

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE D'ORAN ES-SENIA



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE APPLIQUEE

MEMOIRE

Présenté par

M^{elle} : RAHMOUN Assia

POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE MAGISTER

Option: Microbiologie Appliquée

**Evaluation de l'activité antimicrobienne des espèces
de *Lactobacillus* isolées du lait cru de chèvre**

Soutenu le :

Devant le jury composé de :

Mr. Henni. D.J

Professeur à l'Université d'Es-Sénia

Président

Mr. Kihal. M

Professeur à l'Université d'Es-Sénia

Rapporteur

Mr. Bekki. AEK

Professeur à l'Université d'Es-Sénia

Examineur

Mr. Guessas. B

MCA à l'Université d'Es-Sénia

Examineur

M^{elle}. Benmechernene. Z

MCB à l'Université d'Es-Sénia

Co- rapporteur

Année Universitaire : 2008 – 2009

Dédicace

A l'aide de Dieu, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je

dédie :

*En premier lieu naturellement à mes chers parents, qui m'ont
toujours soutenue et sollicité durant mes années d'étude, que*

Dieu puisse les garder pour nous.

A mes sœurs : Hind, Meriem, Hanane, anissa et farah.

*A la mémoire de mon grand père maternelle et ma grand-mère
paternelle qu'ils reposent en paix*

A mes grands parents.

A mes cousins et cousines sans oublier aucun.

A mes oncles et tantes.

A mes amies : Djamila, Imène, Faîza, Amina, Fadila...

A mes camarades de ma promotion.

Et enfin à tous mes professeurs.

M^{elle} Assia

Remerciements

Je remercie le bon Dieu de m'avoir accordé la volonté et la passion de pouvoir réussir ce modeste travail.

Je tiens à témoigner ma gratitude et mes sincères remerciements à mon encadreur

Pr. Kihal. M et mon co-encadreur Dr. Benmechernene. Z pour m'avoir aidé et dirigé dans la préparation de ce mémoire.

Je remercie Mr. Bekki. AEK, professeur et Mr. Guessas Bettache, Maître de conférences et pour avoir accepté d'examiner ce mémoire.

Je suis également reconnaissante à Mr. Henni. D.J, professeur pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury.

Mes sincères remerciements à tous les professeurs du département de Biologie-Faculté des Sciences et tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin.

M^{elle} Assia

Merci

SOMMAIRE

Résumé	
Abréviation	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction	1

Synthèse bibliographique

I- Lait de chèvre

I.1 Données sur le chaptel caprin.....	3
1.1 Généralités.....	3
1.2 Races caprines algériennes et leurs principales caractéristique.	4
I.2 Généralité sur le lait de chèvre.....	5
I.3 Composition du lait de chèvre	6
3.1 Le lactose.....	6
3.2 La lactoprotéine.....	6
3.3 La matière grasse.....	7
3.4 Les vitamines et les sels minéraux	7
I.4 Quelques propriétés du lait cru	7
I.5 Flore microbienne du lait cru	8

II- Les bactéries lactiques

II.1- Définition des bactéries lactiques	10
II.2- Habitats et Taxonomie des bactéries lactiques.....	10
2.1 Caractères morphologique des bactéries lactiques.....	11
2.2 Caractères physiologique et biochimique des bactéries lactiques.....	11
2.3 Caractères structuraux des bactéries lactiques	11
II.3- Exigence et métabolisme des bactéries lactiques.....	12
3.1 La température	12
3.2 Le pH du milieu	12
3.3 Métabolisme des sucres.....	13
3.4 Métabolisme du citrate	17
3.5 Métabolisme de l'arginine.....	17
3.6 Métabolisme de l'oxygène	18

3.7	Activité protéolytique des bactéries lactiques	18
II.4-	Classification des différents genres de bactéries lactiques.....	19
4.1	<i>Streptococcus</i>	19
4.2	<i>Leuconostoc</i>	21
4.3	<i>Pediococcus</i>	21
4.4	<i>Lactobacillus</i>	22
4.5	<i>Bifidobacterium</i>	22
II.5-	Caractéristiques générales sur les lactobacilles.....	24
II.6-	Intérêts des bactéries lactiques	26
6.1	En alimentation	26
6.2	Comme probiotiques	26

III. Les différentes interactions existantes chez les bactéries lactiques

III.1-	Définition des différentes interactions microbiennes	28
1.1	Différents types d'interactions	28
III.2-	Les différentes interactions existantes chez les bactéries lactiques.	28
2.1	Les phénomènes de stimulations.....	29
2.2	Les phénomènes d'inhibitions.....	29

IV. Caractère probiotique

IV.1-	Introduction	37
IV.2-	Généralités sur deux souches pathogènes.....	37
2.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	37
2.2	<i>Escherichia coli</i>	38
IV.3-	Propriétés inhibitrices des bactéries lactiques	40
3.1	Performances dans le domaine thérapeutique	40
IV.4-	Activité antimicrobienne due à des bactériocines	43
4.1	Définition	43
4.2	Classification	44
4.3	Les mécanismes d'action des bactériocines	46
IV.5-	La production et le conditionnement des bactériocines	47
5.1	La production des bactériocines	47
5.2	Le conditionnement des bactériocines.	49

IV.6- Les applications des bactériocines dans l'industrie alimentaire.	49
6.1 Les propriétés des bactériocines pour une application alimentaire.....	49
6.2 L'application de la bactériocine.	50
6.3 Les facteurs influençant l'activité des bactériocines dans les produits alimentaires.	51
6.4 La combinaison de différentes bactériocines pour augmenter la durée de vie du produit	52

