter PD et Ross RP (2011). Bacteriocins. In Fuquay JW (Ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Second ed.). San Diego: Academic Press, p420-429. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00049-2>.
- Morisset D (2003). Etude des relations structure/fonction d'une bactériocine anti-Listeria, la méésentéricine Y105. PhD thesis, Université de Poitiers, Poitiers, 247p.
- Motlagh A, Bukhtiyarova M et Ray B (1994). Complete nucleotide sequence of pSMB 74, a plasmid encoding the production of pediocin AcH in *Pediococcus acidilactici*. *Letters in Applied Microbiology*, 18(6): 305-312. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.1994.tb00876.x>.
- Muto A et Osawa S (1987). The guanine and cytosine content of genomic DNA and bacterial evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(1): 166-169. doi: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.84.1.166>
- Nakano M, Magnuson R, Myers A, Curry J, Grossman A et Zuber P (1991). srfA is an operon required for surfactin production, competence development, and efficient sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 173(5): 1770-1778.
- Nakano MM, Dailly YP, Zuber P et Clark DP (1997). Characterization of anaerobic fermentative growth of *Bacillus subtilis*: identification of fermentation end products and genes required for growth. *Journal of Bacteriology*, 179(21): 6749-6755.
- Naser SM, Dawyndt P, Hoste B, Gevers D, Vandemeulebroecke K, Cleenwerck I, Vancanneyt M et Swings J (2007). Identification of lactobacilli by pheS and rpoA gene sequence analyses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(12): 2777-2789. doi: <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.64711-0>
- Nes IF (2011). History, current knowledge, and future directions on bacteriocin research in lactic acid bacteria. In Drider D et Rebuffat S (Ed.), *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From genes to applications*. New York: Springer, p3-12. doi: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-7692-5_1.
- Nes IF, Diep DB et Holo H (2007). Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of Bacteriology*, 189(4): 1189-1198. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/JB.01254-06>
- Nicholson W (2002). Roles of *Bacillus* endospores in the environment. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59(3): 410-416. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-002-8433-7>
- Nissen-Meyer J, Holo H, Håvarstein LS, Sletten K et Nes IF (1992). A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *Journal of Bacteriology*, 174(17): 5686-5692.

- Nissen-Meyer J, Opegård C, Rogne P, Haugen HS et Kristiansen PE (2010). Structure and mode-of-action of the two-peptide (Class-IIb) bacteriocins. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2(1): 52-60. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s12602-009-9021-z>.
- Nissen-Meyer J, Opegård C, Rogne P, Haugen HS et Kristiansen PE (2011). The two-peptide (Class-IIb) bacteriocins: genetics, biosynthesis, structure, and mode of action. In Drider D et Rebuffat S (Ed.), *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From genes to applications*. New York: Springer, p197-212. doi: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-7692-5_11.
- Nissen-Meyer J, Rogne P, Opegard C, Haugen H et Kristiansen P (2009). Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10(1): 19-37. doi: <http://dx.doi.org/10.2174/138920109787048661>.
- Noonpakdee W, Jumriangrit P, Wittayakom K, Zendo J, Nakayama J, Sonomoto K et Panyim S (2009). Two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* PMU 33 strain isolated from som-fak, a Thai low salt fermented fish product. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 17(1): 19-25.
- O'connor E et Shand R (2002). Halocins and sulfobiocins: the emerging story of archaeal protein and peptide antibiotics. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28(1): 23-31. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.jim.7000190>
- O'sullivan O, O'Callaghan J, Sangrador-Vegas A, McAuliffe O, Slattery L, Kaleta P, Callanan M, Fitzgerald GF, Ross RP et Beresford T (2009). Comparative genomics of lactic acid bacteria reveals a niche-specific gene set. *BMC Microbiology*, 9(1): 50.
- Odufa S et Oyewole O (1986). Identification of *Bacillus* species from 'iru', a fermented African locust bean product. *Journal of Basic Microbiology*, 26(2): 101-108.
- Oguntoyinbo FA, Huch M, Cho G-S, Schillinger U, Holzapfel WH, Sanni AI et Franz CM (2010). Diversity of *Bacillus* species isolated from okpehe, a traditional fermented soup condiment from Nigeria. *Journal of Food Protection*, 73(5): 870-878.
- Oguntoyinbo FA, Sanni AI, Franz CM et Holzapfel WH (2007). In vitro fermentation studies for selection and evaluation of *Bacillus* strains as starter cultures for the production of okpehe, a traditional African fermented condiment. *International Journal of Food Microbiology*, 113(2): 208-218.
- Oladunmoye MK (2007). Effects of Fermentation on Nutrient Enrichment of Locust Beans (*Parkia biglobosa*, Robert bam) *Research Journal of Microbiology*, 2: 185-189.
- Olasupo NA, Olukoya DK et Odufa SA (1997). Identification of *Lactobacillus* species associated with selected African fermented foods. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 52(1-2): 105-108.

- Olsen GJ, Larsen N et Woese CR (1991). The ribosomal RNA database project. *Nucleic Acids Research*, 19(Suppl): 20-17.
- Ongena M et Jacques P (2008). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16(3): 115-125.
- Oren ASID (2010). Archaea. In Battista J, Oren A et Pettis G (Ed.), *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, doi: <http://dx.doi.org/10.1002/9780470015902.a0000443.pub2>.
- Otto BR, van D, S.J.M., Nuijens JH, Luirink J et Oudega B (1998). Characterization of a hemoglobin protease secreted by the pathogenic *Escherichia coli* strain EB1. *Journal of Experimental Medicine* 188: 1091-1103. doi: <http://dx.doi.org/10.1084/jem.188.6.1091>
- Ouoba LII, Diawara B, Jespersen L et Jakobsen M (2007). Antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* during the fermentation of African locust bean (*Parkia biglobosa*) for Soumbala production. *Journal of Applied Microbiology*, 102(4): 963-970. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03156.x>
- Ouoba LII, Diawara B, kofi Amoa-Awua W, Traoré AS et Møller PL (2004). Genotyping of starter cultures of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* for fermentation of African locust bean (*Parkia biglobosa*) to produce Soumbala. *International Journal of Food Microbiology*, 90(2): 197-205. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605\(03\)00302-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605(03)00302-7)
- Ouoba LII, Nyanga-Koumou C, Parkouda C, Sawadogo H, Kobawila SC, Keleke S, Diawara B, Louembe D et Sutherland JP (2010). Genotypic diversity of lactic acid bacteria isolated from African traditional alkaline-fermented foods. *Journal of Applied Microbiology*, 108(6): 2019-2029. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04603.x>.
- Ouoba LII, Parkouda C, Diawara B, Scotti C et Varnam AH (2008). Identification of *Bacillus* spp. from Bikalga, fermented seeds of *Hibiscus sabdariffa*: phenotypic and genotypic characterization. *Journal of applied microbiology*, 104(1): 122-131. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03550.x>
- Palaniraj R et Nagarajan P (2012). Kinetic studies in production of lactic acid from waste potato starch using *Lactobacillus casei*. *International Journal of ChemTech Research*, 4(4): 1601-1614.
- Parkouda C, Nielsen DS, Azokpota P, Ivette Irène Ouoba L, Amoa-Awua WK, Thorsen L, Hounhouigan JD, Jensen JS, Tano-Debrah K et Diawara B (2009). The microbiology of alkaline-fermentation of indigenous seeds used as food condiments in Africa and Asia. *Critical Reviews in Microbiology*, 35(2): 139-156. doi: <http://dx.doi.org/10.1080/10408410902793056>
- Patel JB (2001). 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Molecular Diagnosis*, 6(4): 313-321.

- Patton BS, Dickson JS, Lonergan SM, Cutler SA et Stahl CH (2007). Inhibitory activity of Colicin E1 against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*®, 70(5): 1256-1262.
- Pot B, Felis GE, Bruyne KD, Tsakalidou E, Papadimitriou K, Leisner J et Vandamme P (2014). The genus *Lactobacillus*. In Holzapfel WH et Wood BJB (Ed.), *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*. New York: John Wiley & Sons, p249-353. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/9781118655252.ch19>
- Priest FG (1993). *Bacillus*. In Rehrn H-J et Reed G (Ed.), *Biotechnology Set: Wiley-VCH Verlag GmbH*, p367-400. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/9783527620999.ch11>.
- Quadri L, Sailer M, Roy KL, Vederas JC et Stiles ME (1994). Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B. *Journal of Biological Chemistry*, 269(16): 12204-12211.
- Raftis EJ, Salvetti E, Torriani S, Felis GE et O'Toole PW (2011). Genomic diversity of *Lactobacillus salivarius*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(3): 954-965.
- Rajanbabu V et Chen J-Y (2011). Applications of antimicrobial peptides from fish and perspectives for the future. *Peptides*, 32(2): 415-420. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2010.11.005>
- Raymond KN, Dertz EA et Kim SS (2003). Enterobactin: an archetype for microbial iron transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(7): 3584-3588. doi: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0630018100>
- Rea MC, Ross RP, Cotter PD et Hill C (2011). Classification of bacteriocins from Gram-positive bacteria. In Drider D et Rebuffat S (Ed.), *Prokaryotic antimicrobial peptides: From genes to applications*. New York: Springer, p29-53. doi: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-7692-5_3.
- Rebuffat S (2011). Bacteriocins from Gram-Negative Bacteria: A Classification? In Drider D et Rebuffat S (Ed.), *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From genes to applications*. New York: Springer, p55-72. doi: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-7692-5_4.
- Riley MA et Chavan MA (2007). Bacteriocins. In Riley MA et Chavan MA (Ed.), *Ecology and Evolution*. Berlin: Springer, p154. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-36604-1>.
- Riley MA et Wertz JE (2002a). Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie*, 84(5): 357-364. doi: 10.1016/S0300-9084(02)01421-9.
- Riley MA et Wertz JE (2002b). Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annual Reviews in Microbiology*, 56(1): 117-137. doi: 10.1146/annurev.micro.56.012302.161024.
- Robertson A, Tirado C, Lobstein T, Jermini M, Knai C, Jensen JH, Ferro-Luzzi A et James WP (2003). Food and health in Europe: a new basis for action. *WHO Regional Publications. European series*(96): i-xvi, 1-385, back cover.

- Rodas AM, Ferrer S et Pardo I (2003). 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Systematic and Applied Microbiology*, 26(3): 412-422. doi: <http://dx.doi.org/10.1078/072320203322497446>
- Rodgers S (2001). Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures—a review. *Trends in Food Science & Technology*, 12(8): 276-284. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/s0924-2244\(01\)00093-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0924-2244(01)00093-0)
- Rodgers S (2003). Potential applications of protective cultures in cook-chill catering. *Food Control*, 14(1): 35-42. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/s0956-7135\(02\)00050-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0956-7135(02)00050-6)
- Rodtong S et Tannock G (1993). Differentiation of *Lactobacillus* strains by ribotyping. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(10): 3480-3484.
- Rogers L et Whittier E (1928). Limiting factors in the lactic fermentation. *Journal of Bacteriology*, 16(4): 211.
- Roissart H et Luquet FM (1994). Bacteries Lactiques: Aspects fondamentaux et technologiques (Vol. 2). *Lorica, Grenoble, France, 1*: 605.
- Ross RP, Morgan S et Hill C (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, 79(1): 3-16. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00174-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00174-5).
- Rossello-Mora R et Amann R (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 25(1): 39-67. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-6445\(00\)00040-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-6445(00)00040-1)
- Ruiz FO, Gerbaldo G, Asurmendi P, Pascual LM, Giordano W et Barberis IL (2009). Antimicrobial activity, inhibition of urogenital pathogens, and synergistic interactions between *Lactobacillus* strains. *Current Microbiology*, 59(5): 497-501. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-009-9465-0>
- Saleem F, Ahmad S, Yaqoob Z et Rasool SA (2009). Comparative study of two bacteriocins produced by representative indigenous soil bacteria. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Science*, 22(3): 252-258.
- Salveti E, Fondi M, Fani R, Torriani S et Felis GE (2013). Evolution of lactic acid bacteria in the order Lactobacillales as depicted by analysis of glycolysis and pentose phosphate pathways. *Systematic and Applied Microbiology*, 36(5): 291-305. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2013.03.009>
- Samel SA, Marahiel MA et Essen L-O (2008). How to tailor non-ribosomal peptide products—new clues about the structures and mechanisms of modifying enzymes. *Molecular Biosystems*, 4(5): 387-393. doi: <http://dx.doi.org/10.1039/b717538h>
- Sarkar PK, Hasenack B et Nout MJR (2002). Diversity and functionality of *Bacillus* and related genera isolated from spontaneously fermented soybeans (Indian Kinema) and locust beans (African Soumbala). *International Journal of Food Microbiology*, 77(3): 175-186. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00124-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00124-1)

- Sarmadi BH et Ismail A (2010). Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*, 31(10): 1949-1956. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2010.06.020>
- 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. doi: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-8-186>.
- Savadogo A, Ouattara CA, Bassole HNI et Traore AS (2006). Bacteriocins and lactic acid bacteria-a minireview. *African Journal of Biotechnology*, 5(9): 678-683. doi: <http://dx.doi.org/10.5897/AJB05.388>.
- Savadogo A, Ouattara CA, Bassole IH et Traore AS (2004a). Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Burkina Faso fermented milk. *Pakistan Journal of Nutrition*, 3(3): 174-179.
- Savadogo A, Ouattara CAT, Savadogo PW, Barro N, Ouattara AS et Traoré AS (2004b). Identification of exopolysaccharides-producing lactic acid bacteria from Burkina Faso fermented milk samples. *African Journal of Biotechnology*, 3(3): 189-194. doi: <http://dx.doi.org/10.5897/AJB2004.000-2034>
- Savadogo A, Ouattara CAT, Savadogo PW, Ouattara AS, Barro N et Traore AS (2004c). Microorganisms involved in Fulani traditional fermented milk in Burkina Faso. *Pakistan Journal of Nutrition*, 3(2): 134-139.
- Savadogo A, Ouattara CAT et Traore AS (2007). Potential of Lactic Acid Bacteria in Human Nutrition. *Food*, 1(1): 79-84.
- Savadogo A, Tapi A, Chollet M, Wathelet B, Traoré A et Jacques P (2011). Identification of surfactin producing strains in Soumbala and Bikalga fermented condiments using polymerase chain reaction and matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry methods. *International Journal of Food Microbiology*, 151(3): 299-306. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.022>
- Savadogo A et Traore AS (2011). La flore microbienne et les propriétés fonctionnelles des yaourts et laits fermentés. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 5(5): 2057-2075. doi: <http://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v5i5.28>.
- Scheirlinck I, Van der Meulen R, Vrancken G, De Vuyst L, Settanni L, Vandamme P et Huys G (2009). Polyphasic taxonomic characterization of *Lactobacillus rossiae* isolates from Belgian and Italian sourdoughs reveals intraspecific heterogeneity. *Systematic and Applied Microbiology*, 32(2): 151. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2008.12.006>
- Scheldeman P, Pil A, Herman L, De Vos P et Heyndrickx M (2005). Incidence and diversity of potentially highly heat-resistant spores isolated at dairy farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3): 1480-1494. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.71.3.1480-1494.2005>

- Schleifer KH, Ehrmann M, Krusch U et Neve H (1991). Revival of the species *Streptococcus thermophilus* (ex Orla-Jensen, 1919) nom. rev. *Systematic and Applied Microbiology*, 14(4): 386-388. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/s0723-2020\(11\)80314-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0723-2020(11)80314-0)
- Schwarzer D, Finking R et Marahiel MA (2003). Nonribosomal peptides: from genes to products. *Natural Product Reports*, 20(3): 275-287. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/chin.200338264>
- Severinov K, Semenova E, Kazakov A, Kazakov T et Gelfand MS (2007). Low-molecular-weight post-translationally modified microcins. *Molecular Microbiology*, 65: 1380-1394. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05874.x>
- Shand RF et Leyva KJ (2007). Peptide and protein antibiotics from the domain archaea: halocins and sulfolobocins. In Riley MA et Chavan MA (Ed.), *Bacteriocins: ecology and evolution*. Berlin (Germany): Springer Berlin Heidelberg. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, p93-109. doi: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-36604-1_5.
- Sharples GJ et Lloyd RG (1990). A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. *Nucleic Acids Research*, 18(22): 6503-6508. doi: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/18.22.6503>
- Shaw BG et Harding CD (1989). *Leuconostoc gelidum* sp. nov. & *Leuconostoc carnosum* sp. nov. from chill-stored meats. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39(217-223). doi: <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-39-3-217>
- Sheppard SK, Jolley KA et Maiden MC (2012). A gene-by-gene approach to bacterial population genomics: whole genome MLST of *Campylobacter*. *Genes*, 3(2): 261-277. doi: <http://dx.doi.org/10.3390/genes3020261>
- Sieber SA et Marahiel MA (2005). Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: approaches to new antibiotics. *Chemical Reviews*, 105(2): 715-738. doi: <http://dx.doi.org/10.1021/cr0301191>
- Skaugen M, Cintas LM et Nes IF (2003). Genetics of bacteriocin production in lactic acid bacteria. In Wood BJB et Warner PJ (Ed.), *Genetics of Lactic Acid Bacteria*: Springer, p225-260. doi: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4615-0191-6_8.
- Slepecky RA et Hemphill HE (2006). What is a *Bacillus*? In Doi RH et Mcgloghlin M (Ed.), *Biology of Bacilli: Applications to industry*. Boston: Butterworth-Heinemann, p1-21. doi:
- St Georgiev V (1990). Immunomodulatory activity of small peptides. *Trends in Pharmacological Sciences*, 11(9): 373-378. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0165-6147\(90\)90183-9](http://dx.doi.org/10.1016/0165-6147(90)90183-9)
- Stachelhaus T et Marahiel MA (1995). Modular structure of genes encoding multifunctional peptide synthetases required for non-ribosomal peptide synthesis. *FEMS Microbiology Letters*, 125(1): 3-14. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07328.x>

- Stackebrandt E et Goebel BM (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(4): 846-849. doi: <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-44-4-846>
- Stahl CH, Callaway TR, Lincoln LM, Lonergan SM et Genovese KJ (2004). Inhibitory activities of colicins against *Escherichia coli* strains responsible for postweaning diarrhea and edema disease in swine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(8): 3119-3121.
- Stanton C, Gardiner G, Lynch PB, Collins JK, Fitzgerald G et Ross RP (1998). Probiotic cheese. *International Dairy Journal*, 8(5): 491-496.
- Stein T (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56(4): 845-857. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x>
- Strieker M, Tanović A et Marahiel MA (2010). Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics. *Current Opinion in Structural Biology*, 20(2): 234-240. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sbi.2010.01.009>
- Sutyak KE, Wirawan RE, Aroutcheva AA et Chikindas ML (2008). Isolation of the *Bacillus subtilis* antimicrobial peptide subtilosin from the dairy product-derived *Bacillus amyloliquefaciens*. *Journal of Applied Microbiology*, 104(4): 1067-1074. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03626.x>.
- Švec P et Franz CMAP (2014). The genus *Enterococcus*. In Holzapfel WH et Wood BJB (Ed.), *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*. New York: John Wiley & Sons, p175-211. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/9781118655252.ch15>
- Švec P, Vancanneyt M, Seman M, Snauwaert C, Lefebvre K, Sedláček I et Swings J (2005). Evaluation of (GTG) 5-PCR for identification of *Enterococcus* spp. *FEMS Microbiol. Lett.*, 247(1): 59-63. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.femsle.2005.04.030>
- 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: 13-16.
- Tagg JR, Dajani AS et Wannamaker LW (1976). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriological Reviews*, 40(3): 722.
- Tailliez P, Tremblay J, Ehrlich SD et Chopin A (1998). Molecular diversity and relationship within *Lactococcus lactis*, as revealed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *Systematic and Applied Microbiology*, 21(4): 530-538. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/s0723-2020\(98\)80065-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0723-2020(98)80065-9)
- Tambadou F (2014). Étude de la production de peptides non-ribosomiques chez des souches de *Paenibacillus*. PhD Thesis, Université de La Rochelle, La Rochelle, 222p.