Matériel et Méthodes

1. Introduction	53
2. Matériels biologique et conditions de culture	53
2.1 Les échantillons.....	53
2.2 Provenance des bactéries pathogènes.....	54
2.3 Milieux et conditions de culture.....	54
3. Isolement et dénombrement des bactéries lactiques.	55
3.1 Isolement des bactéries lactiques sur milieu MRS.....	55
3.2 Dénombrement de flores microbiennes dans le lait cru	55
4. Purification des isolats de bactéries lactiques	55
5. Conservation des souches pures.	56
5.1 Conservation courte durée	56
5.2 Conservation longue durée.....	56
6. Caractérisation et identification des souches	56
6.1 Etude morphologique.	56
6.2 Tests biochimiques et physiologiques.....	57
6.3 Identification des espèces.....	59
7. Etude cinétique	59
7.1 Mesure de l'acidité par titrimétrie et pH métrie.	60
7.2 Mesure de la croissance.....	60
8. Etude des interactions avec les bactéries pathogènes.....	61
8.1 Recherche des inhibitions.....	61
8.2 La nature de la substance antimicrobienne	61

Résultats et discussion

1. Examen des échantillons.	64
2. Dénombrement de la microflore lactique.	64
3. Isolement, identification et caractérisation des isolats	66
3.1 Caractérisation macroscopique.	66
3.2 Caractérisation microscopique.	68
3.3 Caractérisation physiologique et biochimique	70
4. Etude technologique	79
4.1 Cinétique d'acidification et mesure de croissance.	79
5. Résultats des interactions entre les bactéries lactiques et les bactéries pathogènes.	85
5.1 La nature de l'agent inhibiteur	85
5.2 L'action des lactobacilles sur la croissance de <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Escherichia coli</i> sur milieu solide	88
Conclusion.	94
Références bibliographiques.	96
Annexe	115

Résumé

Les bactéries lactiques sont des microorganismes, utilisées dans la fermentation des aliments, ainsi que pour leurs rôles bénéfiques dans la production des substances antimicrobiennes. Les souches lactiques appartenant au genre *Lactobacillus*, ont été isolées et identifiées à partir du lait cru de chèvre provenant de différentes régions de l'Oranie. Les 19 souches de lactobacille ont révélé une activité antimicrobienne et se répartissent en 4 souches de *Lactobacillus intestinalis*, 2 souches de *Lactobacillus rhamnosus*, 1 souche de *Lactobacillus plantarum*, 4 souches de *Lactobacillus casei*, 2 souches de *Lactobacillus delbrueckii subsp delbrueckii*, 1 souche de *Lactobacillus paracasei subsp paracasei*, 3 souches de *Lactobacillus acidophilus* et 2 souches de *Lactobacillus johnsonii*.

La production de l'acide lactique et la variation du pH ont été suivies en fonction du temps et présentent des différences chez les bactéries lactiques étudiées. La souche la plus performante qui présente une production importante de l'acide lactique et une fermentation rapide du lait est la souche *Lactobacillus johnsonii* (Cb1). Leur pouvoir antagoniste résulte aussi d'une compétition pour les substrats et à l'élaboration de bactériocines qui inhibent les bactéries indésirables.

Les deux bactéries pathogènes responsables de toxico-infections (*Escherichia coli* ATCC 25921 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) sont toutes les deux sensibles à l'effet inhibiteur des 19 souches, l'étude des interactions a révélé que les bactériocines produites par les lactobacilles appartenant aux espèces *Lactobacillus johnsonii* (Cb1 et Cb2) et *Lactobacillus paracasei subsp paracasei* (Ab8) ont donné des inhibitions importantes vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.

L'effet de l'acide lactique a été éliminé par l'addition du tampon phosphate dans le milieu de culture, les tests d'enzymes (trypsine et α -chymotrypsine) révèlent la nature protéique de la substance antimicrobienne (bactériocine) impliquée dans l'inhibition de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.

Mots clés : *Lactobacillus*, lait cru de chèvre, germes pathogènes, interactions, acide lactique, bactériocines.

Summary

Lactic acid bacteria are microorganisms used in food preservation and human health by producing antimicrobial substances.

In this work strains of lactic acid bacteria were isolated and identified from raw goat's milk which were collected from different regions in the country. All the strains were belonging to *Lactobacillus* species, 19 strains of *Lactobacillus* showed an antimicrobial activity against pathogenic bacteria as the following (*Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*) and were divided into 4 strains of *Lactobacillus intestinalis*, 2 strains of *Lactobacillus rhamnosus*, one strain of *Lactobacillus plantarum*, 4 strains of *Lactobacillus casei*, 2 strains of *Lactobacillus delbrueckii subsp delbrueckii*, 1 strain of *Lactobacillus paracasei subsp paracasei*, 3 strains of *Lactobacillus acidophilus*, and 2 strains of *Lactobacillus johnsonii*. Production of lactic acid and pH variation were studied in function to time, results obtained revealed differences among the strains of lactic acid bacteria isolated. The highest performance strain which presented important production of lactic acid and a rapid fermentation of milk is strain *Lactobacillus johnsonii* (Cb1).

Moreover, its antagonistic capacity also elaborated in the inhibition of altered germs by the production of these substances. The 2 pathogenic bacteria responsible for toxic-infections (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25921) were very sensitive to the inhibitory effects of these strains. The study of these interactions revealed that the *Lactobacillus* strains producing bacteriocins and have giving the important inhibition, against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, were belonging to species *Lactobacillus johnsonii* (Cb1 et Cb2) and *Lactobacillus paracasei subsp paracasei* (Ab8). The effect of lactate was vanished by the addition of pad phosphate in the medium. The use of enzymes (Trypsine and α -chymotrypsine) revealed the proteic nature of the antimicrobial substance (bacteriocin) implied in the inhibition of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

Keys words: *Lactobacillus*, raw goat's milk, pathogenic bacteria, interactions, lactic acid, bacteriocins.

المخلص

بكتيريات اللبن هي عبارة عن كائنات مجهرية كثيرة الاستعمال في المجال الصناعي الغذائي وهذه الخاصية تعود لإفرازاتها لبعض المواد المضادة لنمو الكائنات الضارة. السلالات اللبنية التي تنتمي إلى بكتيريا الحليب *Lactobacillus* . تم عزلها وتعريفها من الحليب النئ للماعز مناطق مختلفة في ضواحي وهران. 9 سلالة من بكتيريا الحليب *Lactobacillus* أظهرت قدرة وقسمناها إلى 4 سلالات نموذجية من *Lactobacillus intestinalis* ، 2 سلالات من *Lactobacillus rhamnosus*، سلالة واحدة من *Lactobacillus plantarum*، 4 سلالات من *Lactobacillus casei*، سلالتين من *Lactobacillus delbrueckii subsp delbrueckii* سلالة واحدة من *Lactobacillus paracasei* ، 3 سلالات من *Lactobacillus acidophilus* وسلالتين من *Lactobacillus johnsonii* .

دراسة منحنى إنتاج حمض اللبن وتغيرات الحموضة pH بالنسبة للوقت أظهرت اختلافا بين بكتيريا اللبن المعزولة السلالة التي أنتجت حمض اللبن بأعلى كمية وأعطت تخميرا سريعا للحليب هي السلالة *Lactobacillus johnsonii* (CB1). تقوم هذه البكتيريات بإنتاج مواد مثبطة للبكتيريات الممرضة ال وهي البكتيريوسينات. أما بالنسبة للبكتيريتين الضارة المتسببة في تسممات غذائية المعروفة بـ:

(*Escherichia coli* ATCC 25921 et *Staphylococcus aureus* ATTC 25923)

فالنتائج بينت لنا أنها حساسة لمفعول المادة المثبطة التي أنتجها بكتيريا الحليب المذكورة سابقا. دراسة عملية التضاد ما بين السلالات بينت أن البكتيريوسينات المنتجة من طرف بكتيريا الحليب *Lactobacilles* التي تنتمي إلى الهويات التالية *Lactobacillus johsonni* (CB1et CB2) و *Escehrichia Lactobacillus paracasei subsp paracasei* أعطت تضاد معتبر مع *Staphylococcus aureus* و *coli* علما أننا قد نزعنا مفعول حمض اللبن. أثبتت مختلف التجارب أن طبيعة المادة المثبطة (بكتيريوسين) كانت بروتينية وهي المسؤولة على تثبيط *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus*.

مفتاح الكلمات : بكتيرية الحليب *Lactobacillus*، الحليب النئ للماعز، البكتيرية الممرض، التضاد، حمض اللبن، بكتيريوسينات.

Abréviations

NaCl : Chlorure de sodium.

pH : Potentiel hydrogène.

Subsp: Sous-espèce.

MRS: Man, Rogosa, Sharp.

BCP: Pouppe de bromocrésol.

°C : Degré celsius.

h : Heure

L : Litre

ml : Millilitre.

mm : Millimètre.

Min : Minute.

µl : Microlitre.

St : Souche en touche.

T/min : Tour par minute.

ufc : Unité formante colonie.

MH : Milieu Muller Hinton.

G : Grossissement.

Cat : Catalase.

ADH : Arginine déhydrogénase.

Arg : Arginine.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

BL : Bactéries lactiques.

Lb. : *Lactobacillus*.

QAL : Quantité de l'acide lactique.

°D : Degré dormic.

g/l : Gramme /litre.

V : Volume.

N : Nombre.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Mécanisme de la fermentation du lactose par les bactéries lactiques.

Tableau 2 : Caractéristiques des ferments lactiques (*Lactococcus* et *Streptococcus*).

Tableau 3 : Principaux caractères des *Leuconostoc*.

Tableau 4 : Principaux caractères des *Pediococcus*.

Tableau 5 : Critères différentiels des trois groupes des Lactobacilles.

Tableau 6 : Principaux caractères des Lactobacilles.

Tableau 7 : Origine des échantillons utilisés.

Tableau 8 : Les codes et les origines des souches pathogènes.

Tableau 9 : Milieux de cultures utilisés et conditions d'incubation pour les lactobacilles.

Tableau 10 : Le dénombrement de la microflore contenu dans le lait cru de chèvre.

Tableau 11: Les différentes formes et modes d'associations des souches isolées observés au microscope ($G \times 100$).

Tableau 12 : Caractères physiologiques et biochimiques des souches de lactobacilles.

Tableau 13 : Résultat du test des sucres pour l'indentification des espèces.

Tableau 14 : Résultats d'identification des genres et espèces après comparaison avec des tableaux référentiels (BjörKroth et Holzapfel, 2006 ; Hammes et Hertel ,2006).

Tableau 15 : La variation du pH et la production de l'acide lactique (°D) des 3 souches.

Tableau 16 : Résultats du dénombrement chez les 3 souches.