- Tannock G, Tilsala-Timisjarvi A, Rodtong S, Ng J, Munro K et Alatosava T (1999). Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage, and yoghurt by 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9): 4264-4267.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH et Swaminathan B (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(9): 2233.
- Terlabie NN, Sakyi-Dawson E et Amoa-Awua WK (2006). The comparative ability of four isolates of *Bacillus subtilis* to ferment soybeans into dawadawa. *International Journal of Food Microbiology*, 106(2): 145-152. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.05.021>
- Thomas X, Destoumieux-Garzon D, Peduzzi J, Afonso C, Blond A, Birlirakis N, Goulard C, Dubost L, Thai R, Tabet J-C et Rebuffat S (2004). Siderophore peptide, a new type of post-translationally modified antibacterial peptide with potent activity. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 28233-28242. doi: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m400228200>
- Tosato V, Albertini AM, Zotti M, Sonda S et Bruschi CV (1997). Sequence completion, identification and definition of the fengycin operon in *Bacillus subtilis* 168. *Microbiology*, 143(11): 3443-3450. doi: <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-143-11-3443>.
- Tourasse NJ et Kolstø A-B (2008). Survey of group I and group II introns in 29 sequenced genomes of the *Bacillus cereus* group: insights into their spread and evolution. *Nucleic Acids Research*, 36(14): 4529-4548. doi: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkn372>
- Trautner BW, Hull RA et Darouiche RO (2005). Colicins prevent colonization of urinary catheters. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(2): 413-415. doi: <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dki228>
- Trivedi D, Jena PK et Seshadri S (2014). Colicin E2 Expression in *Lactobacillus brevis* DT24, a vaginal probiotic isolate, against uropathogenic *Escherichia coli*. *ISRN Urology*, 2014: 7p. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/869610>.
- Trontel A, Baršić V, Slavica A, Šantek B et Novak S (2010). Modelling the effect of different substrates and temperature on the growth and lactic acid production by *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531T in batch process. *Food Technology and Biotechnology*, 48(3): 352-361.
- Tsuge K, Akiyama T et Shoda M (2001). Cloning, sequencing, and characterization of the iturin A operon. *Journal of Bacteriology*, 183(21): 6265-6273.
- Tuncer Y et Ozden B (2010). Partial biochemical characterization of nisin-like bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* YBD11 isolated from Boza, a traditional fermented Turkish beverage. *Rom Biotechnol Lett*, 15(1): 4940-4948.

- Uaboi-Egbenni PO, Okolie PN, Sobande AO, Alao O, Teniola O et Bessong PO (2009). Identification of subdominant lactic acid bacteria in dawadawa (a soup condiment) and their evolution during laboratory-scale fermentation of *Parkia biglobosa* (African locust beans). *African Journal of Biotechnology*, 8(25): 7241-7248.
- Ueda K, Seki T, Kudo T, Yoshida T et Kataoka M (1999). Two distinct mechanisms cause heterogeneity of 16S rRNA. *Journal of Bacteriology*, 181(1): 78-82.
- Ukwuru MU et Ibeneme CI (2014). Biotechnological Properties of Microorganisms Isolated from Traditional Fermented Foods. *Focusing on Modern Food Industry*, 3(3): 9-18.
- van de Guchte M, Serror P, Chervaux C, Smokvina T, Ehrlich SD et Maguin E (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82(1-4): 187-216.
- van Heel AJ, de Jong A, Montalbán-López M, Kok J et Kuipers OP (2013). BAGEL3: automated identification of genes encoding bacteriocins and (non-) bactericidal posttranslationally modified peptides. *Nucleic Acids Research*, 41(W1): W448-W453.
- Vancanneyt M, Lombardi A, Andrighetto C, Knijff E, Torriani S, Björkroth KJ, Franz CM, Moreno MRF, Revets H et De Vuyst L (2002). Intraspecies genomic groups in *Enterococcus faecium* and their correlation with origin and pathogenicity. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(3): 1381-1391. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.68.3.1381-1391.2002>
- Vandamme P, De Bruyne K et Pot B (2014). Phylogenetics and systematics. In Holzapfel WH et Wood BJB (Ed.), *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*. New York: John Wiley & Sons, Ltd., p31-44.
- Vandamme P, Pot B, Falsen E, Kersters K et Devriese LAI (1996a). Taxonomic Study of Lancefield Streptococcal Groups C, G, and L (*Streptococcus dysgalactiae*) and Proposal of *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* subsp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46(3): 774-781. doi: <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-47-2-605>
- Vandamme P, Pot B, Gillis M, De Vos P, Kersters K et Swings J (1996b). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews*, 60(2): 407-438.
- Vaneechoutte M, Rossau R, De Vos P, Gillis M, Janssens D, Paepe N, De Rouck A, Fiers T, Claeys G et Kersters K (1992). Rapid identification of bacteria of the Comamonadaceae with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiology Letters*, 93(3): 227-233. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0378-1097\(92\)90467-3](http://dx.doi.org/10.1016/0378-1097(92)90467-3)
- Verma AK, Banerjee R, Dwivedi HP et Juneja VK (2014). Bacteriocins: Potential in Food Preservation. In Batt CA et Tortorello ML (Ed.), *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)* (Vol. 1): Elsevier, p180-186. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00029-X>.

- Vermeiren L, Devlieghere F et Debevere J (2004). Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 96(2): 149-164. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.016>
- Versalovic J, Koeuth T et Lupski R (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to finerprinting of bacterial enomes. *Nucleic Acids Research*, 19(24): 6823-6831. doi: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/19.24.6823>
- Versalovic J, Koeuth T, Zhang Y-H, McCabe ER et Lupski JR (1992). Quality control for bacterial inhibition assays: DNA fingerprinting of microorganisms by rep-PCR. *Screening*, 1(3): 175-183. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0925-6164\(92\)90013-u](http://dx.doi.org/10.1016/0925-6164(92)90013-u)
- Versalovic J et Lupski JR (1998). Interspersed repetitive sequences in bacterial genomes. In de Bruijn FJ, Lupski JR et Weinstock GM (Ed.), *Bacterial Genomes*: Springer US, p38-48. doi: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4615-6369-3_5
- Vignolo G, Fadda S, De Kairuz M, de Ruiz Holgado AP et Oliver G (1996). Control of *Listeria monocytogenes* in ground beef by 'Lactocin 705', a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 705. *International Journal of Food Microbiology*, 29(2): 397-402. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00038-0](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605(95)00038-0).
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de Lee T, Hornes M, Friters A, Pot J, Paleman J et Kuiper M (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23(21): 4407-4414. doi: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/23.21.4407>
- Wallbanks S, Martinez-Murcia AJ, Fryer JL, Phillips BA et Collins MD (1990). 16S rRNA sequence determination for members of the genus *Carnobacterium* and related lactic acid bacteria and description of *Vagococcus salmoninarum* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40(3): 224-230. doi: <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-40-3-224>
- Walton JD (2006). HC-toxin. *Phytochemistry*, 67: 1406-1413. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.05.033>
- Wang H et Ng T (1999). Natural products with hypoglycemic, hypotensive, hypocholesterolemic, antiatherosclerotic and antithrombotic activities. *Life sciences*, 65(25): 2663-2677. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/s0024-3205\(99\)00253-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0024-3205(99)00253-2)
- Wang Y, Henz ME, Fregeau Gallagher NL, Chai S, Gibbs AC, Yan LZ, Stiles ME, Wishart DS et Vederas JC (1999). Solution structure of carnobacteriocin B2 and implications for structure-activity relationships among type IIa bacteriocins from lactic acid bacteria. *Biochemistry*, 38(47): 15438-15447. doi: <http://dx.doi.org/10.1021/bi991351x>.
- Ward DM, Weller R et Bateson MM (1990). 16S rRNA sequences reveal uncultured inhabitants of a well-studied thermal community. *FEMS Microbiology Reviews*, 6(2-3): 105-115. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1990.tb04088.x>

- Wattiau P, Renard M-E, Ledent P, Debois V, Blackman G et Agathos S (2001). A PCR test to identify *Bacillus subtilis* and closely related species and its application to the monitoring of wastewater biotreatment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(5-6): 816-819. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s002530100691>
- Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O, Krichevsky MI, Moore LH, Moore WEC et Murray RGE (1987). International Committee on Systematic Bacteriology. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37: 463-464. doi: <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-37-4-463>
- Wegmann U, O'Connell-Motherway M, Zomer A, Buist G, Shearman C, Canchaya C, Ventura M, Goesmann A, Gasson MJ et Kuipers OP (2007). Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *Journal of Bacteriology*, 189(8): 3256-3270. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/jb.01768-06>
- Weidner S, Arnold W et Puhler A (1996). Diversity of uncultured microorganisms associated with the seagrass *Halophila stipulacea* estimated by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(3): 766-771.
- Weis F, Beiras-Fernandez A et Schelling G (2008). Daptomycin, a lipopeptide antibiotic in clinical practice. *Current Opinion in Investigational Drugs (London, England: 2000)*, 9(8): 879-884.
- Wiedemann I, Böttiger T, Bonelli RR, Schneider T, Sahl H-G et Martínez B (2006). Lipid II-based antimicrobial activity of the lantibiotic plantaricin C. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4): 2809-2814. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.72.4.2809-2814.2006>.
- Willey JM et van Der Donk WA (2007). Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Annu. Rev. Microbiol.*, 61: 477-501. doi: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093501>
- Williams AG et Banks JM (1997). Proteolytic and other hydrolytic enzyme activities in non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) isolated from Cheddar cheese manufactured in the United Kingdom. *International Dairy Journal*, 7(12): 763-774. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/s0958-6946\(97\)00092-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0958-6946(97)00092-7)
- Wilson K-A, Kalkum M, Ottesen J, Yuzenkova J, Chait BT, Landick R, Muir T, Severinov K et Darst SA (2003). Structure of microcin J25, a peptide inhibitor of bacterial RNA polymerase, is a lassoed tail. *Journal of American Chemistry Society*, 125: 12475-12483. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/chin.200404157>
- Wirawan RE, Klesse NA, Jack RW et Tagg JR (2006). Molecular and genetic characterization of a novel nisin variant produced by *Streptococcus uberis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(2): 1148-1156. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.72.2.1148-1156.2006>
- Woese CR (1987). Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51(2): 221.

- Woese CR et Fox GE (1977). The concept of cellular evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 10(1): 1-6. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/bf01796132>
- Woese CR, Kandler O et Wheelis ML (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(12): 4576-4579. doi: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.87.12.4576>
- Worobo RW, Henkel T, Sailer M, Roy KL, Vederas JC et Stiles ME (1994). Characteristics and genetic determinant of a hydrophobic peptide bacteriocin, carnobacteriocin A, produced by *Carnobacterium piscicola* LV17A. *Microbiology*, 140(3): 517-526. doi: <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-140-3-517>.
- Wu X-Y, Walker MJ, Hornitzky M et Chin J (2006). Development of a group-specific PCR combined with ARDRA for the identification of *Bacillus* species of environmental significance. *Journal of Microbiological Methods*, 64(1): 107-119. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2005.04.021>
- Wunschel D, Fox KF, Black GE et Fox A (1995). Discrimination among the *B. cereus* group, in comparison to *B. subtilis*, by structural carbohydrate profiles and ribosomal RNA spacer region PCR. *Systematic and Applied Microbiology*, 17(4): 625-635. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/s0723-2020\(11\)80085-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0723-2020(11)80085-8)
- Yarza P, Richter M, Peplies J, Euzéby J, Amann R, Schleifer K-H, Ludwig W, Glöckner FO et Rosselló-Móra R (2008). The All-Species Living Tree project: A 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. *Systematic and Applied Microbiology*, 31(4): 241-250. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2008.07.001>
- Yoneyama F, Fukao M, Zendo T, Nakayama J et Sonomoto K (2008). Biosynthetic characterization and biochemical features of the third natural nisin variant, nisin Q, produced by *Lactococcus lactis* 61-14. *Journal of Applied Microbiology*, 105(6): 1982-1990. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03958.x>.
- Yoneyama F, Imura Y, Ichimasa S, Fujita K, Zendo T, Nakayama J, Matsuzaki K et Sonomoto K (2009a). Lacticin Q, a lactococcal bacteriocin, causes high-level membrane permeability in the absence of specific receptors. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(2): 538-541. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01827-08>.
- Yoneyama F, Imura Y, Ohno K, Zendo T, Nakayama J, Matsuzaki K et Sonomoto K (2009b). Peptide-lipid huge toroidal pore, a new antimicrobial mechanism mediated by a lactococcal bacteriocin, lacticin Q. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(8): 3211-3217. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/aac.00209-09>

- Yoon J-H, Kang S-S, Mheen T-I, Ahn J-S, Lee H-J, Kim T-K, Park C-S, Kho YH, Kang KH et Park Y-H (2000). *Lactobacillus kimchii* sp. nov., a new species from kimchi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(5): 1789-1795. doi: <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-50-5-1789>
- Yost C et Nattress F (2000). The use of multiplex PCR reactions to characterize populations of lactic acid bacteria associated with meat spoilage. *Letters in Applied Microbiology*, 31(2): 129-133. doi: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00776.x>
- Yuwono SD et Kokugan T (2008). Study of the effects of temperature and pH on lactic acid production from fresh cassava roots in tofu liquid waste by *Streptococcus bovis*. *Biochemical Engineering Journal*, 40(1): 175-183. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2007.12.004>.
- Zouhir A, Hammami R, Fliss I et Hamida JB (2010). A new structure-based classification of Gram-positive bacteriocins. *The Protein Journal*, 29(6): 432-439. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s10930-010-9270-4>.

ANNEXES

Annexe 1 : Milieux de culture utilisés

1. Gélose nutritive (Plate Count Agar: Tryptone Glucose Yeast Agar)

Tryptone (5,0 g/l); Extrait de levure (2,5 g/l); glucose (1 g/l) ; agar (9,0 g/l) ; Eau qsp (1000 ml) ; pH7,0 ± 0,2.

Fabriquant : Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England

Stérilisation à l'autoclave pendant 15 min à 121°C.

2. Bouillon nutritif

Extrait de bœuf (1,0 g/l) ; extrait de levure (2 g/l) ; peptone (5,0 g/l) ; Chlorure de sodium (5,0 g/l) ; Eau qsp (1000 ml) ; pH6,8± 0,2 à 25°C.

Stérilisation à l'autoclave pendant 15 min à 121°C.

Fabricant: Liofilchem s.r.l. BACTERIOLOGY PRODUCT (Italy)

3. Bouillon Coeur – Cerveille ou Milieu BHI (Brain – Heart Infusion)

Infusion de cervelle de veau (200 g/l) ; infusion de cœur de bœuf (250 g/l) ; Bio-gelytone (10 g/l) ; chlorure de sodium (5 g/l) ; phosphate dipotassique (2,5 g/l) ; glucose (2 g/l) ; Eau qsp (1000 ml) ; pH7,4

Stérilisation à l'autoclave pendant 15 min à 121°C.

Fabricant : BioMérieux sa (France)

4. MRS agar

Peptone (10) ; Extrait de viande (10) ; Extrait de levure (5 g/l) ; Glucose (20 g/l) ; Tween 80 (1 ml) ; Phosphate dipotassique (2 g/l) ; Acétate de sodium (5 g/l) ; Citrate d'ammonium (2 g/l) ; Sulfate de magnésium (0,20 g/l) ; Sulfate de manganèse (0,05 g/l) ; Agar (15 g/l) ; Eau qsp (1000 ml) ; pH5,7±0,1 à 25°C. Stérilisation à l'autoclave pendant 15 min à 121°C.

5. Bouillon MRS

Peptone (10 g/l) ; Extrait de viande (10 g/l) ; Extrait de levure (5 g/l) ; Glucose (20 g/l) ; Tween 80 (1 ml) ; Phosphate dipotassique (2 g/l) ; Acétate de sodium (5 g/l) ; Citrate d'ammonium (2 g/l) ; Sulfate de magnésium (0,20 g/l) ; Sulfate de manganèse (0,05 g/l) ; Eau qsp (1000 ml) ; pH $5,7 \pm 0,1$ à 25°C. Stérilisation à l'autoclave pendant 15 min à 121°C.

6. Eau physiologique stérile

NaCl (9g/l) ; Eau qsp (1000 ml). Stérilisation à l'autoclave pendant 15 minutes à 121°C.

7. Kliger Iron Agar

Formule (g/l): Proteose peptone (20g) ; Chlorure de sodium (5g) ; Extrait de levure (3g) ; Extrait de viande (3g) ; Sulfate de fer (0,2g) ; Thiosulfate de sodium (0,3g) ; Lactose (10g) ; Glucose (1g) ; Rouge phénol (0,024g) ; Agar (11g) ; Eau qsp (1000 ml) ; pH $7,4 \pm 0,2$ à 25°C

Préparation : Suspendre 53,5g dans 1 000 ml d'eau distillée puis chauffer jusqu'à dissolution totale. Répartir et autoclaver à 121°C pendant 15 min.

8. Mannitol motility test agar

Formule type (g/l) : Peptone (20g) ; Mannitol (2g) ; Nitrate de potassium (1g) ; Rouge phénol (0,04g) ; Agar (5g) ; Eau qsp (1000 ml) ; pH $7,3 \pm 0,2$ à 25°C.

Préparation : Suspendre 28g dans 1 000 ml d'eau distillée puis chauffer jusqu'à dissolution totale. Répartir et autoclaver à 121°C pendant 15 min.

9. Gélose trypticase soja

Formule : Peptone trypsique de caséine : 15 g/l ; Peptone papainique de soja : 5 g/l ; Chlorure de sodium : 5 g/l ; Gélose : 15 g/l ; Eau qsp : 1000 ml ; pH = $7,3 \pm 0,2$ à 25°C

10. Bouillon Trypticase- soja

Formule: bio-Trypcase : 17 g/l; bio-Soyase : 3 g/l ; Chlorure de sodium : 5 g/l ; Phosphate bipotassique : 2,5 g/l ; Glucose : 2,5 g/l ; Eau qsp : 1000 ml; pH = $7,3 \pm 0,2$ à 25°C

Annexe 2 : Séquences nucléotidiques partielles du gène 16S rRNA des quatre souches de *Lactobacillus*

Souche S3 (*Lactobacillus* sp.)

GGTGGTGTGTAGGGAAAAAGTGCTCAGGGCCTGGATACTTCCTTTTTTTCATTTGCAAA
AGACCTGTTTTTTTTGGTGCCTTACCTGTCAGGCAGGAACGACACCCTACCTACCGGACTTT
CAGAATA

Souche S4 (*Lactobacillus* sp.)

TGTTTCGGCGTAAAGTTGTTAGGGAAGACAAGTCCGTTCAATAGGGCGGACCTTGACGGT
ACCCAGAAAGCCACGGCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGC
GTTGTCCGGATTTATTGGGCAAAGATTTGCGCACTTCGACCCAGTTGTTCTGGCTCCTGCC
GGATATCGGGTCCTTGCTCCCT

Souche Y6 (*Lactobacillus* sp.)