Tableau 17 : Résultats du calcul du log ($Nbre \times 10^8$).

Tableau 18 : Résultats du traitement thermique et enzymatique.

Tableau 19: Résultats des zones d'inhibitions des bactéries lactiques avec les bactéries pathogènes.

Liste des figures

Figure 1 : Métabolisme homofermentaire du lactose et du galactose chez les bactéries lactiques.

Figure 2 : Métabolisme hétérofermentaire du lactose et du galactose chez les bactéries lactiques.

Figure 3 : Métabolisme de l'arginine.

Figure 4 : Aspects des colonies de bactéries lactiques en surface sur milieu MRS solide.

Figure 5 : Aspects des cultures pures des lactobacilles en milieu MRS liquide (de gauche à droite : Témoin-Ab7-Bb4-Cb1-Aa3-Ab9 et Bb5).

Figure 6 : Observation microscopique des souches de bactéries lactiques (au grossissement. 100).

Figure 7 : L'aspect des colonies de lactobacilles sur milieu M16 BCP.

Figure 8 : Résultats du test des sucres : T: Témoin, S1 : Mannitol, S2 : Saccharose, S3 : Levulose , S4 :Rhamnose , S5:Galactose, S6:Xylose, S7: Esculine, S8:Sorbitol, S9: Arabinose, S10:Maltose, S11:Fructose, S12:Lactose, S13: Glucose et S14: Raffinose.

Figure 9 : Variations du pH et de quantité d'acide lactique (exprimé en °D) produite par les trois souches en fonction du temps.

Figure 10 : Représentation graphique de la croissance exprimé par $\log (\text{Nbre} \cdot 10^8)$ en fonction du temps.

Figure 11 : Résultats des interactions des bactéries lactiques avec *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Figure 12 : Résultats des interactions des bactéries lactiques avec *Escherichia coli* ATCC 25921.

Figure 13 : Diamètre des zones d'inhibitions (en cm) des souches de bactéries lactiques avec *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

INTRODUCTION

En Algérie, l'élevage caprin vient en seconde position (14%) après les ovins. Il se trouve concentré essentiellement dans les zones de montagnes, des hauts plateaux et des régions arides. Il est caractérisé par son adaptation aux conditions climatiques du pays et contribue à la formation du revenu et à la couverture de besoins en lait et viande d'une large couche de la population dans la plupart des zones difficiles (montagnes, hauts plateaux et régions arides).

A l'échelle nationale, la production laitière annuelle au cours de la dernière décennie est d'environ 1 milliard de litres dont 13% de lait de chèvre. La transformation du lait de chèvre en Raïb, Lben et Jben (fromage traditionnel), le plus souvent de qualité sensorielle variée, se fait par fermentation spontanée.

L'industrie laitière a pris un essor considérable par la sélection des souches de bactéries lactiques qui est basée sur la capacité de production d'acide lactique, de composés aromatiques, de bactériocines, de production de CO₂ et de résistance aux phages. Les caractères technologiques recherchés sont souvent codés par des plasmides entraînant donc une instabilité de ces caractères.

Les bactéries lactiques sont composées de coques et de bacilles et elles sont gram+, catalase -, anaérobie facultatif, exigeant de nombreux facteurs de croissance et se caractérisent principalement par la production d'acide lactique qui résulte de la fermentation des sucres. Les bactéries x trouvent dans des milieux naturels végétaux, animaux et humains (Valérie *et al*, 2003, Adams, 1995).

Les bactéries lactiques sont responsables de la production de plusieurs substances antimicrobiennes.

La production de ces substances par les bactéries lactiques sont responsable d'antagonismes qui permettent l'inhibition des bactéries pathogènes et prolonge la durée de conservation (Ganzel *et al*; 2000; Nes et Eijsink, 1999).

Il y a deux catégories de substances: de faibles poids moléculaires tel que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), le dioxyde de carbone le diacetyl, et de haut poids moléculaire comme les bactériocines (Piard et Desmazeaud, 1991, 1992 ; Ouwehaud, 1998). Parmi les bactériocines, qui sont utilisées dans les produits alimentaires, la nisine est la plus approuvée (Hansen, 1994).

Introduction

De nombreuses substances à activité antagoniste produites par les bactéries lactiques ont été mise en évidence et régulièrement de nouvelles bactériocines sont décrites (Rodrigues *et al.*, 2002 et Mansour *et al.*, 2004).

Notre travail porte sur l'étude des espèces du genre *Lactobacillus* isolées du lait cru de chèvre et tester leur pouvoir acidifiant et antimicrobienne à effet bactéricide vis-à-vis des bactéries pathogènes tel que *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.

Synthèse bibliographique

I. LAIT DE CHEVRE :**I.1 Données sur le cheptel caprin en Algérie :****1.1 Généralités :**

En Algérie, l'élevage caprin vient en seconde position (14%) après les ovins (26%) (Anonyme, 2000 a). Il se trouve concentré essentiellement dans les zones de montagnes, des hauts plateaux et des régions arides. Il est caractérisé par son adaptation aux conditions climatiques du pays et contribue à la formation du revenu et à la couverture de besoins en lait et viande d'une large couche de la population dans la plupart des zones difficiles (montagnes, hauts plateaux et régions arides).

Au cours de la dernière décennie, la production laitière annuelle est d'environ 1 milliard de litres dont 13% de lait de chèvre (Anonyme, 2000 b). La transformation du lait de chèvre en Raïb, Lben et Jben (fromage traditionnel), le plus souvent de qualité sensorielle variée, se fait par fermentation spontanée.