TGGTTTCGGACGAGCTCTGTTGTGGAAGAACAAGTACCGTTCGAAGGCGGTACCTCGGTA
CCCCAGAAAGCCACGGCCTACGTGCCAGCAGCCGCGGTACGGTGGCAAGCGTTGTCCGG
ATTTATTGGCGAGAAGATTTCCCTTAGGGGCCGCCAGAACACCCCCCAGGAGGTGTTAT
CAGCGGACCGGTTTCGTCC

Souche Lf1 (*Lactobacillus plantarum* strain Lf1)

TTTTCGGCGAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAAGGCGGTACCTTGACG
GTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG
GCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGCGTAAAGTCAGGTTACCTCACGGACACTCCGTGGT
GCCGAGAAAGCTCTCCTTCTACGGACTTCGTATCTT

Légende : A = Adénine ; T = Thymines ; C = Cytosine et G = Guanine

Annexe 3 : Les Articles publiés

Current Research in Microbiology and Biotechnology

Vol. 1, No. 3 (2013): 80-88

Research Article

Open Access



Bioactive molecules from bacteria strains: case of bacteriocins producing bacteria isolated from foods

Essodolom TAALE*, Aly SAVADOGO, Cheickna ZONGO, Andre J ILBOUDO and Alfred S TRAORE

Centre de Recherche en Sciences Biologiques, Alimentaires et Nutritionnelles (CRSBAN), University of Ouagadougou, 03BP7131 OUAGADOUGOU03, Ouagadougou, Burkina Faso

* Corresponding author: Essodolom TAALE, [email: taaleernest12@hotmail.com](mailto:taaleernest12@hotmail.com); Tel: (+226) 78764090, Fax: (+226) 50337373

Received: 01 March 2013

Accepted: 12 March 2013

Online: 14 April 2013

ABSTRACT

21 bacteria strains were isolated from traditional fermented food (*Soumbala*, *Bikalga*, *indigenous yoghurt* and *fermented milk*) using microbiology standard methods. Morphological and biochemistry analyses were done. Nine strains were selected as presumed belonging to lactic acid bacteria (LAB). These strains were characterized at species level by amplifying 16S-23S intergenic spacer region of different LAB using Polymerase Chain Reaction (PCR) with specific primers. Strains S3, S4, Y6 and Lf1 belonged to the genus *Lactobacillus*; and strains S2, S5, Y1, Y3 and Y5 to genus *Lactococcus*. The nine strains were tested for their antimicrobial activity. These activities were detected in cell-free culture supernatant fluids against *Micrococcus luteus* as indicator strain. The agar well diffusion methods was used for this purpose. All the nine strains were able to inhibit the growth of *Micrococcus luteus*. The strain S3 produced antimicrobial compounds that showed the highest inhibition zone (20.83 mm) and strain Y6 showed the lowest inhibition zone (08.25mm). The bacteriocin-like gene was amplified using specific primers. The antimicrobial compounds produced by the strains except strain Y1 can be assimilated to bacteriocins according to the tests performed. The kinetics studies were performed for optimum pH and determination of growth temperature of each strain. The result showed that strain Y5 can grow at pH 5.5 and 37°C and the maximum specific growth rate are respectively 0.175 h⁻¹ and 0.150 h⁻¹.

Keywords: Bacteriocins, PCR, Specific primers, Kinetics, Inhibition zone

INTRODUCTION

Soumbala, *Bikalga*, *fermented milk*, *yoghurt* and *attieke* are fermented foods which are widely consumed in Burkina Faso. *Soumbala* and *Bikalga* are condiments produced by traditional uncontrolled fermentation of *Parkia biglobosa* and *Hibiscus sabdariffa* seeds respectively. They are excellent sources of proteins with essential amino acids and also contain lipids, carbohydrates, essential fatty acids and vitamins [1-2]. *Soumbala* and *Bikalga* are used as a low-cost meat substitute by many families. These condiments improve nutritional values of foods as well as sensory properties as taste enhancer [3]. Lactic acid bacteria (LAB) are found naturally in a variety of environmental habitats, including dairy, meat, fish, vegetable, cereal and plant

environments, where fermentation can occur. LAB is typically involved in a large number of spontaneous food fermentations [4]. Historically, the traditional roles for many LAB have been as starter cultures to drive food and dairy fermentations, leading to their widespread human consumption and generally recognized as safe (GRAS) [5].

The LAB can produce antimicrobial substances able to inhibit the growth of pathogenic and spoilage microorganisms in foods. The primary antimicrobial effect exhibited by LAB is the production of lactic acid and reduction of pH [6]. In addition, LAB can produce various antimicrobial compounds, which can be

classified as low-molecular-carbon mass compounds such hydrogen peroxide (H₂O₂), carbon dioxide (CO₂), diacetyl(2,3-butanedione), uncharacterized compounds and high-molecular-mass compounds like bacteriocins [7-9]. Bacteriocins are ribosomal synthesized antimicrobial peptides produced by one bacterium that are active against other bacteria, either in the same species (narrow spectrum), or across genera (broad spectrum) and, as with host defense peptides, cell signaling mechanism can also be involved [10].

The location of bacteriocins genes fear to be chromosomal [11-12] or plasmid [13-14]. Genes involved in the production of bacteriocins are generally organized as operon. Structure genes and immunity genes are generally co-transcribed except when they are disjoint as in the carnobacteriocin A system [15]. Regardless of their membership class, all bacteriocins synthesized by LAB are secreted by ABC transporters [16-17]. All bacteriocins are produced by ribosome in the cytoplasm of the producing cell. They are always synthesized as inactive precursor called "prebactériocin". This peptide is mature during or immediately after its secretion into the external environment and is recognized by the carrier. The peptide "signal" or "leader" provides for secretion of the bacteriocin in the environment and protects the bacteria against the action of its own bactériocin [16]. The production of bacteriocins is often regulated by a quorum sensing system, a mechanism allowing certain genes to be expressed in terms of the density of the bacterial population in the medium.

The objective of this study was to characterize by molecular techniques, bacteria strains from fermented foods producing bioactive molecules as bacteriocins isolated from some fermented foods widely consumed in Burkina Faso.

MATERIAL AND METHODS

Biological material

21 strains were isolated from different fermented foods at Microbiology Laboratory of CRSBAN. Strains S1, S2, S3 and S4 were isolated from *Soumbala*. Strains B1, B2, B3, B4 and B5 were isolated from *Bikalga*. Strains Y1, Y2, Y3, Y4, Y5, Y6 were isolated from traditional *yoghurt*. Strains Lf1, Lf2, Lf3, Lf4, Lf5 were isolated from local fermented milk. The strains were stored at +4°C in brain heart infusion broth supplemented with 15% of glycerol. This study was conducted from June 2011 to January 2012 at Microbiology Laboratory and Laboratory of Molecular Biology of CRSBAN.

Isolation of lactic acid bacteria

21 strains were inoculated by streaking tight on PCA medium and incubated at 37°C for 24 hours. Each isolated colony was reinoculated in MRS broth [18], incubated at 37°C under CO₂ atmosphere and checked for purity by streaking on MRS agar [18] and incubated under CO₂ atmosphere at 37°C for 24 to 72 hours. Before experimental use, all LAB strains were

recovered in MRS broth and were incubated at 37°C for 16 to 24 hours.

Screening for antagonistic activity and determination of antimicrobial spectra

The agar well diffusion assay (AWDA) [9, 19] was used to determine antibacterial activities against *Micrococcus luteus*. PCA (Plate Count Agar, Liofilchem, Italy) plates were overlaid with 5 ml Brain-heart Infusion broth (BioMarieux sa, France) inoculated with an overnight culture of the indicator microorganism, *Micrococcus luteus* (106 UFC/ml). Wells (6 mm in diameter) were cut in the plates. LAB strains were grown in MRS broth at 37°C for 16 hours. Overnight bacterial culture was harvested by centrifugation (6000rpm, 15 min at room temperature) to obtain a cell-free supernatant (CFS). Samples were adjusted to pH 6.5 with 10N of NaOH to rule out acid inhibition. Afterwards, 5µl of CFS were placed in each well. The plates were then incubated aerobically for 24 h at 37°C and were subsequently examined for zones of inhibition. Inhibition was recorded as negative if no zone was observed around the agar well. Each antagonistic activity was related to the area of the inhibition zone displayed.

Biochemical and physiological characterization of selected isolates

Gram staining, oxidase activity [20], catalase activity, production of acetoin (VP) [21] and sporulation were biochemical tests performed. Cell morphology was determined with cells grown in MRS broth at 37°C for 16 hours by using optical microscopy with objectives X40 and X100 to see cell form, cellular arrangement and their motility. CO₂ and H₂ production from glucose were performed using Kliger Iron Agar (*Liofilchem*, Italy). Carbohydrate fermentation patterns were determined by the API 20E (API, BioMerieux, France) as described by the manufacturer and the identification was done by a computerized database programme provided by the same manufacturer.

Genetic identification of bacteriocin-producing LAB strain

Extraction of bacterial total DNA

The microbial isolate from which the CFS maintained its antibacterial activity throughout the characterization of antibacterial compounds was selected for genetic identification. Total cellular DNA was isolated according to QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook (Third Edition, 2010; QIAGEN) as described in page 56.

PCR amplifications

DNA amplification was conducted in a DNA thermal cycler TC-412 (Serial No.: 137370-2, United Kingdom) in order to determine the species affiliation of the tested bacterial isolates (Table 1). All specific-primers are provided by Eurofins MWG Operon (Germany). 50 µl of volume was used: 30 µl of Taq PCR Master Mix Kit (QIAGEN, France), 4 µl of each specific-primer, 8 µl of sterile water (QIAGEN, France) and 4 µl of DNA extract.

The amplification profile was 94°C for 5 min, 94°C for min, 30 cycles. 45 s, 53°C-60°C for 45 s, 72°C for 1 min and 72°C for 10

Table 1. Primers and PCR products for the nine studied lactic acid bacteria strains

Species/Strain	Primer Sequence	Target	PCR products	Ref
<i>Lactobacillus</i> sp./ S3, S4, Y6, Lf1	5'- GGA ATC TTC CAC AAT GGA GG - 3' 5'- CGC TTT ACG CCC AAT AAA TCC GG - 3'	16-23S rRNA gene spacer	450 bp	[22]
<i>Lactococcus</i> sp./ S2, S5, Y1, Y3, Y5	5'- CTT TGA GTG ATG CAA TTG CAT C - 3' 5'- CAC CGC TAC ACA TGG AG - 3'	16-23S rRNA gene spacer	<1000 bp	[23]
<i>Pediococcus</i> sp./ S2, S5, Y1, Y3, Y5	5'- GTA AAG TGG CGT GTG TAC CTC AAG- 3' 5'- CAC CGC TAC ACA TGG AG- 3'	16-23S rRNA gene spacer	ND	[23]
Bacteriocins / S3, S4, Y6, Lf1 S2, S5, Y1, Y3, Y5	5'- AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG - 3' 5'- CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA - 3'	16S rDNA gene	3500-4000 bp	[24]

ND: Not detected bp: pairs of bases

Electrophoresis

The presence of PCR products was determined by gel electrophoresis in 0.7% agarose gel containing ethidium bromide. Electrophoresis in Tris-borate-EDTA was performed at 150 volts for 30 min, and photographed under ultraviolet light illumination.

Kinetics study of selected isolates

Modeling the reactions

The kinetic model describes two reactions: effect of pH and temperature on the growth of selected isolates. Growth experiments were conducted in MRS broth using Microtest plates (Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH, Germany).

Growth rate model

The specific growth rate was given by the equation:
 $(DO'/DO) = \mu_{max} \cdot t + K$

Where:

OD = value of the optical density at the start of the exponential phase of growth

OD' = the value of the optical density at time t during the exponential growth phase.

μ_{max} = maximum specific growth rate, t = time, K = constant.

Fig.1 describes the curve of the pH-effect on specific growth rate. The growth pH range between 5-7. Fig.2 describes the curve of temperature-effect on growth rate. The optimal temperature growth of bacteria range between 30°C-40°C.

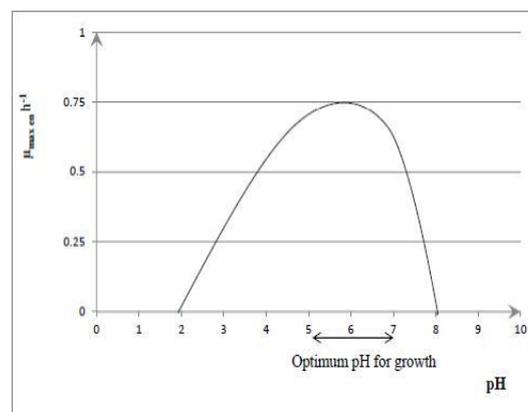


Figure 1. Description curve of pH-effect on specific growth rate for bacteria.

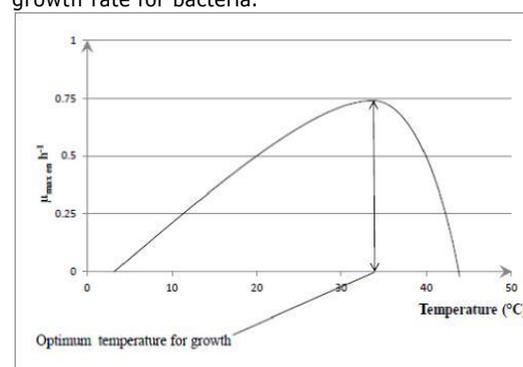


Figure 2. Description curve of the temperature-effect on specific growth rate

Influence of pH and temperature

The medium was inoculated with 1% v/v of inoculum. Test was made in triplicate. Growth was monitored for 24 hours by measuring each hour optical density (OD) at 650 nm using a typical reader μ quant (Bio-Tek)

instrument, Serial No.: 157904, USA) coupled to the computer managed by the KC junior (v1.31.5) software. The influence of pH on growth was studied at pH of 5; 5.5; 6.0; 6.5; 7.0 and 7.5 \pm 0.2. The pH was controlled by the addition of 10N NaOH or 6N HCl. The influence of temperature was studied at temperature of 25; 30; 37; 40 and 44°C at the optimum pH of growth of each selected isolates.

RESULTS AND DISCUSSION

Biochemical, morphological and physiological characteristics of isolated strains

The results for the study of biochemical, morphological and physiological characteristics of the nine selected strains as belonging to lactic acid bacteria are shown in Table 2. The cells form are spherical or rod, with pairs and chains arrangement. One strain Lf1 is single rod. All the strains were Gram positive, oxidase and catalase negative. No strain produced gas from glucose. Four strains were rods and five were spherical (Table 2). All strains were non motile and did not form spores (Table 2). Indeed, the lactic acid bacteria in their majority do not form spores but still manage to live in extreme conditions (Depletion of nutrient in the medium, high or very low variation of the salt concentration etc.) developing effective systems of protection allowing them to avoid death after stopping their growth [25- 26].

Sept strains produce acetoin (Table 2). Acetoin is one of intermediate compounds (volatile acetoin, acetaldehyde, diacetyl and lactone). These intermediates are responsible of flavor and aroma found in fermented foods especially dairy, as appreciated by consumers. Only strains S2 and S3 do not produce this metabolite. However, this study shows that lactic acid bacteria can produce acetoin not only fermenting lactose but also other sugars: this is the case of S4 and S5, strains isolated from *soumbala*, a nondairy product.

The existence of a betagalactosidase in bacteria confers the ability to ferment lactose effectively regardless of the bacterial permease. Ortho Nitro Phenyl Galactopyranoside (ONPG) reagent was able to detect this enzyme in strains Y1, Y3, Y5, Y6 and Lf1 (Table 2). These strains were isolated respectively from *yoghurt* (Y1, Y3, Y5 and Y6) and fermented milk (Lf1) two media rich in lactose. Betagalactosidase is absent in the four strains (S2, S3, S4 and S5) isolated from *soumbala*, a condiment produced by spontaneous alkaline fermentation of *neré* seeds. These results show that lactic acid bacteria use nutrients in their environment by conforming their respiratory chain. All nine strains ferment glucose and sucrose. But only strains Y1 and Y5 use lactose.

Antibacterial activities of selected lactic acid bacteria

The agar well diffusion assay (AWDA) [9, 19] was used to detect strains with antibacterial activities against *Micrococcus luteus*. The supernatant of nine strains of

lactic acid bacteria gave zones inhibition onto the indicator pathogenic strain (*Micrococcus luteus*) tested (Table 3).

The addition of 10N NaOH to adjust the pH of the supernatant to value of 6.5 had eliminated the inhibitory effects of organic acids including lactic acid and acetic acid. All strains had shown antibacterial activity against *Micrococcus luteus* (106 CFU / ml). This activity was evidenced by the appearance of inhibition zone around wells compared to non-appearance of inhibition zone around the control well. The diameter of inhibition zones (Table 3) range between 08.25 mm (lower activity observed for strain Y6) to 20.83 mm (higher activity observed for strain S3). Among *Lactobacillus* species, strain S3 produced the most effective antibacterial compounds against *Micrococcus luteus* (20.83 mm as diameter of inhibition). Recently, [27-28] it was reported that *Lactobacillus* species can produce antimicrobial substances which can be assimilated to bacteriocins and are active against *Micrococcus luteus*. Among *Lactococcus* species, the strain S5 produces most active inhibitory substance (20.33 mm of diameter of inhibition) against *Micrococcus luteus* (Fig.3). It has also been reported [29-30] that *Lactococcus* species can produce active antimicrobial substances like bacteriocins. The nine lactic acid bacteria strains inhibited the growth of *Micrococcus luteus* but at different spectrum of activity ranging from 08.25 mm (strain Y6) to 20.83 mm (strain S3). The spectrum activity varies within the same genus (08.25 mm to 20.83 mm for *Lactobacillus* sp. and 10.00 mm to 20.33 mm for *Lactococcus*). The difference observed in the spectra of activity of bacteriocins produced by the nine lactic acid bacteria strains could be due to the structural diversity of bacteriocins synthesized. In fact, the four classes of bacteriocins [31] known to date have different structures and different modes of action. The mode of action of bacteriocins is their "macroscopic" effect in a population of target bacteria. It is generally accepted that those bacteriocins produced by lactic acid bacteria act on target cells in two stages: adsorption of bacteriocin on the cell surface followed by a lethal effect [32]. Physiological state of the target bacteria plays a role in the mode of action of a bacteriocin [33]. The combined effect of different bacteriocins can increase activity and spectrum of action, especially by combining bacteriocins belonging to different classes [34]. The mechanism of action of the bacteriocins breaks up into three stages: the first stage consists of the fixing of peptide on the membrane of the target cell. During this stage, peptide adopts a three-dimensional conformation enabling to express its activity. The second stage consists with the insertion of the bacteriocin in the cytoplasmic membrane. During this stage, several antibacterial peptides are recruited to form a pore. These results indicate us that the lactic acid bacteria strains screened in the study are capable of synthesizing antimicrobial substances active on *Micrococcus luteus*. Thus those antimicrobial substances produced by our lactic acid bacteria strains can be assimilated to bacteriocins. LAB bacteriocins

comprise a heterogeneous group of physicochemical diverse ribosomally-synthesized peptides or proteins showing a narrow or broad antimicrobial activity spectrum against Gram-positive bacteria.

Table 2. Biochemical, morphology and physiological characters of selected strains

Characters	Strains								
	S2	S3	S4	S5	Y1	Y3	Y5	Y6	Lf1
Cell form	Spherical	Rod	Rod	Spherical	Spherical	Spherical	Spherical	Rod	Rod
Arrangement	Pairs	Chains	Chains	Pairs	Pairs	Pairs	Pairs	Chains	Single
Motility	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gas from	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucose and sporulation									
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ONPG	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Acetoin	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	+	-	+	-	-
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	-	-	-	-	+	+	+	+	-
Inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rhamnose	-	-	-	-	+	+	+	+	-
Melibiose	-	+	-	-	-	+	+	-	+
Arabinose	-	-	-	-	+	+	+	-	-
Citrate	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Presumptive identification	<i>Lc.</i>	<i>Lb.</i>	<i>Lb.</i>	<i>Lc.</i>	<i>Lc.</i>	<i>Lc.</i>	<i>Lc.</i>	<i>Lb.</i>	<i>Lb.</i>

+ = positive reaction; - = negative reaction; S = strains from Soumbala (S2, S3, S4, S5); Y = strains from *yoghurt* (Y1, Y3,

Table 3. Inhibition of *Micrococcus luteus* by bacteriocin produced by nine selected strains identified as lactic acid bacteria.