Le cheptel caprin algérien est représenté par la chèvre Arabe, la plus dominante en terme d'effectif et qui comprend trois ou quatre races, autrement ce cheptel comprend aussi la chèvre Kabyle (AnGR, 2003).

Bien que la population locale relativement homogène, une homogénéité apparaît dans les sous populations arabes et certains types kabyles, on peut distinguer quatre grandes sous populations selon le format et la morphologie: la Arabia (sahraouia), la Makatiya, la Mouzabit et la naine de Kabylie, auxquelles s'ajoute le cheptel importé et entre les quelles on rencontre les produits de croisements.

Quatre ressources génétiques sont l'origine des quatre populations majeures existantes en Algérie: syrien, nubien, méditerranéen et kabylien; ces populations algériennes sont en majorité de type traditionnel, le type Kurde et Nubio-syrien aux poils noirs, gros et résistant mélangé aux rameaux du Nord d'Afrique. Mais il existe dans certaines régions, des métissages avec les races méditerranéennes, comme la Maltaise, la Damasquine, la Murciana, la Toggenburg et plus récemment avec l'Alpine et la Saanen, qui ont fait l'objet aussi de tentatives d'élevage en race pure, spécialisée en production laitière dans la région de Kabylie (AnGR, 2003).

1.2 Les races caprines Algériennes et leurs principales caractéristiques:**1.2.1 La chèvre Arabe :**

- La race Arabe baïda:

Elle domine sur les hauts plateaux et les régions septentrionales du Sahara où elle est conduite avec des troupeaux de moutons qu'elle guide. Sa taille atteint 70 cm et sa robe est polychrome et présente fréquemment du blanc associé à du roux, du noir et du gris; elle est à poils longs. Cette race est très sensible à la trypanosomiase et ne peut être élevée que dans les zones qui ne sont pas infectées. Ce sont des animaux très rustiques qui peuvent rester deux jours sans boire (AnGR, 2003).

- La race Arabia (sahraouia) :

Race domestique la plus dominante, localisée dans la zone steppique ou semi steppique et présente un format peu développé; au niveau du phénotype elle manifeste des caractères plus homogènes : robe noire à long poils à aspect brun foncé, pattes blanches au dessus du genoux, raies blanches et fauves sur le visage, tâches blanches à l'arrière des cuisses. Elle se subdivise en deux sous-types : l'un sédentaire et l'autre transhumant. Cet animal est parfaitement adapté aux contraintes des parcours et semble posséder de bonnes aptitudes de reproduction. Comparativement au type transhumant le type sédentaire a les poils plus longs 14-21 cm contre 10-17 cm pour le type transhumant. La chèvre est principalement élevée pour la viande de chevreaux même si son lait, produit en faible quantité, représente un intérêt indéniable (AnGR, 2003).

- La race Makatiya :

Cette race est localisée dans les hauts plateaux et la région Nord de l'Algérie, aux caractères assez hétérogènes, grande taille, robe polychrome aux poils courts, oreilles tombantes, elle semble être le produit de multiples croisements réalisés à partir de races méditerranéennes. Elle est peu résistante sur parcours et son intérêt réside dans sa production laitière et son adaptation à l'environnement. Elle est utilisée également pour la production de viande et spécialement pour la peau et le cuir (AnGR, 2003).

- La race Mouzabit :

Chèvre principalement laitière, appelée également Touggourt, elle fait partie du rameau Nubio-Syrien, semble bien croisée avec les races méditerranéennes et parfois elle ressemble à la Makatiya (FAO, 1996). Cette chèvre est originaire de Metlili dans la région de

Ghardaïa; elle peut toutefois se trouver dans toute la partie septentrionale du Sahara (AnGR, 2003), également elle se retrouve surtout dans le sud.

L'effectif total est de 607 500 têtes avec 395 000 femelles reproductrices et 30 400 mâles reproducteurs. Cette race représente 22.5% du total des chèvres dans le pays. L'animal est de taille moyenne (65 cm), son corps allongé, droit et rectiligne. Sa tête est fine et cornée, alors que sa robe présente trois couleurs : le chamois, le blanc et le noir, d'où la répartition est : dominance du couleur chamois avec une bande axiale plus foncé ou noire est caractéristique, autrement la tête, façon ventrale et de genoux au dessous sont colorés de noir ou blanc. Cette race sera un noyau de l'Ombrine qui est une bonne laitière et très fertile (AnGR, 2003). Elle est très appréciée dans l'est méditerranéen pour ses capacités laitières.

1.2.2 La chèvre Kabyle:

•La race naine de la Kabylie :

La chèvre de la Kabylie est une chèvre autochtone qui peuple abondamment les massifs montagneux de la Kabylie, des Aurès et du Dahra. L'effectif total est d'environ 427.000 têtes avec 307.000 femelles reproductrices et 23.500 mâles utilisés pour la reproduction. Elle est robuste et massive, de petite taille, Son poil est long de couleur généralement brun foncé, parfois noir ; la tête de profil courbé, est surmontée de cornes. C'est une mauvaise laitière qui est appréciée pour sa viande (AnGR, 2003).

•La race montagnarde des Aurès :

C'est une chèvre qui ressemble à la naine de Kabylie. Elle est très appréciée pour la qualité et la longueur de ses poils. La différenciation par rapport à la précédente population se situerait pour les caractères « longueur des oreilles » qui s'exprime par l'allongement, constituant une défense contre les effets de la sécheresse et la «longueur des poils » qui est à la base d'une industrie artisanale.