Strains	pH of the supernatant	pH adjusted	ΔpH	Diameter of inhibition (mm)
S2	6.12	6.5	0.38	16.17 ± 2.31
S3	6.06	6.5	0.44	20.83 ± 2.84
S4	6.02	6.5	0.48	13.00 ± 0.00
S5	4.83	6.5	1.67	20.33 ± 1.53
Y1	4.40	6.5	2.10	10.00 ± 1.80
Y3	6.03	6.5	0.47	15.00 ± 1.41
Y5	4.34	6.5	2.16	13.09 ± 0.83
Y6	5.77	6.5	0.73	08.25 ± 0.35
Lf1	4.32	6.5	2.18	12.50 ± 0.00

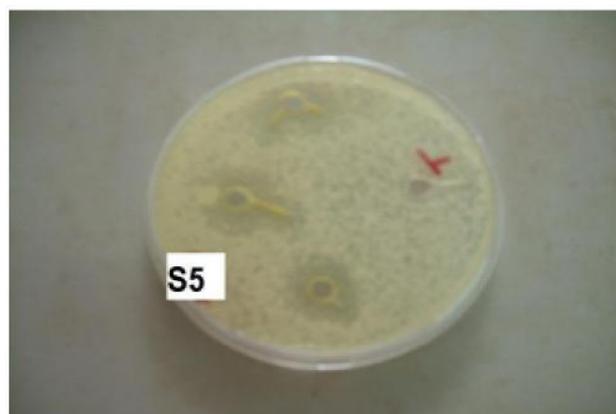


Figure 3. Inhibition of *Micrococcus luteus* by lactic acid bacteria strain S5 culture supernatant by the agar well diffusion assay. T: Negative control

Identification of selected lactic acid bacteria to genus level and screening of bacteriocins genes by PCR

The strains S3, S4, Y6 and Lf1 were amplified with the *Lactobacillus* species specific-primers, producing a product of 450bp, indicating that they were members of

Lactobacillus species (Fig.4). The same primers pairs were used by [22] but got product of 200bp.

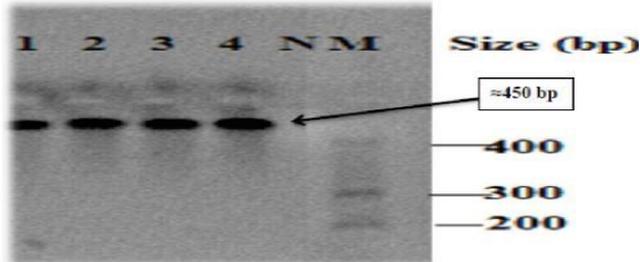


Figure 4. Species-specific PCR with primers pairs Lb1 and Lb2. Lane M: 100-bp DNA molecular mass marker, Lane 1: strain Lf1, Lane 2: strain Y6, Lane 3: strain S4, Lane 4: strain S3, Lane N: negative control.

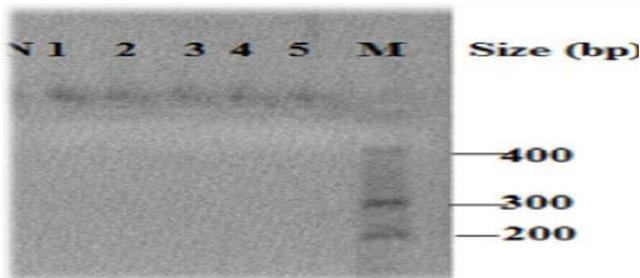


Figure 5. Species-specific PCR amplification with primers pairs Ped1 and Ped2. Lane N: negative control, Lane1: Strain S2, Lane2: strain S5, Lane3: strain Y1, Lane4: strain Y3, Lane 5: strain Y5.

The product of less 1000 bp were found when the strains S2, S5, Y1, Y3 and Y5 were amplified by *Lactococcus* species specific-primers, showing that these strains with spherical form belong to *Lactococcus* species [Fig.6-(b)]. But no result was found with the specific-primer designed for *Pediococcus* species (Fig.5).

The strains S2, S3, S4, S5, Y1, Y3, Y5, Y6 and Lf1 were amplified with the bacteriocins primers, producing a product 3500 – 4000bp. Only strain Y1 gave a negative result [Fig.6-(a)]. Those results indicate that the eight strains can produce antimicrobial compounds which can be assimilated to bacteriocins because they have bacteriocins genes.

Kinetics study of selected lactic acid bacteria: Determination of pH and temperature of growth

For all strains the specific growth rate at pH value of 5 was low. Thus, the optimum pH for growth of the nine selected lactic acid bacteria range between 5.5 to 7: pH 5.5 for strain Y5, pH 6 for strains S3, S4 and Lf1, pH 6.5 for strains S2, Y1, Y3 and Y6 and pH 7 for strain S5 (Table 4, Fig.7). The maximum specific growth rate varies from 0.007 h⁻¹ (lowest value observed for strain S2 at pH 6.5) to 0.222 h⁻¹ (highest value observed for strain S4 at pH 6). The pH value of 7 found for *Lactococcus* strain S5 are compatible because that strain were isolated from *soumbala*, a condiment obtained by uncontrolled alkaline fermentation of *neré* seeds.

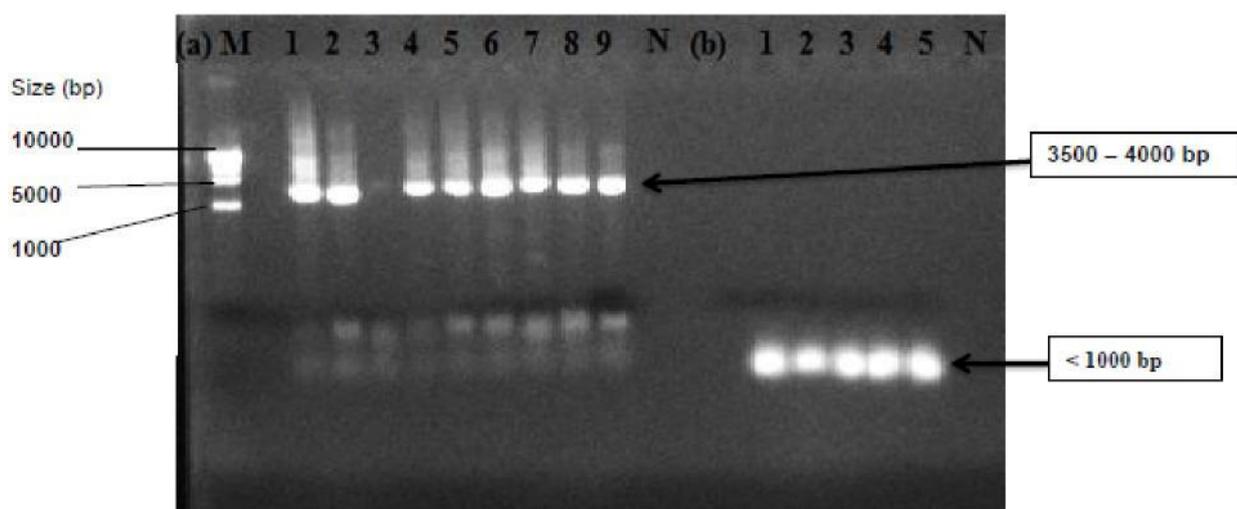
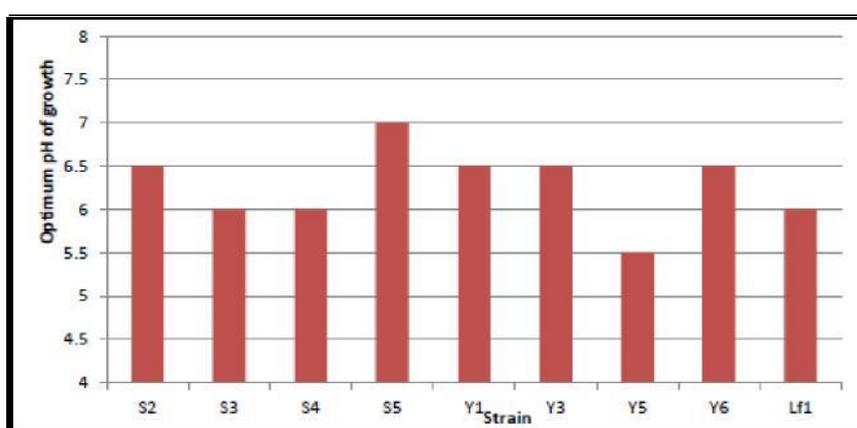


Figure 6. Electrophoresis gel of PCR. (a)-Detection of bacteriocins genes from the selected strains using primers pairs Bac1 and Bac2. Lane M: 1kb-DNA molecular mass marker, Lane1: Strain S2, Lane2: strain S5, Lane3: strain Y1, Lane4: strain Y3, Lane 5: strain Y5, Lane 6: strain S3, Lane 7: strain S4, Lane 8: strain Y6, Lane 9: strain Lf1, Lane N: negative control. (b)-Species-specific PCR with primers pairs Lc1 and Lc2. Lane1: Strain Y1, Lane2: strain Y3, Lane3: strain Y5, Lane4: strain S2. Lane 5: strain S5. Lane N: negative control.

Table 4. Maximum growth rate of selected lactic acid bacteria at uncontrolled pH

pH	Maximum growth rate (μ_{max}) in h ⁻¹					
	5	5.5	6	6.5	7	7.5
Strain S2	ND	0.021 ± 0.00	0.051 ± 0.01	0.072 ± 0.01	0.071 ± 0.02	0.044 ± 0.00
Strain S3	0.012 ± 0.00	0.019 ± 0.00	0.059 ± 0.02	0.052 ± 0.02	0.04 ± 0.04	0.04 ± 0.04
Strain S4	0.059 ± 0.01	0.157 ± 0.03	0.222 ± 0.02	0.209 ± 0.01	0.136 ± 0.07	0.104 ± 0.01
Strain S5	0.01 ± 0.00	0.011 ± 0.00	0.032 ± 0.01	0.042 ± 0.01	0.077 ± 0.02	0.045 ± 0.00
Strain Y1	0.047 ± 0.00	0.083 ± 0.01	0.142 ± 0.02	0.166 ± 0.01	0.141 ± 0.01	0.121 ± 0.01
Strain Y3	0.023 ± 0.02	ND	0.03 ± 0.00	0.079 ± 0.00	0.051 ± 0.02	0.046 ± 0.01
Strain Y5	0.087 ± 0.01	0.175 ± 0.07	0.116 ± 0.01	0.112 ± 0.02	0.111 ± 0.01	0.087 ± 0.03
Strain Y6	0.007 ± 0.00	0.015 ± 0.00	0.083 ± 0.07	0.127 ± 0.00	0.094 ± 0.05	0.041 ± 0.01
Strain Lf1	0.031 ± 0.01	ND	0.149 ± 0.01	0.135 ± 0.02	0.066 ± 0.00	0.055 ± 0.00

ND: Not detected

**Figure 7.** Optimum pH for growth of each selected lactic acid bacteria

The specific growth rate for each selected lactic acid bacteria at temperature value of 25°C and 44°C was low. The higher specific growth rate (0.259 h⁻¹) was observed at temperature values of 40°C (Table 5) for strain S3 (*Lactobacillus* sp.). Temperature 30°C, 37°C and 40°C are adequate temperatures (Table 5, Fig.8) of growth for the nine selected lactic acid bacteria strains subjected to this study. Indeed, among *Lactobacillus* species, strains S3, S4 and Y6 have an optimum growth temperature of 40°C, whereas it is 30°C for strain Lf1. The strain Lf1 is mesophilic *Lactobacillus* while S3, S4

and Y6 are thermophilic *Lactobacillus*. S2, S5 and Y5, three (03) *Lactococcus* species strains grew better at temperature of 37°C. 30°C of temperature is suitable for other *Lactococcus* species strains (Table 5, Fig.8). The maximum growth rate varies between 0.068 h⁻¹ (lowest value observed for Y3 strain at 30°C) to 0.259 h⁻¹ (highest value observed for strain S3 at 40°C). According to the literature, *Lactococcus* grow better at temperatures between 30 and 37°C.

Table 5. Maximum growth rate of selected lactic acid bacteria at controlled pH and uncontrolled temperature.

Temperature	Maximum growth rate (μ_{max} in h ⁻¹)				
	25°C	30°C	37°C	40°C	44°C
Strain S2 (pH6.5)	0.069± 0.04	0.093± 0.02	0.096± 0.05	0.068± 0.04	0.031± 0.04
Strain S3 (pH6)	0.042± 0.02	0.081± 0.01	0.151± 0.01	0.259± 0.02	0.047± 0.00
Strain S4 (pH6)	0.025± 0.02	0.029± 0.00	0.032± 0.00	0.097± 0.05	0.025± 0.00
Strain S5 (pH7)	0.002± 0.00	0.145± 0.04	0.153± 0.03	0.099± 0.02	0.044± 0.01
Strain Y1 (pH6.5)	0.079± 0.01	0.114± 0.08	0.078± 0.06	0.037± 0.00	0.026± 0.00
Strain Y3 (pH6.5)	0.057± 0.03	0.068± 0.01	0.026± 0.00	0.024± 0.02	0.024± 0.00
Strain Y5 (pH5.5)	ND	0.092± 0.01	0.150 ± 0.01	0.077± 0.01	0.052± 0.00
Strain Y6 (pH6.5)	ND	0.010± 0.00	0.013± 0.00	0.123± 0.01	0.083± 0.00
Strain Lf1 (pH7)	0.080± 0.02	0.162± 0.02	0.057± 0.06	0.021± 0.01	ND

ND: Not detected

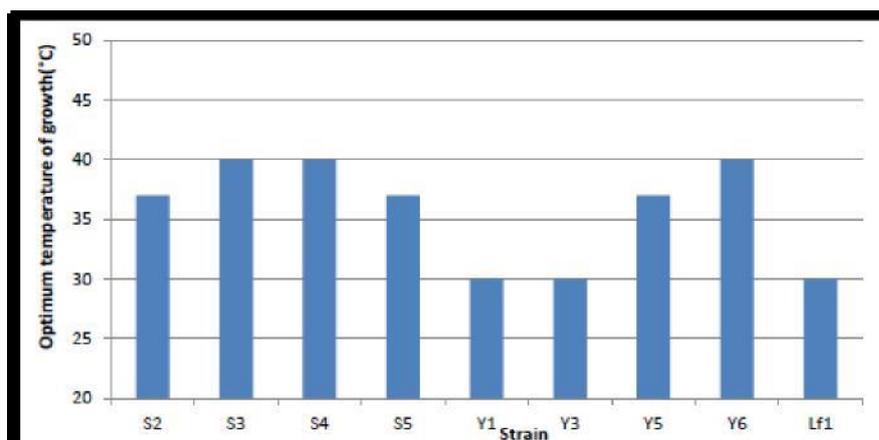


Figure 8. Optimum temperature for growth of each selected lactic acid bacteria

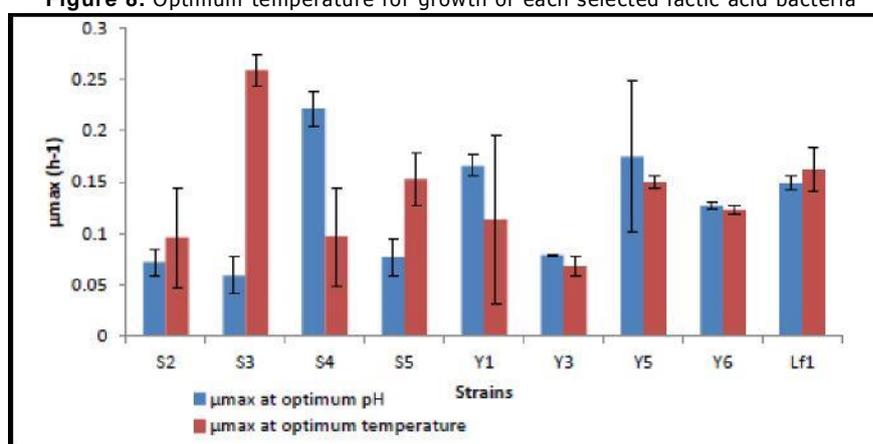


Figure 9. Maximum specific growth rate of each selected lactic acid bacteria at controlled pH and temperature

The strain S3 showed a higher maximum specific growth rate with a value of 0.259 h⁻¹ at 40°C and strain Y3 showed the lowest maximum specific growth rate as 0.068 h⁻¹ at 30°C (Fig.8). The strain S4 showed a higher maximum specific growth rate (0.225 h⁻¹) at pH=6 and the lowest (0.068 h⁻¹) at pH=6 observed for strain S3 (Fig.9).

In view of the results obtained in this study, it would be interesting to perform a complete genome sequencing of the strain Y5.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank PACER-UEMOA for funding this work.

CONCLUSION

Lactic acid bacteria play an important role in food fermentation, as the products obtained with their aid are characterized by hygienic safety, storage stability and attractive sensory properties. These properties are due to the compounds they synthesize, especially bacteriocins. Nine lactic acid bacteria were isolated and characterized by standard biochemical, microbiology and PCR methods from *Soumbala*, *Yoghurt* and *Fermented milk*. All the nine strains can produce active antimicrobial compounds against *Micrococcus luteus*. The diameter of inhibition and results gave by PCR after amplifying bacteriocins genes show that those compounds can be assimilated to bacteriocins. The study of effect of pH and temperature on growth of the selected lactic acid bacteria strain shows that our *Lactobacillus* species can be divided into two groups: mesophilic *Lactobacillus* (Strain Lf1) and thermophilic *Lactobacillus* (strains S3, S4, Y6). Only Strain Y5, isolated from *Yoghurt* has an optimal pH on growth at value of 5.5.

REFERENCES

1. Odunfa SA (1985). Biochemical changes in fermenting African locust bean (*Parkia biglobosa*) during "iru" fermentation. *J Food Technol.* 20: 295 – 303
2. Ouoba LII, Reching KB, Barkholt V et al. (2003). Degradation of proteins during the fermentation of African locust bean (*Parkia biglobosa*) by strains of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* for production of soumbala. *J Appl Microbiol.* 94 (3): 396– 402
3. Savadogo Aly and Alfred S Traore (2011). La flore microbienne et les propriétés fonctionnelles des yaourts et laits fermentés. *Int J Biol Chem Sci.* 5(5) : 2057-2075
4. Stiles ME and Holzapfel WH (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol.* 36(1): 1 – 29
5. Klaenhammer TR, Barragou R, Buck LB et al. (2005). Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiol Rev.* 29: 393 – 409
6. Daeschel MA (1989). Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol.* 43(1): 164-167
7. Klaenhammer TR (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie.* 70: 337 – 349
8. Savadogo A, Ouattara CAT, Bassole IHN et al. (2006). Bacteriocins and lactic acid bacteria – a minireview. *Afr J Biotechnol.* 5(9): 678 – 683

9. Khay E, Idaomar M, Castro LMP et al. (2011). Antimicrobial activities of the bacteriocin-like substances produced by lactic acid bacteria isolated from Moroccan dromedary milk. *Afr J Biotechnol.* 10(51): 10447 – 10455
10. Cotter PD, Hill C and Ross RP (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol.* 3: 777–788
11. Cintas LM, Casaus P, Havarstein LS et al. (1997). Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl Environ Microbiol.* 63(11): 4321 – 4330
12. Cocolin L and Rantsiou K (2007). Sequencing and expression analysis of sakacin genes in *Lactobacillus curvatus* strains. *Appl Genet Mol Biotechnol.* 76: 1403 – 1411
13. Marrugg JD, Gonzales CF, Kunka BS et al. (1992). Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1 and bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. *Appl Environ Microbiol.* 58(8): 2360 -2367
14. Hécharde Y, Derijard B, Letellier F et al. (1992). Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-Listeria bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. *J Gen Microbiol.* 138(12) :2725 – 273
15. Franz CMP, Belkum JV, Worobo RW et al. (2000). Characterization of the genetic locus responsible for production and immunity of carnobacteriocin A: the immunity gene confers cross-protection to enterocin B. *Microbiology.* 146: 621 – 631
16. Nes IF, Diep DB, Havarstein LS et al. (1996). Biosynthesis of bacteriocin in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 70(2-4): 113 – 128
17. McAuliffe O, Ross RP and Hill C (2001). Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol Rev.* 25(3): 285 – 308
18. Man JD, Rogosa MA and Sharpe ME (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *J Appl Bacteriol.* 23: 130 – 135
19. Castro MP, Palavecino NZ, Herman C et al. (2011). Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: Characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. *Meat Sci.* 87 : 321– 329
20. Kovacs N (1956). Identification of *Pseudomonas pyocyan* by oxydase reaction. *Nature (Lond).* 178:703
21. Clark W and Lubs H (1915). The identification of bacteria of the colony aerogenes family by use of indicators. *J Inf Dis.* 17:160-173
22. Bakar AF, Nordin N, Yoke TS et al. (2010). Detection and quantification of probiotic bacteria using optimized DNA extraction, traditional and real-time PCR methods in complex microbial communities. *Afr J Biotechnol.* 9(10): 1481-1492
23. Savadogo A, Ouattara CAT, Savadogo PW et al. (2004). Identification of exopolysaccharides-producing lactic acid bacteria from Burkina Faso fermented milk samples. *Afr J Biotechnol.* 3(3): 189 – 194
24. Diop MD, Dubois-Dauphin R, Dortu C et al. (2008). In vitro detection and characterization of bacteriocin-like inhibitory activity of lactic acid bacteria (LAB) isolated from Senegalese local food products. *Afr J Microbiol Res.* 2: 206 – 216
25. Glaasker E, Tjan FS, Ter Steeg PF et al. (1998). Physiological response of *Lactobacillus plantarum* to salt and nonelectrolyte stress. *J Bacteriol.* 180(17): 4718 – 4723
26. Guchte M, Serror P, Chervaux C et al. (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 82: 187 – 216.
27. Lade H, Chitanand M, Gyananath G et al. (2009). Studies On Some Properties Of Bacteriocins Produced By *Lactobacillus* Species Isolated From Agro-Based Waste. *The Internet Journal of Microbiology.* Volume 2: Number 1
28. Jiang J, Shi B, Zhu D et al. (2012). Characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* LSJ618 isolated from traditional Chinese fermented radish. *Food Control.* 23: 338 – 344
29. Badr S, Karem H, Hussein H et al. (2005). Characterization of nisin produced by *Lactococcus lactis*. *Int J Agric Biol.* 7(3): 499 – 503
30. Tuncer Y and Ozden B (2010). Partial biochemical characterization of nisin-like bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* YBD11 isolated from Boza, a traditional fermented Turkish beverage. *Rom Biotechnol Lett.* 15(1): 4940 – 4948
31. Klaenhammer TR (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 12(1-3): 39 – 85
32. Bhunia AK, Johnson MC, Ray B et al. (1991). Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. *J Appl Bacteriol.* 70: 25 – 33
33. Martinez-Cuesta MC, Palaez C, Juarez M et al. (1997). Autolysis of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* and *Lactobacillus casei* ssp. *casei*. Cell lysis induced by a crude bacteriocin. *Int J Food Microbiol.* 38(2 – 3):125 – 131
34. Dortu C and Thonart P (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : Caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol Agron Soc Environ.* 13(1):143 – 154

© 2013; AIZEON Publishers; All Rights Reserved

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Research Article



Characterization of *Bacillus* species producing Bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) isolated from fermented food in Burkina Faso

E. Taale^{1*}, A. Savadogo¹, C. Zongo¹, M. K. Somda¹, S. S. Sereme², S. D. Karou³, I. Soulama² and A. S. Traore¹

¹Laboratoire de Biotechnologie et de Microbiologie (LaBM), Centre de Recherche en Sciences Biologiques, Alimentaires et Nutritionnelles (CRSBAN), Département de Biochimie-Microbiologie (DBM), Unité de Formation et de Recherche en Sciences de la Vie et de la Terre (UFR-SVT), Université de Ouagadougou, 03BP7131 Ouagadougou 03, Ouagadougou (Burkina Faso).

²Laboratoire de Biologie Moléculaire, Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme (CNRFP), 01BP 2208 Ouagadougou, Ouagadougou (Burkina Faso)

³Laboratoire de Microbiologie et de Qualité des denrées Alimentaires, Ecole Supérieure des Techniques Biologiques et Alimentaires (ESTBA), Université de Lomé, BP1515, Lomé (Togo)

*Corresponding author: taaleernest12@hotmail.com

Abstract

We characterized thirteen strains isolated from indigenous fermented foods (Bikalga and fermented milk) by microbiological and molecular methods. The use of the primer pairs Bsub5F and Bsub3R, Ba1F and Ba1R, allowed to classify strains into two groups: the group of *Bacillus subtilis* (strains Bik4, Lf6 and Bik8) and the group of *Bacillus cereus* (strains Bik1, Bik2, Bik3, Bik5, Lf2, Lf3, Lf4, Lf5, Bik6, Bik7). The use of the primer pairs LbF and LbR designed for *Lactobacillus* sp. confirm our results because no results were obtained after electrophoresis gel of PCR products. The inhibitory activity of the *Bacillus* strains against *Micrococcus luteus* has been demonstrated by the agar diffusion technique through the wells. The inhibition diameters range from 6.00 mm (lower activity observed for *Bacillus subtilis* Bik8) to 22.00mm (highest activity observed for *Bacillus cereus* Lf4). The antimicrobial substances produced by the thirteen strains from both *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* group can be assimilate to BLIS while their peptide nature has not been confirmed yet. Thus, the indigenous fermented food from Burkina Faso contain *Bacillus* strains able to produced BLIS active against *Micrococcus luteus*, which can contribute to secure products more.

Keywords: Bikalga, Fermented milk, BLIS, Burkina Faso, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*.

Introduction

Bacteria belonging to the genus *Bacillus* have a long and distinguished history in the realms of biotechnology. They were probably first used by the Japanese in the preparation of a traditional fermented food from rice straw and soybean (Claus and Berkeley, 1986; Priest, 1993). They are aerobic, endospore forming, gram-positive, rod-shaped

organisms (Combet-Blancet al., 1995; Jenson, 2014), grow aerobically, and usually produce catalase. *Bacillus* are found in diverse environments such as soil and clays, rocks, dusts, aquatic environment, vegetation, food and the gastrointestinal tracts of various insects and animals (Nicholson, 2002). Phylogenetically, bacteria from the genus

Bacillus belong to class I of the phylum *Firmicutes* i.e. bacilli. The genus *Bacillus* includes many species of Gram-positive, rod-shaped bacteria which are able to grow under aerobic and anaerobic conditions (i.e. they are facultative) and thus differ from *Clostridium* spp., which are strictly anaerobic. Several species of *Bacillus* are recognized as human foodborne pathogen. *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis* are well recognized as foodborne, whereas the evidence for the pathogenicity of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* is less well developed. Illness has been reported due to other species, including *Bacillus pumilus*, *Bacillus thuringiensis* and *Brevibacillus brevis* (Jenson, 2014). *Bacillus* species are phenotypically and genotypically heterogeneous (Priest, 1993; Slepecky and Hemphill, 2006) and consequently, they exhibit quite diverse physiological properties such as the ability to degrade many different substrate derived from plant and animal sources, including cellulose, starch, proteins, agar, hydrocarbons and also biofuels (Lutz et al., 2006). This diversity in physiological properties, which is reflected by the considerable diversity of *Bacillus* strains, thus allowed these bacteria to colonize a wide variety of ecological habitats (Crielly et al., 1994; Scheldeman et al., 2005; Abriouel et al., 2011; Alvarez-Ordóñez et al., 2014).

Bacillus species are known to produce a wide arsenal of antimicrobial substances, including peptide and lipopeptide antibiotics, and bacteriocins (Stein, 2005; Abriouel et al., 2011). The production of antimicrobial substances and sporulation capacity confer *Bacillus* strains with a double advantage in terms of their survival in different habitats. The presence of *Bacillus* species on food does not always imply spoilage or food poisoning, because some species or strains are even used as for example, *Bacillus subtilis* strains used in Natto production (East Asian fermented food) (Hosoi and Kiuchi, 2003). Furthermore, specific *Bacillus subtilis* strains are also used as a starter culture for fermenting soybeans into a traditional West African condiment dawadawa (Terlabie et al., 2006) or for fermenting African mesquite seeds in the production of the Nigeria food condiment okpehe (Oguntoyinbo et al., 2007). This ability to survive and grow in such different ecosystems (soil, clays, rocks, dusts, aquatic environment, vegetation, food, gastrointestinal tracts of various insects and animals) is based on the production of their robust endospores, their diversity in physiological

properties and their growth requirements (Abriouel et al., 2011).

During the last decade, several works were dedicated to the characterization of the micro flora of bikalga (Dakwa et al., 2005; Azokpota et al., 2006; Jeyaram et al., 2008; Ouoba et al., 2008; Parkouda et al., 2009; Mo et al., 2010; Oguntoyinbo et al., 2010). These studies demonstrated the prevalence of *Bacillus* species (*B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. amyloliquefaciens*, *B. faciens*, *B. pumilis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. brevis* and *B. licheniformis*) in the fermentation process and their role in the bioconversion of the products. Bikalga is condiment produced by traditional uncontrolled alkaline fermentation of *Hibiscus sabdariffa*. This food additive is used as major condiments in many African countries (Savadogo et al., 2011). Bikalga is an excellent source of protein with essential amino acids and also contain lipids, carbohydrates, essential fatty acids and vitamins (Ouoba et al., 2003; Yagoub et al., 2004). Many families often use Bikalga as a meat substitute. These type of condiments improve nutritional values of foods as well as sensory properties and as taste enhancer (Savadogo et al., 2011). The traditional process of preparation of the Bikalga consists in boiling the seeds of *H. sabdariffa* for about 10 hours before washing and placing them in a container tightly closed for spontaneous fermentation of 72 hours (Ouoba et al., 2008). In this study we identified and characterized *Bacillus* strains that produce BLIS for furthermore applications using microbiological and molecular methods.

Materials and Methods

Biological material and study area

Thirteen strains were isolated from Bikalga (Bik1, Bik2, Bik3, Bik4, Bik5, Bik6, Bik7 and Bik8), and fermented milk (Lf2, Lf3, Lf4, Lf5 and Lf6). The strains were stored at +4°C in brain heart infusion broth supplemented with 15% of glycerol. This study were conducted from May 2013 to July 2014 at Laboratoire de Biotechnologie et de Microbiologie of Centre de Recherche en Sciences Biologiques, Alimentaires et Nutritionnelles in Unité de Formation et de Recherche en Sciences de la Vie et de la Terre of Université de Ouagadougou (CRSBAN/UFR-SVT) and Laboratoire de Biologie Moléculaire of Centre

National de Recherche et de Formation sur le Paludisme (CNRFP)/Ouagadougou.

Strains isolation and purification

Thirteen strains were inoculated by streaking tight on Nutrient Agar (Liofilchem, Italy) and incubated at 37°C for 24 hours. Each isolated colony was reinoculated in Trypticase Soya Broth (TSB) and incubated for 24 hours at 37°C. Pure cultures were obtained by repeated streaking of isolated colonies on Trypticase Soya Agar (TSA) medium. One to five colonies of each strain were cultured in Brain Heart Infusion supplemented with 15% of Glycerol for 24 hours at 37°C and conserved at +4°C.

Physiological and biochemical characterization

Gram staining, oxidase activity (Kovacs, 1956), catalase activity, production of acetoin (VP) (Clark and Lubs, 1915), sporulation, nitrite reduction, urea, gelatin and esculin reactions were carried out according to the routine procedure, and cell morphology was examined by light microscopy.

Gas and H₂S production from glucose was performed using Kliger Iron Agar (Liofilchem, Italy). Carbohydrate (glucose, lactose, sucrose, and mannitol) fermentation patterns were determined using API20E gallery (API BioMerieux, France) following the manufacturer's instructions.

Antimicrobial activity test

The antimicrobial activity was determined by agar well diffusion assay (AWDA) (Khay et al., 2011) using cell-free culture supernatants (CFS). Bacteria's strains were grown in Trypticase Soya Broth (TSB) at 37°C for 16 hours, and the cultures were centrifuged at 6,000 rpm for 15 min at room temperature. pH of each CFS was adjusted to pH 6.5 with 10N NaOH. 50 µl of CFS was placed into well (6mm) of agar plates that were previously seeded with 5ml of indicator microorganism, *Micrococcus luteus* (10⁶ UFC/ml). The plates were let on the bench for one hour for absorption, and then were incubated anaerobically at 37°C. After 24 hours, each plate were subsequently examined for inhibition zones (presence of halo or clear zone around well). Inhibition was recorded as negative if no halo or clear zone was observed around the well. The diameter of each halo displayed was measured using a ruler.

Genomic DNA extraction

Genomic DNAs from each isolates were prepared by using the QiAmp DNA Mini Kit (QiAgen, France) according to the manufacturer's instructions.

Identification at genus level

PCR mixture consisted of 8 µl of H₂O, 12.5 µl of Master Mix (Fermentas GmbH, St Leon, Rot, Germany), 1.5 µl of primer B-K1/F (5'-TCACCAAGGCRACGATGCG - 3'), 1.5 µl of primer B-K1/R (5'-CGTATTCACCGCGGCATG-3') at a final concentration of 20 µM and 1.5 µl of extracted DNA of each strain. The primers pairs B-K1/F and B-K1/R are designed for *Bacillus* sp. (Wu et al., 2006; Savadogo et al., 2011). *Bacillus subtilis* ATCC6633 and *Bacillus licheniformis* ATCC14850 were used as positive control. The primer pairs LbF (5'-GGAATCTTCCACAATGGACG-3') and LbR (5'-CGCTTTACGCCAATAAATCCGG-3') were used to see if our strains belong to *Lactobacillus* genus (Bakar et al., 2010).

Amplification consisted of 30 PCR cycles in a Thermocycler (DNA thermal cycle TC-412, United Kingdom). The cycling program was: initial denaturation at 94°C for 5min followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 56°C (for primers B-K1/F and B-K1/R)/60°C (for primers LbF and LbR) for 45 seconds and elongation at 72°C. The PCR was ended with a final extension at 72°C for 10 min and the amplified product cooled at 4°C.

Identification at species level

Two (2) different primers pairs were used to classify our strains to *Bacillus subtilis* group (primer pair Bsub5F and Bsub3R) or *Bacillus cereus* group (Ba1F and Ba1R) according respectively to (Wattiau et al., 2001; Savadogo et al., 2011) and (Chang et al., 2003; Savadogo et al., 2011). PCR mixture consisted of 8 µl of H₂O, 12.5 µl of Master Mix (Fermentas GmbH, St Leon, Rot, Germany), 1.5 µl of each primer (20 µM) (Bsub5F: 5'-AAGTCGAGCGGACAGATGG-3', Bsub3R: 5'-CCAGTTTCCAATGACCCTCCCC3', Ba1F: 5'-TGCAACTGTATTAGCACAAGCT-3', Ba1R: 5'-TACCACGAAGTTTGTTCACTACT-3') and 1.5 µl of extracted DNA of each strains. Amplification consisted of 30 PCR cycles in a Thermocycler (DNA thermal cycle TC-412, United

Kingdom). The cycling program was: initial denaturation at 94°C for 5min followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 60°C for 45 seconds and elongation at 72°C. The PCR was ended with a final extension at 72°C for 10 min and the amplified product cooled at 4°C.

Screening for Bacteriocins genes

DNA amplification was conducted in a DNA thermal cycler TC-412 (Serial No.: 137370-2, United Kingdom). The primers pairs BacF (5'- AAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and BacR (5'- CTACGGCTACCTTGTTACGA-3')(Diop et al., 2008) were used. PCR mixture consisted of 8 µl of H₂O, 12.5µl of Master Mix (Fermentas GmbH, St Leon, Rot, Germany), 1.5µl of each primer (20µM) and 1.5µl of DNA template. The cycling program was: initial denaturation at 94°C for 5min followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 56°C for 45 seconds and elongation at 72°C. The PCR was ended with a final extension at 72°C for 10 min and the amplified product cooled at 4°C.

Electrophoresis

The DNA fragments were separated by loading 10 µl of each PCR product with 2 µl of loading buffer to 1.5% Agarose gel (Eurogenetec) containing 2% of RedSafe (Intron Biotechnology). Hypperladder 50 bp and Hypperladder100bp (Bioline, USA) were DNA molecular markers used as standard for the determination of fragment length. The Agarose gel was run in Tris Borate EDTA (TBE 0.5X) buffer for 60 min under 120V, 50mA and photographed under ultraviolet light illumination.

Results and Discussion

Strains characterization

All the 13 isolates were found to be Gram-positive, and gave positive test for catalase and nitrate reduction whereas the strains Bik4, Bik5, Lf2 and Lf5 respond positively for urease (Table1). The cells form are rod-shaped, with pairs (strains Lf4) and chains arrangement. No strains produced gas or hydrogen sulfide (H₂S) from glucose (Table1). The 13 strains were motile and are spore forming bacterium. The feature that distinguishes bacilli taxonomically is the formation of dormant structures, formed from within

the bacterial cell, called endospores. These dormant structures are significant in food microbiology because they are resistant to heat and to desiccation (Jenson, 2014). Under suitable conditions, endospores will germinate and the resultant vegetative cells will grow and reproduce by binary fission. The life cycle and survival of bacilli are dependent on their gram-positive cell wall structure and ability to form endospores (Jenson, 2014). Spore formation in *Bacillus* takes place when the cell culture reaches the stationary growth phase. Sporulation may be induced by nutritional deprivation, or cell density and is affected by numerous factors, such as temperature, pH, aeration, and availability of various nutrients(Jenson, 2014).

Only two (2) strains (Bik1 and Bik2) are not able to produce acetoin (Table1). Acetoin is a product of fermented metabolism in many prokaryotic and eukaryotic microorganisms and also in *Bacillus* spp.(Nakano et al., 1997; Huang et al., 1999). Acetoin is one of intermediate compound produced by bacteria, responsible of flavor and aroma found in fermented food as Bikalga.

The color of Kligler Iron Agar slant was turned from red to yellow, which indicated that all strains were able to ferment the sugar glucose. The strains Bik1 and Lf4 were not able to use the sugar sucrose.

Antibacterial activities

All strains were checked about their antibacterial activities against *Micrococcus luteus*. All strains inhibited the growth of *Micrococcus luteus*. The diameter of inhibition of antibacterial substances produced by strains against *Micrococcus luteus* is listed in Table 2.

Bacillus species are known to produce a wide arsenal of antimicrobial substances, including peptide and lipopeptide antibiotics, and bacteriocins (Abriouel et al., 2011). Clear zone was found around each well filled with CFS (Table2). The diameter of clear zone ranged from 6.00 ± 0.00mm (lower activity observed for *Bacillus cereus* strains Bik8) to 22.00 ± 4.82 mm (higher activity observed for *Bacillus scereus* strain Lf4). The production of antibacterial substances and sporulation capacity confer *Bacillus* strains with a double advantage in terms of their survival in different habitats.

Int. J. Adv. Res. Biol.Sci. 2(4): (2015): 279–290

Table 1: Biochemical, morphology and physiological characters of selected strains

Tests performed	Strains												
	Bik1	Bik2	Bik3	Bik4	Bik5	Bik6	Bik7	Bik8	Lf2	Lf3	Lf4	Lf5	Lf6
Cell form	Rod												
Cellular arrangement	Chains	Pairs	Chains	Chains									
Motile	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Spore-forming	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gas and H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NO ₂	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urea	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-
Acetoin (VP)	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatin	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Esculin	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sucrose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Presumptive identification	<i>Bacillus</i> sp.												

+: Positive reaction

-: Negative reaction

Table 2: Diameter of inhibition (mm) of the *Bacillus* strains.