I.2 Généralités sur le lait :

Le lait est un liquide blanc mat, légèrement visqueux, produit par les mammifères femelles. La composition et les caractéristiques physico-chimiques varient sensiblement selon les espèces animales, et même selon les races. Ces caractéristiques varient également au cours de la période de lactation, ainsi qu'au cours de la traite ou de l'allaitement.

Le lait est également un milieu biologique, il contient des cellules sanguines et mammaires (autour de 250 000 par ml) et des micro-organismes (autour de 15 000 par ml). Le lait est un aliment liquide complet, très nourrissant, réunissant à lui seul tous les composants nécessaires à l'alimentation humaine. 100 g de lait contient 87 g d'eau et 13 g de matières sèches (Queinnec, 2000).

Le lait est constitué de cinq composants majeurs: d'eau, de matières grasses, de protéines, de glucides et de matières minérales. Ces cinq constituants se retrouvent en quantités plus ou moins grandes dépendant de la provenance du lait.

I.3 Composition du lait de chèvre :

Le lait de chèvre est un aliment de grande importance à l'échelle mondiale. La «vache du pauvre» contribue grandement à l'alimentation humaine dans les pays en voie de développement. La composition du lait de chèvre dépend fortement de la race caprine et dépend aussi de la saison : en été, le rendement du lait est élevé et la teneur en lipides et protéines est faible alors qu'en hiver, c'est le contraire. La valeur énergétique de cent millilitres de lait de chèvre est d'environ 280 kJ (67kcal) (Wehrmüller et Ryffel, 2007).

3.1 Le lactose :

Le lactose est le principal glucide du lait. Dans le lait de chèvre (45 g/l), la teneur en lactose est environ 10 % inférieure à celle du lait de vache. La structure chimique du lactose du lait de chèvre est la même que celle du lait de vache. Le lait de chèvre peut apporter une solution aux personnes présentant une intolérance au lactose.

3.2 La lactoprotéine :

Dans le lait de chèvre comme dans le lait de vache, les lactoprotéines sont constituées de 80 % de caséines et de 20 % de protéines de lactosérum. Les caséines se présentent sous formes de micelles ; ce sont de grands agrégats de protéine et de phosphate de calcium. Il y a quatre types de caséine : α_1 , α_2 , β et κ . La teneur en ces protéines dépend du génotype des animaux. Dans le lait de vache, c'est la caséine α_1 que l'on rencontre le plus. La teneur en caséine α_1 du lait de chèvre varie fortement ; en général, la concentration en caséine β est la plus élevée.

3.3 La matière grasse :

La composition en acides gras du lait de chèvre (41 g/l) diffère assez de celle du lait de vache, et, par là même, le profil de fusion de la matière grasse du lait de chèvre. La matière grasse est plus molle que celle du lait de vache et présente un point de fusion inférieur : 23-25° C par rapport à 30-33° C pour le lait de vache (Wehrmüller et Ryffel, 2007).

3.4 Les vitamines et les sels minéraux :

- Le lait de chèvre contient plus de vitamines A et D que le lait de vache.
- La teneur en acide folique est nettement moins élevée que celle du lait de vache.
- La teneur en vitamine B₁₂ est légèrement inférieure à celle du lait de vache.
- Les teneurs en potassium, cuivre et manganèse sont légèrement plus élevées dans le lait de chèvre que dans le lait de vache.
- Le lait de chèvre contient un peu moins de zinc que le lait de vache.

I.4 Quelques propriétés du lait de chèvre :

- Le lait de chèvre est particulièrement blanc, en raison de l'absence de carotène dans la matière grasse. Sa stabilité thermique est inférieure à celle du lait de vache et son pouvoir tampon est supérieur à celui du lait de vache. Le lait de chèvre frais a un léger "goût de chèvre" dû à la présence d'acides gras saturés : les acides caprique, caprylique et caproïque.

- Les matières grasses du lait de chèvre sont facilement dégradables par les enzymes (lipases) dans le tube digestif. En plus, les acides gras à chaînes courtes et moyennes sont de bonnes sources d'énergie pour les enfants en phase de croissance et sont doués d'action hypocholestérolémique en inhibant le dépôt du cholestérol dans différents tissus de l'organisme (Hossaini Hilali, 1995).

- Les protéines du lait de chèvre présentent elles aussi quelques spécificités. Lorsqu'elles coagulent au niveau de l'estomac, elles forment des agrégats plus petits et plus faciles à être digérées par les enzymes (protéases) du tube digestif. En plus les acides aminés

résultant de la digestion des protéines du lait de chèvre sont plus efficacement absorbés au niveau du tube digestif que ceux du lait de vache (Hossaini Hilali, 1995).

- La biodisponibilité du fer contenu dans le lait de chèvre est plus grande que celle du lait de vache. Cependant, il faut être attentif au fait que le lait de chèvre est généralement pauvre en acide folique et en vitamine B12, ce qui peut entraîner des anémies chez les enfants nourris uniquement à base du lait de chèvre.

- Le lait de chèvre présente une action antiacide meilleure que celle du lait de vache. Raison pour laquelle il est conseillé dans le traitement des ulcères gastriques. Pour cet aspect, il existe même des différences liées à la race. Or, la teneur en protéines et celle en phosphates sont les principaux déterminants de l'action antiacide du lait (Hossaini Hilali, 1995).

- Plusieurs études scientifiques ainsi que des observations empiriques confirment que les personnes souffrant d'une allergie installée au lait de vache tolèrent mieux les protéines du lait de chèvre. Ceci, est probablement dû à la teneur faible du lait de chèvre en un type de caséines hautement allergisant.