Strains	diameter (mm)
Bik1	12.00 ± 2.65
Bik2	12.33 ± 2.52
Bik3	11.50 ± 0.00
Bik4	10.00 ± 1.80
Bik5	13.28 ± 0.78
Bik6	8.33 ± 0.58
Bik7	9.33 ± 2.31
Bik8	6.00 ± 0.00
Lf2	11.00 ± 1.41
Lf3	14.17 ± 2.12
Lf4	22.00 ± 4.82
Lf5	11.50 ± 1.41
Lf6	12.67 ± 0.58

The well diameter (6mm) is included

The addition of 10N NaOH to adjust the pH of the CFS to value of 6.5 had allowed us to work with a supernatant of proteinaceous nature, such as bacteriocins, lipopeptide antibiotics. Antibacterial peptides produced by ribosomal synthesis are commonly referred to as bacteriocins, and these are a heterologous groups of proteinaceous antibacterial substances that are produced by bacteria from every major lineage (Riley and Wertz, 2002a, b; Abriouel et al., 2011). They display a high degree of target specificity against related bacteria, although many have a large or wider spectrum of activity (Jack et al., 1995; Cotter et al., 2005). Many other antibacterial substances that were not well characterized are known as bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS). This is often used when the peptide nature of the antimicrobial compound has not been confirmed (Abriouel et al., 2011). Thus the antimicrobial substances produced by the thirteen strains characterized as *Bacillus subtilis* or *Bacillus cereus* (Table1-2; Figure 1-4) can be assimilate as BLIS. Bacteriocins and BLIS produced by the *Bacillus* genus sensu lato may be considered as the second most important after bacteriocins produced by the lactic acid bacteria (LAB). Several bacteriocins or BLIS produced by *Bacillus* species fall within class II of LAB which includes the pediocin-like bacteriocins (class IIa) and the two-peptide bacteriocins (class IIb) (Klaenhammer, 1993; Drider et al., 2006; Nes et al., 2007). Some bacteriocins produced by *Bacillus* sp. belong to the group of Lantibiotics (Willey and van der

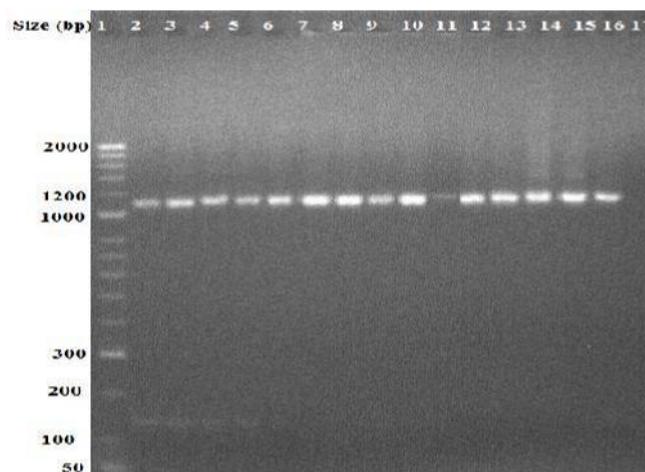
Donk, 2007; Asaduzzaman and Sonomoto, 2009; Bierbaum and Sahl, 2009). Lantibiotics are ribosomally synthesized as precursor peptides. They are post-translationally modified by the degradation of serine and threonine residues and subsequent intramolecular addition to cysteine, resulting in the formation of (b-methyl) lantioninethioether bridges, the characteristics structural elements for lantibiotics (Chatterjee et al., 2005; Willey and van der Donk, 2007; Bierbaum and Sahl, 2009). In the case of *Bacillus*, it is also important to corroborate the ribosomal synthesis of true bacteriocins, because this group of bacteria is prolific in the production of antimicrobial peptide (or lipopeptides) by nonribosomal synthesis (such as the utirins and others). Several works have been reported that *Bacillus* sp. can produce bacteriocins/BLIS active against *Micrococcus luteus* (Lee et al., 2001; Saleem et al., 2009; Savadogo et al., 2011)

Strains Identification

Genomic DNA of the thirteen strains were isolated and tested by PCR using specific *Bacillus* sp. primer pairs for their identification. The PCR allowed typing mainly at genus level by using primer pairs B-K1/5F and B-K1/5R and one (1) group of bacteria was obtained (Figure1). The group was characterized by one constant DNA band and comprised the reference isolates *Bacillus subtilis* ATC6633 and *Bacillus licheniformis* ATC14580 (Figure1). The bands

Int. J. Adv. Res. Biol.Sci. 2(4): (2015): 279–290

Figure 1: Identification of all strains by PCR at genus level using B-K1/5F and B-K1/3R specific primers pairs to *Bacillus* sp.

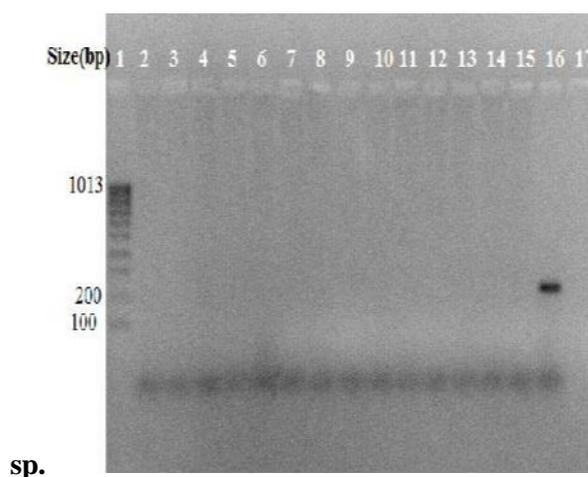


Lane 1: Molecular weight marker; Lane 2: Strain Bik1 ; Lane 3: Strain Bik2; Lane 4: Strain Bik3; Lane 5: Strain Bik4; Lane 6: Strain Bik5; Lane 7: Strain Lf2; Lane 8: Strain Lf3; Lane 9: Strain Lf4; Lane 10: Strain Lf5; Lane 11: Strain Lf6; Lane 12: Strain Bik6; Lane 13: Strain Bik7; Lane 14 : Strain Bik8; Lane 15 : *Bacillus subtilis* ATCC6633; Lane 16 : *Bacillus licheniformis* ATCC14850; Lane 17 : Negative control; bp: bases pairs

observed were 1000 to 1200 bp of length. Those primer pairs have been used by (Wu et al., 2006; Savadogo et al., 2011) to characterize their isolates at *Bacillus* genus level. They obtained bands of 1114 bp. No positive results were obtained when using specific primer LbF and LbR designed for *Lactobacillus* sp.

No bands were obtained in gel agarose except for positive control (Figure2). Those results indicate that all the strains used in this study with bacillary form are not belonging to *Lactobacillus* genus. Thus those results allow us to classify our strains into *Bacillus* sp.

Figure 2: PCR profiles of *Bacillus* strains using specific primer pairs (LbF and LbR) to *Lactobacillus* sp.

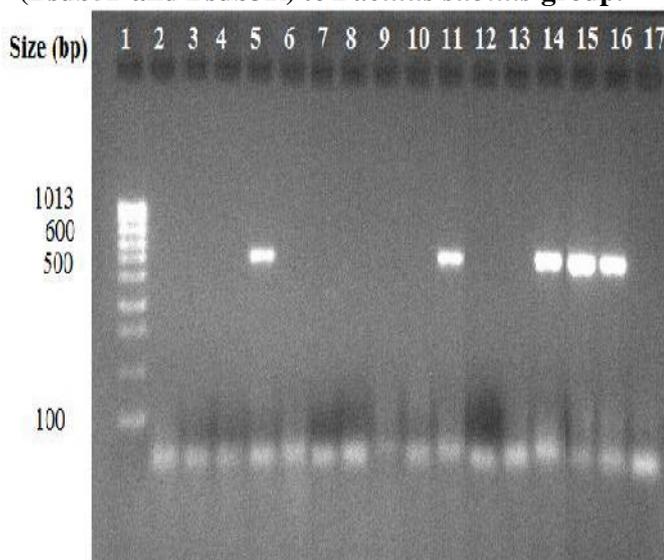


Lane 1: Molecular weight marker; Lane 2: Strain Bik1; Lane 3: Strain Bik2; Lane 4: Strain Bik3; Lane 5: Strain Bik4; Lane 6: Strain Bik5; Lane 7: Strain Lf2; Lane 8: Strain Lf3; Lane 9: Strain Lf4; Lane 10: Strain Lf5; Lane 11: Strain; Lf6; Lane 12: Strain Bik6; Lane 13: Strain Bik7; Lane 14 : Strain Bik8; Lane 16: *Lactobacillus* sp. as positive control; Lane 17: Negative control; bp: bases pairs

Using the Bsub5F and Bsub3R primer pairs, the strains Bik4, Lf6 and Bik8 could be classified in the *Bacillus subtilis* group (*Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*) according to results found (Figure3). The primer pairs Bsub5F and Bsub3R are designed for *Bacillus subtilis* group. Only three (3) bands (corresponding to three strains) were observed after migration on agarose gel (Figure 3). The size of bands obtained was almost 600 bp. The same size was obtained by (Wattiau et al., 2001; Savadogo et al., 2011). These results confirmed

that the strains Bik4, Lf6 and Bik8 belong to *Bacillus* genus, especially to the group of *Bacillus subtilis* (*Bacillus subtilis* or *Bacillus licheniformis* or *Bacillus amyloliquefaciens* or *Bacillus pumilus*) (Wattiau et al., 2001; Savadogo et al., 2011). The intensity of bands indicate that strains Bik8 are *Bacillus licheniformis* compared to positive control (*Bacillus licheniformis* ATCC14580), and strains Bik4 and Lf6 are *Bacillus subtilis* compare with positive control (*Bacillus subtilis* ATCC6633).

Figure 3: PCR profiles of *Bacillus* strains using specific primer pairs (Bsub5F and Bsub3R) to *Bacillus subtilis* group.



Lane 1: Molecular weight marker; Lane 2: Strain Bik1 ; Lane 3: Strain Bik2; Lane 4: Strain Bik3; Lane 5: Strain Bik4; Lane 6: Strain Bik5; Lane 7: Strain Lf2; Lane 8: Strain Lf3; Lane 9: Strain Lf4; Lane 10: Strain Lf5; Lane 11: Strain Lf6; Lane 12: Strain Bik6; Lane 13: Strain Bik7; Lane 14 : Strain Bik8; Lane 15 : *Bacillus subtilis* ATCC6633;
Lane 16 : *Bacillus licheniformis* ATCC14850; Lane 17 : Negative control; bp: bases pairs

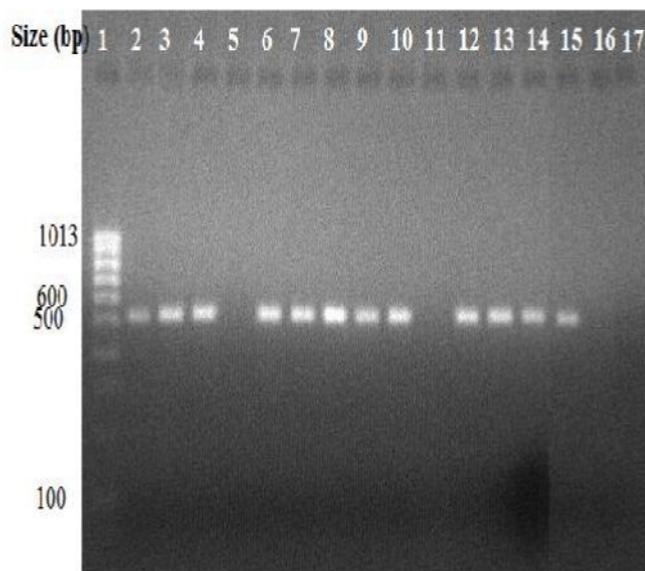
The result obtained by using primer pairs Ba1F and Ba1R showed that the strains Bik1, Bik2, Bik3, Bik5, Bik6, Bik7, Lf2, Lf3, Lf4 and Lf5 are *Bacillus cereus* (Figure 4). Ba1F and Ba1R primer pairs were designed to target groEL gene from *Bacillus cereus*. The tested strains respond positively by giving one band which was almost 500 bp as obtained by (Chang et al., 2003; Savadogo et al., 2011).

Detection of bacteriocins genes

All the thirteen strains were amplified with specific primer pairs BacF and BacR designed to target 16S rDNA gene of bacteriocins (Diop et al., 2008). The running electrophoresis revealed that only *Bacillus subtilis* strain Bik1 and *Bacillus cereus* strain Lf4 gave a negative result (Figure5). The eleven bands obtained have size ranging from 50 to 100 bp. Those results indicate that the eleven strains can produce antimicrobial compounds which can be assimilated to bacteriocins/BLIS because they have bacteriocins genes.

Int. J. Adv. Res. Biol.Sci. 2(4): (2015): 279–290

Figure 4:PCR profiles of *Bacillus* strains using specific primer pairs (Ba1F and Ba1R) to *Bacillus cereus*.

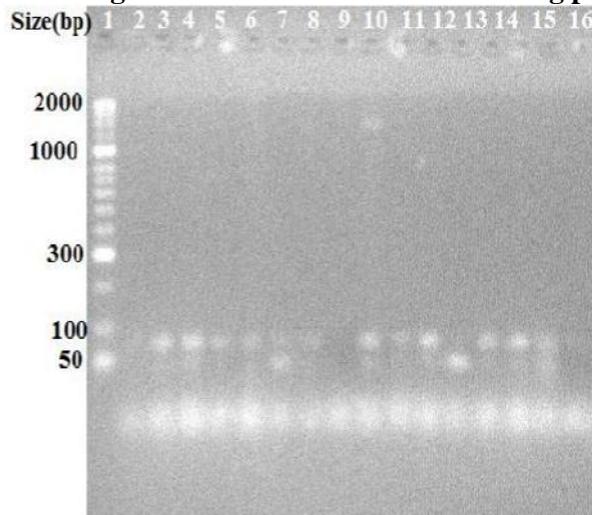


Lane 1: Molecular weight marker; Lane 2: Strain Bik1 ; Lane 3: Strain Bik2; Lane 4: Strain Bik3; Lane 5: Strain Bik4; Lane 6: Strain Bik5; Lane 7: Strain Lf2; Lane 8: Strain Lf3; Lane 9: Strain Lf4; Lane 10: Strain Lf5; Lane 11:

Strain Lf6; Lane 12: Strain Bik6; Lane 13: Strain Bik7; Lane 14 - 15: *Bacillus cereus* LMG 168 as positive control;

Lane 16: Strain Bik8; Lane 17: Negative control; bp: bases pairs

Figure 5 :Detection of bacteriocins genes from all *Bacillus* strains using primers pairs Bac1 and Bac2



Lane 1: Molecular weight marker; Lane 2: Strain Bik1; Lane 3: Strain Bik2; Lane 4: Strain Bik3; Lane 5: Strain Bik4; Lane 6: Strain Bik5; Lane 7: Strain Lf2; Lane 8: Strain Lf3; Lane 9: Strain Lf4; Lane 10: Strain Lf5; Lane 11: Strain Lf6; Lane 12: Strain Bik6; Lane 13: Strain Bik7; Lane 14 : Strain Bik8; Lane 15: *Lactobacillus* sp. as positive control; Lane 16: Negative control; bp: bases pairs

Conclusion

In this study we characterize thirteen strains with bacillary form. Three (3) strains (Bik4, Lf6 and Bik8) are *Bacillus subtilis* and ten are *Bacillus cereus* according to characteristics tests. All strains can produce substances with antibacterial activities and can be assimilate as BLIS. These antibacterial substances are active against *Micrococcus luteus*. It would be interesting to continue the study seeking to determine the nucleotide sequence of the BLIS producing strains and also determine the nature of bioactive substances / BLIS produced by these strains of *Bacillus* (Bacteriocins or NRPS) using molecular methods.

Acknowledgments

The authors wish to thank Bakary TARNAGDA for his excellent assistance when performing biochemical and physiological characterization and antimicrobial activity of the isolates.

References

- Abriouel, H., Franz, C.M., Ben Omar, N. and Galvez, A. 2011. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. FEMS Microbiol. Rev. 35(1): 201-232.
- Alvarez-Ordóñez, A., Begley, M., Clifford, T., Deasy, T., Considine, K., O'Connor, P., Ross, R.P. and Hill, C. 2014. Investigation of the Antimicrobial Activity of *Bacillus licheniformis* Strains Isolated from Retail Powdered Infant Milk Formulae. Probiotics Antimicrob. Proteins 6(1): 32-40.
- Asaduzzaman, S.M. and Sonomoto, K. 2009. Lantibiotics: diverse activities and unique modes of action. J. Biosci. Bioeng. 107(5): 475-487.
- Azokpota, P., Hounhouigan, D.J., Nago, M.C. and Jakobsen, M. 2006. Esterase and protease activities of *Bacillus* spp. from afitin, iru and sonru: three African locust bean (*Parkia biglobosa*) condiments from Benin. Afr. J. Biotechnol. 5(3): 265-272.
- Bakar, A.F., Nordin, N., Yoke, T.S. and Abdulmir, A.S. 2010. Detection and quantification of probiotic bacteria using optimized DNA extraction, traditional and real-time PCR methods in complex microbial communities. Afr. J. Biotechnol. 9(10): 1481-1492.
- Bierbaum, G. and Sahl, H.G., 2009. Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. Curr. Pharm. Biotechnol. 10(1): 2-18.
- Chang, Y.H., Shangkuan, Y.H., Lin, H.C. and Liu, H.W. 2003. PCR assay of the groEL gene for detection and differentiation of *Bacillus cereus* group cells. Appl. Environ. Microbiol. 69(8): 4502-4510.
- Chatterjee, C., Paul, M. and Xie, L., van der Donk, W.A. 2005. Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. Chem. Rev. 105(2): 633-684.
- Clark, W.M. and Lubs, H.A. 1915. The Differentiation of Bacteria of the Colonaerogenes Family by the Use of Indicators. J. Inf. Dis. 17(1): 160-173.
- Claus, D., Berkeley and C.W. 1986. The genus *Bacillus*. In: PHA, S. (Ed.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams, Wilkins, Baltimore, pp. 1105-1139.
- Combet-Blanc, Y., Ollivier, B., Streicher, C., Patel, B., Dwivedi, P., Pot, B., Prensier, G. and Garcia, J.-L. 1995. *Bacillus thermoamylovorans* sp. nov., a moderately thermophilic and amyolytic bacterium. Int. J. of Syst. Bacteriol. 45(1): 9-16.
- Cotter, P.D., Hill, C. and Ross, R.P. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. Nat Rev. Microbiol. 3(10): 777-788.
- Crielly, E.M., Logan, N.A., Anderton, A., 1994. Studies on the *Bacillus* flora of milk and milk products. J Appl Bacteriol 77, 256-263.
- Dakwa, S., Sakyi-Dawson, E., Diako, C., Annan, N.T. and Amoa-Awua, W.K., 2005. Effect of boiling and roasting on the fermentation of soybeans into dawadawa (soy-dawadawa). Int. J. Food Microbil. 104(1): 69-82.
- Diop, M. B., Dubois Dauphin, R., Dortu, C., Destain, J., Tine, E. and Thonart, P., 2008. In vitro detection and characterization of bacteriocin-like inhibitory activity of lactic acid bacteria (LAB) isolated from Senegalese local food products. Afr. J. Microbiol. Res. 2(8):206-216.
- Drider, D., Fimland, G., Hechard, Y., McMullen, L.M. and Prevost, H. 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 70(2): 564- 582.
- Hosoi, T. and Kiuchi, K., 2003. Natto - a food made by fermenting cooked soybeans with *Bacillus subtilis* (natto). In: Farnworth, E. (Ed.), Handbook of Fermented Functional Foods. CRC Press, pp. 227-245.
- Huang, M., Oppermann-Sanio, F.B. and Steinbuechel, A. 1999. Biochemical and molecular characterization of the *Bacillus subtilis* acetoin catabolic pathway. J. Bacteriol. 181(12): 3837-3841.
- Jack, R.W., Tagg, J.R. and Ray, B. 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. Microbiol. Rev. 59(2): 171- 200.