En conclusion, on peut dire qu'à qualité hygiénique égale, le lait de chèvre présente des caractéristiques nutritionnelles (meilleures digestion et absorption) et thérapeutiques (actions antiacide et hypo-allergisante) plus appréciables que le lait de vache. Cela peut-il représenter une raison supplémentaire pour l'établissement d'une autre vision et stratégie de valorisation de l'élevage caprin dans notre pays? (Hossaini Hilali, 1995).

I.5 Flore microbienne du lait cru :

La flore microbienne du lait cru est très diversifiée. Selon son intérêt et ses conséquences en fromagerie, on peut la scinder en trois groupes :

- La flore utile ou technologique : Lactocoques, Lactobacilles, *Leuconostoc* et la flore de surface (levures, microcoques,...),....etc.
- La flore indésirable : Coliformes et *Pseudomonas*
- La flore potentiellement pathogène : *Escherichia coli*, *Staphylocoque* à coagulase positive, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, ... etc (Berodier, 2005).

Les équilibres bactériens présents dans le lait en fin de traite sont la conséquence des pratiques en amont : méthodes d'élevage, méthodes de traite et méthodes de nettoyage du matériel en contact avec le lait.

Cette flore microbienne, dite naturelle ou indigène, joue un rôle important dans la qualité des fromages au lait cru, en particulier sur le plan gustatif. Elle permet de préserver la typicité et une certaine diversité sensorielle des fromages (Berodier, 2005).

II. LES BACTERIES LACTIQUES :

II.1 Définition des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques comme leur nom l'indique, sont toute cellule vivante procaryote, hétérotrophe ou chimioorganotrophe, capable de produire l'acide lactique en grande quantité à partir de différents substrats carbonés (Desmazeaud, 1996 ; Euzeby, 2000).

Elles sont homofermentaires, si le produit terminal est l'acide lactique seul et, hétérofermentaires, si ce dernier est accompagné d'autres produits secondaires tels que l'éthanol, l'acétate et le CO₂ (Sneath, 1986; Balows *et al.*, 1992).

Toutes ces propriétés biochimiques restent insuffisantes pour caractériser définitivement une souche lactique, il est donc nécessaire de rendre compte aux caractères microbiologiques suivants : se sont des bacilles ou coques à Gram positif, généralement immobiles, asporulées, anaérobies mais aérotolérantes, dépourvues de la catalase, de la nitrate réductase et du cytochrome oxydase (Novel, 1993).

Ces bactéries lactiques sont des microorganismes dont certaines d'entre elles sont pathogènes, alors que d'autres jouent un rôle primordial dans l'élaboration de nombreux produits fermentés, comme le fromage, le pain, le vin,..., etc. (Patrick, 2001).

II.2 Habitât et taxonomie des bactéries lactiques :

En général, les bactéries lactiques peuvent être saprophytes, rencontrées chez les végétaux (plantes et fruits), ou commensales, retrouvées dans les cavités intestinales, vaginales et buccales de l'Homme et des animaux, comme elles peuvent être aussi isolées de nombreux produits alimentaires (Valérie *et al.*, 2003). A titre d'exemple, on peut citer :

- Les espèces du genre *Pediococcus* qui ne se rencontrent généralement que sur les plantes (François, 1986 ; Goto *et al.*, 2004).

- Les espèces du genre *Lactobacillus*, qui se rencontrent beaucoup plus dans la nature associées à l'Homme, aux plantes et aux animaux, comme elles sont présentes dans le lait cru, dans les produits laitiers et dans les laits fermentés (Valérie *et al.*, 2003).

- La plupart des espèces du genre *Streptococcus* sont saprophytes, certaines ont un caractère pathogène, elles se rencontrent surtout chez l'Homme, les animaux et les oiseaux (François, 1986 ; Hermier *et al.*, 1993).

- Les *Leuconostoc*, qui se retrouvent dans les produits laitiers, le vin et les liquides à base de sucre ainsi que sur les végétaux (Freyney, 2000).

La caractéristique qui fait l'unité de ce groupe de bactéries, est la production de l'acide lactique à partir de différents substrats carbonés. En dehors de ce point commun, les nombreux genres et espèces qui constituent ce groupe, présentent une grande hétérogénéité. Pour cela, la taxonomie des bactéries lactiques repose sur les caractères suivants :

2.1 Les caractères morphologiques :

Il existe deux grands groupes :

-Les coques (cocci), sont des bactéries sphériques ou plus au moins ovoïdes, de 0,5 à 1,5 μm de diamètre, associées par paires, en chainettes, en tétrades ou en amas (Filion, 2006).

-Les bacilles, sont des bactéries en forme de bâtonnets, qui peuvent être des bâtonnets droits ou des coccobacilles. Ils mesurent environ 0,2 à 2 μm de diamètre sur 1,5 à 10 μm de long, ils se présentent par paires ou en chainette (Bourgeois *et al.*, 1996).

2.2 Les caractères physiologiques et biochimiques :

La différenciation entre les espèces repose sur un ensemble de caractères à savoir : la quantité produite de l'acide lactique, les températures de croissance (minimale, optimale et maximale), la tolérance à l'oxygène et au chlorure de sodium, l'hydrolyse de l'esculine et de l'arginine, la résistance aux sels biliaires et les différents pH, la résistance aux inhibiteurs (bactériophages, antibiotique, lacténines, agglutinines) ainsi que les différentes aptitudes de la bactéries (acidifiante, aromatisante, protéolytique et gazogène,... etc.) (Schleifert et Ludwig 1995).