Int. J. Adv. Res. Biol.Sci. 2(4): (2015): 279–290

21. Jenson, I. 2014. *Bacillus*. In: Dahl, M.K. (Ed.), Encyclopedia of Food Microbiology. Elsevier Ltd, pp. 111–117.
22. Jeyaram, K., Mohendro Singh, W., Premarani, T., Devi, A.R., Chanu, K.S., Talukdar, N.C. and Singh, M.R. 2008. Molecular identification of dominant microflora associated with 'Hawaijar' - a traditional fermented soybean (*Glycine max* (L.)) food of Manipur, India. *Int. J. Food Microbiol.* 122(3): 259- 268.
23. Khay, E.O., Idaomar, M., Castro, L.M.P., Bernárdez, P.F., Senhaji, N.S. and Abrini, J. 2011. Antimicrobial activities of the bacteriocin-like substances produced by lactic acid bacteria isolated from Moroccan dromedary milk. *Afr. J. Biotechnol.* 10(51): 10447 - 10455.
24. Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12(1-3): 39-85.
25. Kovacs, N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature (Lond)* 178: 703.
26. Lee, K.H., Jun, K.D., Kim, W.S. and Paik, H.D. 2001. Partial characterization of polyfermenticin SCD, a newly identified bacteriocin of *Bacillus polyfermenticus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 32(3): 146-151.
27. Lutz, G., Chavarria, M., Arias, M.L. and Mata-Segreda, J.F. 2006. Microbial degradation of palm (*Elaeis guineensis*) biodiesel. *Rev. Biol. Trop.* 54(1): 59-63.
28. Mo, A.-Y., Kwon, B., Kamala-Kannan, S., Lee, K.-J., Oh, B.-T., Kim, D.-H., Yang, M.-S., Kim, J.-H. and Park, S.-M. 2010. Isolation and characterization of *Bacillus polyfermenticus* isolated from Meju, Korean soybean fermentation starter. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26(6):1099-1105.
29. Nakano, M.M., Dailly, Y.P., Zuber, P. and Clark, D.P. 1997. Characterization of anaerobic fermentative growth of *Bacillus subtilis*: identification of fermentation end products and genes required for growth. *J. Bacteriol.* 179(21): 6749-6755.
30. Nes, I.F., Diep, D.B. and Holo, H. 2007. Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Bacteriol.* 189(4):1189-1198.
31. Nicholson, W. 2002. Roles of *Bacillus* endospores in the environment. *Cell. Mol. Life Sci.* 59: 410-416.
32. Oguntoyinbo, F.A., Huch, M., Cho, G.S., Schillinger, U., Holzapfel, W.H., Sanni, A.I. and Franz, C.M. 2010. Diversity of *Bacillus* species isolated from okpehe, a traditional fermented soup condiment from Nigeria. *J. Food Prot.* 73(5): 870-878.
33. Oguntoyinbo, F.A., Sanni, A.I., Franz, C.M. and Holzapfel, W.H. 2007. In vitro fermentation studies for selection and evaluation of *Bacillus* strains as starter cultures for the production of okpehe, a traditional African fermented condiment. *Int. J. Food Microbiol.* 113(2): 208-218.
34. Ouoba, L., Parkouda, C., Diawara, B., Scotti, C. and Varnam, A. 2008. Identification of *Bacillus* spp. from Bikalga, fermented seeds of *Hibiscus sabdariffa*: phenotypic and genotypic characterization. *J. Appl. Microbiol.* 104(1): 122-131.
35. Ouoba, L., Reching, K., Barkholt, V., Diawara, B., Traore, A. and Jakobsen, M., 2003. Degradation of proteins during the fermentation of African locust bean (*Parkia biglobosa*) by strains of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* for production of Soumbala. *J. Appl. Microbiol.* 94(3): 396-402.
36. Parkouda, C., Nielsen, D.S., Azokpota, P., Ouoba, L.I.I., Amoa-Awua, W.K., Thorsen, L., Hounhouigan, J.D., Jensen, J.H., Tano-Debrah, K., Diawara, B. and Jakobsen, M. 2009. The microbiology of alkaline-fermentation of indigenous seeds used as food condiments in Africa and Asia. *Cr. Rev. Microbiol.* 35(1): 139-156.
37. Priest, F.G. 1993. *Bacillus*. In: Rehrn, H.-J., Reed, G., Puhler, A., Stadler, P. (Eds.). VCH Verlagsgesellschaft mbH, pp. 367–400.
38. Riley, M.A. and Wertz, J.E. 2002a. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie* 84(5-6): 357-364.
39. Riley, M.A., Wertz, J.E. 2002b. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 117-137.
40. Saleem, F., Ahmad, S., Yaqoob, Z. and Rasool, S.A. 2009. Comparative study of two bacteriocins produced by representative indigenous soil bacteria. *Pak. J. Pharm. Sci.* 22(3): 252-258.
41. Savadogo, A., Tapi, A., Chollet, M., Wathélet, B., Traoré, A. and Jacques, P. 2011. Identification of surfactin producing strains in Soumbala and Bikalga fermented condiments using polymerase chain reaction and matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry methods. *Int. J. Food Microbiol.* 151(3): 299-306.
42. Scheldeman, P., Pil, A., Herman, L., De Vos, P. and Heyndrickx, M. 2005. Incidence and Diversity of Potentially Highly Heat-Resistant Spores Isolated at Dairy Farms. *Appl. Env. Microbiol.* 71(3): 1480-1494.

Int. J. Adv. Res. Biol.Sci. 2(4): (2015): 279–290

42. Slepecky, R.A.and Hemphill, H.E. 2006. What is a *Bacillus*? In: Doi, R.H., McGloghlin, M. (Eds.), *Biology of Bacilli: Applications to industry*. Butterworth-Heinemann, Boston, MA, pp. 1–21.
43. Stein, T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures , syntheses and specific functions. *Mol. Microbiol.* 56(4): 845-857.
44. Terlabie, N.N., Sakyi-Dawson, E., Amoa-Awua, W.K., Terlabie, N.N.andSakyi-Dawson, E., 2006. The comparative ability of four isolates of *Bacillus subtilis* to ferment soybeans into dawadawa. *Int. J. Food Microbiol.* 106: 145-152.
45. Wattiau, P., Renard, M.E., Ledent, P., Debois, V., Blackman, G.and Agathos, S.N. 2001. A PCR test to identify *Bacillus subtilis* and closely related species and its application to the monitoring of wastewater biotreatment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56(5-6): 816-819.
46. Willey, J.M.and van der Donk, W.A. 2007. Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Annu. Rev. Microbiol.* 61:477-501.
47. Wu, X.Y., Walker, M.J., Hornitzky, M.and Chin, J. 2006. Development of a group-specific PCR combined with ARDRA for the identification of *Bacillus* species of environmental significance. *J. Microbiol. Methods* 64(1): 107-119.
48. Yagoub, A.-G.A.E.G.A., Mohamed, B.E.E., Ahmed, A.H.R.H., El Tinay, A.H.and El Tiny, A.H. 2004. Study on Furundu,a traditional sudanese fermented roselle (*Hibiscus sabdariffa*) seed: effect on in vitro protein digestibility, chemical composition and functional properties of the total proteins. *J. Agr. Food Chem.* 52(20): 6143-6150.

Annexe 4 : Articles soumis

Article soumis dans Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences.

REGULAR ARTICLE

SEARCHING FOR BACTERIOCIN *PLN* LOCI FROM *LACTOBACILLUS* SPP. ISOLATED FROM FERMENTED FOOD IN BURKINA FASO BY MOLECULAR METHODS

Essodolom TAALE^{1,2*}, Aly SAVADOGO¹; Haziz SINA², Cheikna ZONGO¹, Simplicie D. KAROU³, Lamine BABA-MOUSSA², Alfred S. TRAORE¹

Address: Essodolom TAALE,

¹Laboratoire de Biotechnologie et de Microbiologie (LaBM), Centre de Recherche en Sciences Biologiques, Alimentaires et Nutritionnelles (CRSBAN), Département de Biochimie-Microbiologie (DBM), Unité de Formation et de Recherche en Sciences de la Vie et de la Terre (UFR-SVT), Université Ouaga I Pr Joseph KI-ZERBO, 03BP7131 Ouagadougou 03, Ouagadougou (Burkina Faso).

²Laboratoire de Biologie et de Typage Moléculaire en Microbiologie, Département de Biochimie et Biologie Cellulaire, Faculté des Sciences et Techniques (FAST), Université d'Abomey-Calavi ; 05BP 1604 Cotonou (Bénin).

³Laboratoire de Microbiologie et de Qualité des denrées Alimentaires, Ecole Supérieure des Techniques Biologiques et Alimentaires (ESTBA), Université de Lomé, BP1515, Lomé (Togo)

*Corresponding author: essodolom.taale@univ-ouaga.bf

ABSTRACT

This study identified from fermented food four strains of *Lactobacillus* through molecular and bioinformatic methods. The PCR products obtained from the amplification of the 16S rRNA gene were sequenced and the sequences were aligned using NCBI tools (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). After two successive BLASTn, the strains were identified as *Lactobacillus* sp. strain S3; *Lactobacillus* sp. strain S4; *Lactobacillus* sp. strain Y6 and *Lactobacillus plantarum* strain Lf1. The second part of this study was to determine the different loci of plantaricin, bacteriocin produced by the species of *Lactobacillus plantarum*; using online software NCBI and BAGEL3 (<http://bagel.molgenrug.nl/index.php/bagel3>). Comparison of partial sequences of 16S rRNA gene encoding the bacteriocins allowed to demonstrate that the *pln* gene is a mosaic gene because contains many operons and several ORFs. Four operons were identified in this study: *plnABCD* operon (found in *Lactobacillus* sp. strain S4 and *Lactobacillus* sp. strain Y6); operon *plnEFI* found in all the four strains; *plnGHSTUVW* operon (*Lactobacillus* sp. strain S3 and *Lactobacillus* sp. strain Y6) and *plnJKLR* operon (*Lactobacillus plantarum* strain Lf1 and *Lactobacillus* sp. strain S4). More genes were identified using the BAGEL3 database. The *plnK* gene is the most constant gene found in all bacteriocins. All the strains produced the pheromone peptide plantaricin A.

Keywords: *Lactobacillus* sp.; *Lactobacillus plantarum*; plantaricin; Operons; ORFs; Burkina Faso

INTRODUCTION

Lactobacillus spp. are lactic acid bacteria (LAB) that display phylogenetic, phenotypic, and ecological heterogeneity that is reflected in their taxonomic diversity (Claesson et al., 2008). *Lactobacilli* have been studied extensively because of their importance for the production of fermented foods and beverages (Cho et al., 2011; Raftis et al., 2011). Members of the genus *Lactobacillus* are gram-positive, non-spore forming, mostly non-motile and generally rod-shaped even coccobacilli can be observed. Their cells are often organized in chains. The optimal growth temperature is mostly between 30 and 40°C, although the overall growth temperature can be ranged between 2 and 53°C; the pH for growth between 3 and 8 (Pot et al., 2014). The large majority of LAB as *Lactobacillus* belongs to the order *Lactobacillales* within the group of low percentage G+C Gram-positive bacteria of the *Firmicutes* phylum (Vandamme et al., 2014).

Since the 1990s, identification and description of new species has often been based on a polyphasic approach (Vandamme et al., 1996), involving both genotypic and phenotypic characterization. Genotypically, 16S rRNA sequencing was the method of choice, mainly because of the availability of large reference sequences sets. The use of 16S rRNA gene sequences to study bacterial phylogeny and taxonomy has been far the most common housekeeping genetic marker used for a number of reasons (Patel, 2001; Janda and Abbott, 2007). These reasons include first its presence in almost all bacteria (often existing as a multigene family, or operons); secondly the function of the 16S rRNA gene over time has not changed, suggesting that random sequence changes are a more accurate measure of time (evolution); and finally the 16S rRNA gene (1,500 bp) is large enough for informatics purposes (Patel, 2001; Janda and Abbott, 2007). According to Ludwig and Klenk (2001) and Patel (2001) ribosomal RNA sequences provide a phylogenetic framework that serves as a backbone for modern microbial taxonomy. For that purpose, public databases comprising published and unpublished sequences have been constructed (Olsen et al., 1991; Yarza et al., 2008; Cole et al., 2009). The use of conserved macromolecules such as 16S or 23S rRNA for bacterial classification should reflect as much as possible the natural relationships between bacteria (Woese, 1987; Vandamme et al., 2014). However, classification serves very practical purposes, which is, the recognition of organisms that were encountered previously and the categorization of new ones into a logical and tractable system (Vandamme et al., 2014).

Lactobacillus are used in preservative processes where they, like many other LAB, can contribute with the production of antimicrobial substances (e.g., organic acids and bacteriocins) (Diep et al., 2009). Bacteriocins are ribosomally-synthesized peptides or proteins produced by a wide range of bacteria (Zouhir et al., 2010). Several works show that the *Lactobacillus plantarum* can produce bacteriocin called plantaricin, belonging to bacteriocin of class II. The *pln* locus responsible for plantaricin biosynthesis in *Lactobacillus plantarum* was first unraveled in *Lactobacillus plantarum* C11 and since then it was found in large amount of *Lactobacillus plantarum* strains (Diep et al., 2009). The *pln* locus is a mosaic gene because may contain several genes and operons. For further reading (Ben Omar et al., 2008; Diep et al., 2009). In Burkina Faso, few data on *Lactobacillus* species and its bioactive molecules such bacteriocins isolated from fermented food are available.

In this study, we identified four *Lactobacillus* strains to species level and harbor for *pln* locus gene and its operons using bioinformatics tools and molecular methods.



Available online at <http://www.ijbc-dg.org>

Int. J. Biol. Chem. Sci. x(x): xx-xx, xxxxx

ISSN 1997-342X (Online), ISSN 1991-8631 (Print)

International Journal
of Biological and
Chemical Sciences

Review Paper

<http://ajol.info/index.php/ijbcs>

<http://indexmedicus.afro.who.int>

Revue sur les peptides antimicrobiens d'origine microbienne : Cas des bactériocines

Essodolom TAALE^{1*}, Aly SAVADOGO¹, Cheikna ZONGO¹, François TAPSOBA¹,
Simplice D. KAROU² et Alfred S. TRAORE¹

¹Laboratoire de Biotechnologie et de Microbiologie (LaBM), Centre de Recherche en Sciences Biologiques, Alimentaires et Nutritionnelles (CRSBAN), Département de Biochimie-Microbiologie (DBM), Unité de Formation et de Recherche en Sciences de la Vie et de la Terre (UFR-SVT), Université de Ouagadougou, 03BP7131 Ouagadougou 03, Ouagadougou (Burkina Faso).

²Laboratoire de Microbiologie et de Qualité des denrées Alimentaires, Ecole Supérieure des Techniques Biologiques et Alimentaires (ESTBA), Université de Lomé, BP1515, Lomé (Togo)

*Email de l'auteur correspondant : taaleernest12@hotmail.com

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le programme PACER de l'UEMOA pour avoir soutenu cette étude.

RÉSUMÉ

Les bactéries à Gram positives et à Gram négatives et les archées produisent respectivement des bactériocines et des archéocines. Les bactériocines et les archéocines sont des peptides antimicrobiens. Au fil des ans leur rôle dans la sûreté des produits alimentaires n'a cessé d'être démontré faisant de ces peptides naturels un centre d'intérêt pour la recherche scientifique. Cette revue tente de faire l'état des connaissances sur les bactériocines produites par les bactéries Gram positives, bactéries Gram négatives et les archées en faisant ressortir leurs organisations génétiques particulières, leurs modes d'action qui diffèrent de celui des antibiotiques et surtout leurs larges spectres d'action. La collecte des données à consister à consulter les articles scientifiques publiés et les mémoires de thèses sur les différents travaux menés sur les bactériocines et disponible en ligne via les journaux de publication et les sites dédiés aux collectes de thèses en ligne. Ces peptides antimicrobiens pourraient constituer une alternative pour la conservation des denrées alimentaires surtout en milieu rural dans les pays en voie de développement.

© 2016 International Formulae Group. All rights reserved.

Mots clés : bactériocines, bactéries, archéocines, archées, antimicrobiens, agro-alimentaire.

Antimicrobial peptides from microbes: Case of Bacteriocins. A Review

ABSTRACT

Gram-positive and Gram-negative bacteria and Archaea respectively produce bacteriocins and archeocins. Over the years, their role in the food safety has continued rising because of the report of many works. This review focuses on bacteriocins know up to date by highlighting on their particular genetic organization, their mode of action that differs from antibiotics and especially their broad spectrum of action. Data were collected by consulting online available published scientific articles and thesis on bacteriocins and archeocins. These antimicrobial peptides could provide an alternative for preserving foodstuffs especially in rural areas in developing countries.

© 2016 International Formulae Group. All rights reserved.

© 2016 International Formulae Group. All rights reserved.

2537-IJBCS

Annexe 4 : Communications affichées



Journées Scientifiques de l'Université de Ouagadougou du 25 au 30
Novembre 2013



Influence du pH et de la température sur la croissance de souches lactiques productrices de bactériocines

TAALE Essodolom¹, SAVADOGO Aly¹, ZONGO Cheikna¹, SAWADOGO Adama¹, TAPSOBA François¹, KAROU D. Simplicie² & TRAORE S. Alfred¹

¹CRSBIAN, Université de Ouagadougou (Burkina Faso), 03 BP : 7131 Ouagadougou 03/TEL : (00226) 50 33 73 33/FAX : (00226) 50 33 73 33/ essodolom.atale@univ-ouaga.bf
²ESTEA, Université de Lomé, Lomé BP1313, Togo

RESUME

pH optimal : 5,5 (souche Y1); pH6(souche S3, S4, Lf1); pH6,5(souche S2, Y1, Y3, Y6) et pH7(souche S5).

Température optimale de croissance: 30°C (souche Y1, Y3, Lf1); 37 °C (souche S2, S5, Y3) et 40 °C (S3, S4, Y6).

INTRODUCTION

Les bactéries lactiques (BL) colonisent de nombreux produits alimentaires (Dortu et Thonart, 2009). Les BL produisent de nombreux métabolites: arômes (acétone et diacétyle), des exopolysaccharides, de l'acide lactique, du peroxyde d'hydrogène et des bactériocines (Savadogo et Traore, 2011; Khay *et al.*, 2011). Ces métabolites jouent un rôle déterminant dans la conservation et la sécurité microbienne des aliments fermentés et agissent sur la texture et la saveur qui se révèlent différentes de celles de l'aliment à son état original.

Les bactériocines produites sont des peptides, thermostables que les bactéries utilisent dans le cadre de la compétition contre d'autres bactéries de la même espèce (spectre étroit) ou contre d'autres bactéries d'autres genres (large spectre) (Cotter *et al.*, 2005). Les bactériocines sont des molécules bioactives.

MATERIEL ET METHODE

- 9 souches lactiques bactériocinogènes ont été isolées à partir de différents aliments fermentés et caractérisées par les méthodes de microbiologie et de biologie moléculaire (Taale, 2012)
- pH du bouillon MRS: 5; 5,5; 6; 6,5; 7 et 7,5
- Température d'incubation: 25; 30; 37; 40 and 44°C
- DO_{600nm} mesuré à chaque heure pendant 24H par un spectrophotomètre couplé au logiciel KC Junior
- Expression des résultats par la formule $\text{Log}_{10}(\text{DO}'/\text{DO}) = \mu_{\text{max}}t + k$

RESULTATS ET DISCUSSION

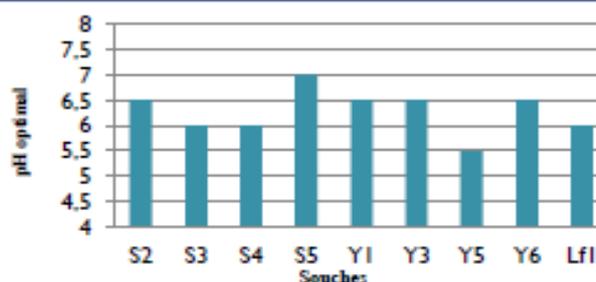


Figure 1. pH optimal de croissance de chaque souche

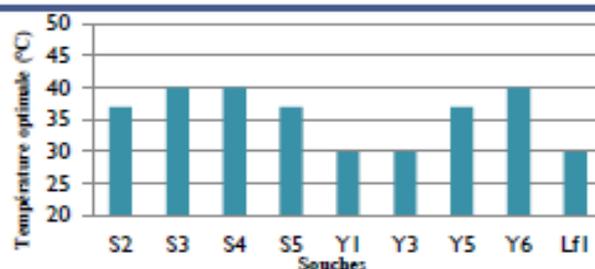


Figure 2. Température optimale de croissance de chaque souche

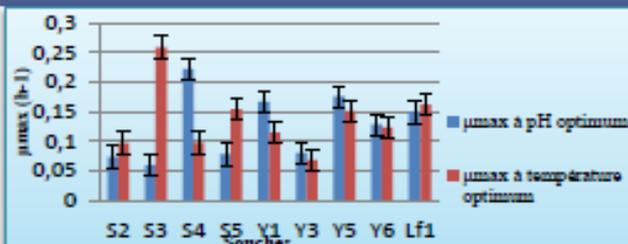


Figure 3. Taux de croissance maximale de chaque souche à pH optimal et température optimale de croissance

CONCLUSION

Les neuf (09) souches lactiques bactériocinogènes croissent à pH et à température différent. Seule la souche Y5 est acidophile. Cette souche a été isolée de Yaourt. Les autres souches ont un pH de croissance presque neutre. La souche S4 présente le taux maximal (μ_{max}) croissance le plus élevé à pH6 soit 0.222 h⁻¹. Les cinq (05) souches de *Lactococcus* (S2, S5, Y1, Y3, Y5) sont mésophiles car leur température de croissance se situe entre 30 et 37°C. Parmi les quatre (04) de *Lactobacillus* seules les souches S3, S4 et Y6 sont des souches thermophiles. La souche S3 croit plus vite à pH6 et à température 40°C avec un taux maximal de croissance de 0.259 h⁻¹

REFERENCES

- Cotter et Ross (2005). Bactériocines: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3, 777-788.
- Dortu et Thonart (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques: caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 13(1), 143-154.
- Savadogo et Traore (2011). La flore microbienne et les propriétés fonctionnelles des yaourts et laits fermentés. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, 5(5), 2057-2075.
- Taale (2012). Recherche de gènes de molécules à partir de souches bactériennes: Cas des bactéries productrices de bactériocines. Mémoire de DEA de BMC, Université de Ouagadougou (Burkina Faso), 64p.



« Recherche de gènes de molécules bioactives à partir de souches bactériennes: Cas des bactéries productrices de bactériocines ».

Laboratoire de Biotechnologie-Microbiologie.

Essodolom Taale¹; Aly Savadogo¹; Cheickna Zongo¹; Alfred S. Traoré¹

Unité de Formation et de Recherche Sciences de la Vie et de la Terre (UFR-SVT)

Centre de Recherche en Sciences Biologiques Alimentaires et Nutritionnelles (CRSBAN), Université de Ouagadougou (Burkina Faso)

03 BP : 7131 Ouagadougou 03/TEL : (00226) 50 33 73 33/FAX : (00226) 50 33 73 33/taaleernest12@hotmail.com



RÉSUMÉ: Cette étude a permis d'identifier 9 souches de bactéries lactiques (BL) isolées à partir de soubala (4), yaourt (4) et lait fermenté (1) comme productrices de bactériocines.

INTRODUCTION

Les BL constituent la flore microbienne dominante dans les aliments fermentés. Elles sont utilisées comme starters dans les produits alimentaires fermentés (Hugenholz et al., 1999). Les BL peuvent synthétiser des métabolites antimicrobiens tels que les bactériocines (Khay et al., 2011). Les bactériocines seraient produites par Quorum Sensing (Dortu et Thonart, 2009).

Objetif: Identification biomoléculaire des souches de bactéries lactiques productrices de bactériocines isolées à partir d'aliments fermentés.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

- Collecte de souches bactériennes isolées à partir de soubala, yaourt et lait fermenté au CRSBAN
- Caractérisation morphologique et biochimique
- Un test de l'activité antimicrobienne des souches à l'encontre de *Micrococcus luteus*
- Identification biomoléculaire des souches par PCR

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les 9 souches sont catalase, oxydase, spore, gaz, H₂S, urée, indole négatifs. Toutes sont immobiles et Gram +. S2, S5, Y1, Y3 et Y5 ont une forme sphérique, se regroupent en paire et appartiennent au genre *Lactococcus* (Figure 2-B). Souche S3, S4, Y6 et Lf1 ont une forme bacillaire et appartiennent au genre *Lactobacillus* (Figure 1). Les 9 souches inhibent la croissance de *Micrococcus luteus* avec une zone d'inhibition allant de 08,25 ± 0,35 mm (Y6) à 20,88 ± 2,84 mm (S3). La souche Y1 ne produit pas de substances inhibitrices assimilables aux bactériocines (Figure 2-A).

Tableau I: Conditions PCR et résultats

Genre/ Gène amplifié	Séquence des amorces utilisées	Ta/tps/ cycles	Résultat	Bandes (bp)	Références
<i>Lactobacillus</i> / 16S rRNA	5' - GGA ATC TTC CAC AAT GGA CG - 3' 5' - CGC TTT ACG CCC AAT AAA TCC GG - 3'	60°C/45S/30 cycles	4/4	<1000	Bakar et al., 2010
<i>Lactococcus</i> / 16S rRNA	5' - CTT TGA GTG ATG CAA TTG CAT C - 3' 5' - CAC CGC TAC ACA TGG AG - 3'	53°C/45S/30 cycles	5/5	<1000	Savadogo et al., 2004
Bactériocines/ 16S rDNA	5' - AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG - 3' 5' - CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA - 3'	56°C/45S/30 cycles	8/9	3500 - 4000	Diop et al., 2008

Ta: Température d'hybridation bp: paire de bases tps: temps



Figure 1. Identiéficatón des souches (S2, S3, S4, Y6, Lf1) de forme bacillaire avec des amorces spécifiques au genre *Lactobacillus*. M: Marqueur de poids moléculaire. Y: Contrôle.



Figure 2. A. Recherche de gène codant les bactériocines chez les 9 souches. B. Identification des souches de forme sphérique avec les amorces spécifiques au genre *Lactococcus*. M: Marqueur de poids moléculaire. Y: Contrôle. S2, S3, S4, S5, Y1, Y3, Y5, Y6 et Lf1 sur les souches testées.

CONCLUSION

La diversité écologique des BL vient d'être confirmée une fois encore par cette étude. 4 souches sont des *Lactobacillus* alors que 5 en sont des *Lactococcus*. BL synthétisent des bactériocines actives contre *Micrococcus luteus*.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bakar et al., 2010. Detection and quantification of probiotic bacteria using optimized DNA extraction, traditional and real-time PCR methods in complex microbial communities. *African Journal of Biotechnology*, 9(10), 1481-1492.
- Diop et al., 2008. In vitro detection and characterization of bacteriocin-like inhibitory activity of lactic acid bacteria (LAB) isolated from Senegalese local food products. *African Journal of Microbiology Research*, 2, 206 - 216.
- Dortu et Philippe, 2009. Les bactériocines des bactéries lactiques : Caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotech. Agron. Soc. Environ.*, 13(1), 143 - 154.
- Hugenholz and Kleerebezem 1999. Metabolic engineering of lactic acid bacteria: Overview of the approaches and results of pathway rerouting involved in food fermentations. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(5), 492 - 497.
- Khay et al., 2011. Antimicrobial activities of the bacteriocin-like substances produced by lactic acid bacteria isolated from Moroccan dromedary milk. *African Journal of Biotechnology*, 10(51), 10447 - 10455.
- Savadogo et al., 2004. Identification of exopolysaccharides-producing lactic acid bacteria from Burkina Faso fermented milk samples. *African Journal of Biotechnology*, 3(3), 189 - 194.

Annexe 4 : Résumé des communications oralesCOMMUNICATION ORALE AU COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL DE
L'UNIVERSITE DE KARA (TOGO)

Champ thématique : Agriculture et sécurité alimentaire

Titre : Isolement et caractérisation de souches lactiques productrices de bactériocines

TAALE Essodolom¹, SAVADOGO Aly¹, ZONGO Cheikna¹, SAWADOGO Adama¹, TAPSOBA François¹, KAROU D. Simplicite² & TRAORE S. Alfred¹

¹Centre de Recherche en Sciences Biologiques Alimentaires et Nutritionnelles (CRSBAN), Université de Ouagadougou (Burkina Faso), 03 BP : 7131 Ouagadougou 03/TEL: (00226) 50 33 73 33/FAX : (00226) 50 33 73 33

² ESTBA, Université de Lomé, Lomé BP1515, Togo

Contact auteur : Cellulaire : 78 76 40 90/ Mail : essodolom.taale@univ-ouaga.bf

Résumé

Neuf (9) souches lactiques dont quatre (4) du genre *Lactobacillus* et cinq (5) du genre *Lactococcus* ont été isolées à partir de soubala, de lait frais et de yaourt. La technique de diffusion sur gélose à travers les puits a permis de mettre en évidence l'activité antimicrobienne des souches à l'encontre de *Micrococcus luteus*, dont le diamètre d'inhibition varie de 8,25 mm (souche Y6) à 20,83 mm (souche S3). Seules les substances inhibitrices produites par la souche Y1 ne sont pas assimilables aux bactériocines selon les tests caractéristiques (PCR et électrophorèse).

Mots clés : Bactéries lactiques, Burkina Faso, *Micrococcus luteus*, diamètre d'inhibition, Bactériocines.



COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL DE
L'UNIVERSITE DE KARA (TOGO)

Isolement et caractérisation de souches lactiques productrices de bactériocines

TAALE Essodoum¹, SAVADOGO Aly¹, ZONGO Cheikna¹, KAROU D. Simplicie² & TRAORE S. Alfred¹

¹ Centre de Recherche en Sciences Biologiques (CRSBI) Université de Kara, BP 2389, Kara, TOGO
² Centre de Recherche en Sciences Biologiques (CRSBI) Université de Kara, BP 2389, Kara, TOGO

Kara, 15 Mai 2014



Introduction (1/3)



- Aliments et boissons fermentés (*soumbala*, laits et produits dérivés,...) occupent une proportion importante dans l'alimentation en Afrique (Oyewole, 1997). Les bactéries lactiques (BL) constituent la flore dominante (Ashmaig, 2009) dans ces aliments.
- BL: présentes chez végétaux, animaux, humains (Dortu et Thonart, 2009).
- BL impliquées dans la fermentation spontanée (Stiles *et al.*, 1997) d'où leur utilisation comme Starters dans les aliments fermentés (Hugenholtz *et al.*, 1999).



PLAN



- Introduction
- Objectifs
 - Objectif général
 - Objectifs spécifiques
- Matériel & Méthodes
- Résultats & Discussion
- Conclusion & Perspectives



Introduction (2/3)



- BL inhibent microorganismes pathogènes et altérants Gram positif et Gram négatif en synthétisant des métabolites antimicrobiens tels que H₂O₂, CO₂, diacétyle, acide lactique, acide acétique, bactériocines, ... (Savadogo *et al.*, 2006; Khay *et al.*, 2011).
- Les bactériocines sont des peptides, thermostables que les bactéries utilisent dans le cadre de la compétition contre d'autres bactéries de la même espèce (spectre étroit) ou contre d'autres bactéries d'autres genres (large spectre) (Cotter *et al.*, 2005).
- Les bactériocines sont des molécules bioactives.



INTRODUCTION



Introduction (3/3)



- BL productrices de bactériocines feront l'objet de cette étude.
- Bactériocines sont utilisées dans la biopréservation des aliments et leurs gènes, séquences ainsi que leur mode de synthèse et d'action sont identifiés ou en cours d'identification ces dernières années.
- Bactériocines produites par Quorum Sensing (Dortu et Thonart, 2009).
- Quorum Sensing – expression de certains gènes en fonction de la densité bactérienne dans le milieu.



Objectifs



Objectif général

- ❑ Caractériser les souches de BL productrices de bactériocines isolées à partir d'aliments fermentés.

Objectifs spécifiques

- ❑ Isoler et caractériser les souches
- ❑ Tester le pouvoir inhibiteur des souches isolées à l'encontre de *Micrococcus luteus*
- ❑ Identifier les souches par PCR à l'aide d'amorces spécifiques et rechercher les gènes de bactériocines



Matériels & Méthodes (2/6)



Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des souches isolées

Technique utilisée: Diffusion sur gélose par les puits

- Centrifugation de 10 ml bactérienne de 24 H à 6000 rpm/min. pH surnageant ajusté à 6,5 avec NaOH6N.
- Inondation de gélose nutritive par *Micrococcus luteus* (10^6 UFC/ml). 4 puits (6 mm Ø) réalisés sur chaque boîte de Pétri.
- 5 µl de surnageant mis dans chaque puits
- Puits témoin = 5µl de bouillon cœur-cerveille stérile

Lecture: mesure de zone claire autour de chaque puits après 16 H d'incubation à 37 °C.



MATÉRIEL & MÉTHODES



Matériel & Méthodes (3/6)



Extraction et purification du génome bactérien

Kit utilisé: QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, France)

Étapes:

- ❖ Lyse cellulaire par ATL, EDTA et Lysozyme
 - ❖ Déprotéinisation avec protéinase K
 - ❖ Précipitation avec le tampon AL et alcool absolu
 - ❖ Lavage avec les tampon AW1 et AW2
 - ❖ Éluion avec le tampon AE
- ADN extrait stocké à +4°C



Matériels & Méthodes (1/6)



21 souches bactériennes isolées à partir des aliments

Aliment	Souches isolées	Nombre
Soumbala	S1, S2, S3, S4, S5	05
Bikalga	B1, B2, B4, B5, B6	05
Lait fermenté	Lf1, Lf2, Lf3, Lf4, Lf5	05
Yaourt	Y1, Y2, Y3, Y4, Y5, Y6	06
		Total: 21

- ❑ Milieux: MRS et PCA
- ❑ Caractérisation morphologique, biochimique et physiologique



Matériel & Méthodes (4/6)



PCR

- ❖ Composition du milieu réactionnel
- 30 µl de Taq PCR Master Mix (QIAGEN, France)
- 4 µl d'amorce sens
- 4 µl d'amorce antisens
- 8 µl d'eau stérile
- 4 µl de DNA
- Volume réactionnel total = 50 µl

Témoin négatif et témoin positif réalisé

Matériel & Méthodes (5/6)

PCR/ Amorces utilisées

Amorces P1 et P2 (Bakar *et al.*, 2010)

P1: 5' – GGA ATC TTC CAC AAT GGA CG – 3'

P2: 5' – CGC TTT ACG CCC AAT AAA TCC GG – 3'

Gène recherché: 16S rDNA des *Lactobacillus*

04 souches testés : S3, S4, Y6 et Lf1

Amorces P3 et P4 (Savadojo *et al.*, 2004)

P3: 5' – CTT TGA GTG ATG CAA TTG CAT C – 3'

P4: 5' – CAC CGC TAC ACA TGG AG – 3'

Gène recherché: 16S rRNA des *Lactococcus*

05 souches utilisées: S2, S5, Y1, Y3 et Y5

Résultats & Discussion (1/7)

Souches retenues

Les tests morphologiques et biochimiques ont permis de retenir 09 souches pour cette étude dont la répartition par aliment est:

Soumbala 04 souches (S2, S3, S4, S5)

Yaourt 04 souches (Y1, Y3, Y5, Y6)

Lait fermenté 01 souche (Lf1)

Matériels & Méthodes (6/6)

PCR/ Amorces utilisées

Amorces P5 et P6 (Diop *et al.*, 2008)

P5: 5' – AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG – 3'

P6: 5' – CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA – 3'

gène recherché: 16S rDNA des bactériocines

09 souches utilisées: S2, S3, S4, S5, Y1, Y3, Y5, Y6 et Lf1

Électrophorèse sur gel d'agarose à 0,7%

Voltage: 150 Volts

Intensité: 50 mA

Durée: 50 min

Solution : TBE 0,5X

Résultats & Discussion (2/7)

Caractéristiques des souches

Caractéristiques morphologiques et biochimiques	Souches								
	S2	S3	S4	S5	Y1	Y3	Y5	Y6	Lf1
Morphologie	C	B	B	C	C	C	C	B	B
Motile	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxydase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Spoore	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indole	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ONPG	-	-	-	-	+	+	+	+	+

RESULTATS & DISCUSSION

Résultats & Discussion (3/7)

Utilisation des sucres

Sucres	Souches								
	S2	S3	S4	S5	Y1	Y3	Y5	Y6	Lf1
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rhamnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	-	+	-	-	-	+	+	-	+
Arabinose	-	-	-	-	+	+	+	-	-
Explores présumée	L ₆	L ₈	L ₈	L ₆	L ₆	L ₆	L ₆	L ₈	L ₈

Résultats & Discussion (4/7)

Activité antimicrobienne des souches à l'encontre de *Micrococcus luteus*

souches	Zone d'inhibition [mm]
S2	16,17 ± 2,31
S3	20,83 ± 2,84
S4	13,00 ± 0,00
S5	20,13 ± 1,53
Y1	10,00 ± 1,80
Y3	15,00 ± 1,41
Y5	13,09 ± 0,83
Y6	08,25 ± 0,35
Lf1	12,50 ± 0,00



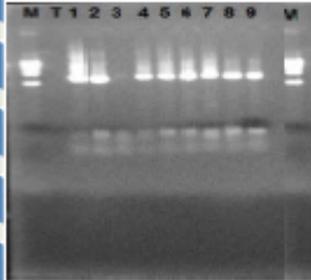
BL synthétisent bactériocines à action d'ingrès contre *Micrococcus luteus* (Ladje *et al.*, 2009; Tuncer et Ozdemir, 2010 ; Jiang *et al.*, 2012)

Même résultats pour les souches S4, Y6 et Lf1 que Ebo-Amer (2007) a obtenus avec *Lactobacillus plantarum* isolé à partir de yaourt traditionnel égyptien

Résultats & Discussion(7/7)

Recherche de gène 16S rDNA codant les bactériocines chez toutes les souches

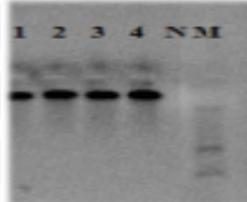
Seule la souche Y1 produit des substances inhibitrices non assimilables aux bactériocines



1	souche S2
2	souche S3
3	souche Y1
4	souche Y3
5	souche Y5
6	souche S3
7	souche S4
8	souche Y6
9	souche Lf1

Résultats & Discussion(5/7)

Identification des souches de forme bacillaire par les amorces P1 et P2



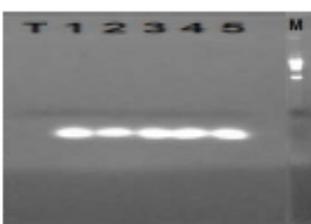
1	souche S3
2	souche S4
3	souche Y6
4	souche Lf1
N	Négatif
M	Marqueur

Les 4 souches (S3, S4, Y6, Lf1) de forme bacillaire appartiennent au genre *Lactobacillus*

CONCLUSION & PERSPECTIVES

Résultats & Discussion(6/7)

Identification des souches de forme sphérique par les amorces P3 et P4



M	marqueur
1	souche Y1
2	souche Y3
3	souche Y5
4	souche S2
5	souche S5

Les souches (S2, S5, Y1, Y3, Y5) de forme sphériques appartiendraient au genre *Lactococcus*

Conclusion & Perspectives (1/3)

Méthodes standard d'isolement, de caractérisation biochimique et physiologique ont permis de retenir 9 souches de BL.

La technique de diffusion sur gélose à travers les puits a montré que toutes les 9 souches synthétisent des substances antimicrobiennes à l'encontre de *Micrococcus luteus*: diamètre d'inhibition va de 08,25 mm (Souche Y6) à 20,83 mm (Souche S4). Ces substances antimicrobiennes sont assimilables aux bactériocines selon les tests caractéristiques.

Conclusion & Perspectives (1/3)

- ❑ Techniques moléculaires ont permis d'identifier nos souches:
 - S3, S4, Y6 et Lf1 appartiennent au genre *Lactobacillus*
 - S2, S3, Y1, Y3 et Y5 appartiennent au genre *Lactococcus*
- ❑ Seule la souche Y1 synthétise des substances à activité antimicrobienne à l'encontre de *Micrococcus luteus* non assimilables aux bactériocines

Conclusion & Perspectives (3/3)

En perspectives nous envisageons de procéder à :

- Etude biochimique des bactériocines sécrétées et leur thermorésistance.
- Evaluer leur effet in vitro dans la bioconservation des aliments
- Séquencer les souches

MERCI