2.3 Les caractères structuraux :

Les méthodes de la chimiotaxonomie et celles de la taxonomie moléculaire renseignent, d'une part, sur la composition en peptidoglycanes et la nature des acides teïchoïques localisés au niveau de la paroi cellulaire. D'autre part, sur la composition de l'ADN qui permet de connaître l'homogénéité des espèces, exprimée par le coefficient de Chargaff (GC%).

A partir de ces différents caractères qui précèdent, la taxonomie des bactéries lactiques regroupe quatre principaux genres : *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* et *Leuconostoc*, selon Bergey's Manual (Sneath *et al.*, 1986).

II.3 Exigences et métabolisme des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques se caractérisent par des besoins nutritionnels particulièrement complexes. Outre la présence d'un sucre fermentescible, elles exigent la fourniture exogène d'acides aminés pour leur croissance, car elles sont incapables d'en effectuer la synthèse à partir d'une source azotée plus simple (Reiter et Oram, 1962 ; Cogan, 1980 ; Desmazeaud, 1983).

Les bactéries lactiques exigent aussi un certain nombre de vitamines, de bases azotées et de minéraux. Dans certain cas, le gaz carbonique serait essentiel pour leur croissance. L'importance aussi des ions dans le métabolisme, s'explique par leur fonction de cofacteur de nombreuses enzymes tels que le Mn^{2+} , le Mg^{2+} , le Fe^{2+} et le Ca^{2+} , souvent cité pour son rôle dans la paroi cellulaire ainsi que le K^+ qui sert à réguler le pH intra cellulaire.

Comme toute cellule vivante, les bactéries lactiques métabolisent les matières organiques dans les milieux environnants, afin d'assurer leur survie et leur production.

3.1 La température :

On peut subdiviser les bactéries lactiques selon leur température de croissance en bactéries mésophiles, qui ont une température optimale de croissance située au-dessus de la température ambiante (20 °C) et en-dessous de celle du corps humain (37 °C), et en bactéries thermophiles, qui ont une température optimale de croissance supérieure à 40 °C.

De même pour les réactions chimiques ordinaires, la vitesse de la réaction enzymatique est fonction de la température, elle décrit une courbe en forme de cloche qui résulte de deux phénomènes, d'une part, une augmentation de la vitesse de réaction avec l'élévation de la température, d'autre part, une diminution de l'activité engendrée par la dénaturation de l'enzyme (modification de la structure tertiaire de la protéine). Si l'on considère maintenant une cellule bactérienne formée de multiples enzymes de thermosensibilité différents, la vitesse globale des réactions enzymatiques (activité métabolique) en fonction de température, décrit une courbe de même allure que celle d'une enzyme isolée.

3.2 Le pH du milieu :

La cinétique des réactions enzymatiques, par conséquent celle du métabolisme cellulaire est fortement influencée par le pH, chaque enzyme présente un pH optimum d'action au-dessus et en-dessous duquel son activité diminue. L'imperméabilité de la

membrane cellulaire aux protons et autres ions est indispensable pour maintenir un pH interne relativement alcalin, le contraire, un milieu trop acide entraîne une diminution du pH intracellulaire et l'arrêt de la croissance et du métabolisme (De Roissart et Luquet, 1994).

3.3 Métabolisme des sucres :

Les bactéries lactiques aboutissent à la production d'énergie (ATP) et d'acide lactique par la fermentation des sucres. Le métabolisme du lactose par ces bactéries s'effectue selon trois phases : d'abord, le transport à travers la membrane, suivi par le clivage du disaccharide en ses composants, qui seront par la suite dégradés en monosaccharides par différentes voies métaboliques, selon l'espèce bactérienne.

Si la fermentation est homolactique, le métabolisme du lactose suit la voie d'Embden-Meyerof-Parnas (EMB), alors que dans le cas de la fermentation hétérolactique, la voie utilisée est celle des Pentoses-Phosphate (Desmazeaud, 1996).

Le tableau suivant (Tableau 1), résume les principales caractéristiques du métabolisme du lactose par les bactéries les plus utilisées en technologie laitière.

Tableau 1 : Mécanisme de la fermentation du lactose par les bactéries lactiques
(François, 1986).

Espèces bactériennes	Système de transport du lactose	Enzyme de clivage du lactose	Détermination génétique	Principale voie métabolique	Principaux produits de réaction
<i>S.cremoris</i>	PTS-PES	B-Pgal± β -gal	Plasmide	Hexoses-diphosphates	Lactate
<i>S.lactis</i>	PTS-PES	B-Pgal± β -gal	Plasmide	Hexoses-diphosphates	Lactate
<i>S.diacétylactis</i>	PTS-PES	B-Pgal± β -gal	Plasmide	Hexoses-diphosphates	Lactate, acétate, CO ₂
<i>Leuconostoc</i>	Perméase (?)	β -gal	?	Pentoses-phosphates	Lactate (d), acétate, CO ₂ et éthanol
<i>S. thermophilus</i>	Perméase	β -gal	-	Hexoses-diphosphates	Lactate
<i>Lactobacillus homolactiques</i> (a)	Perméase ou PTS, PES ou les deux	B-Pgal± β -gal (b)	Plasmide dans certaines espèces (c)	Hexoses-diphosphates	Lactate

- (a) *Lb. bulgaricus*, *Lb. lactis*, *Lb. helveticus*, *Lb. casei*.
- (b) β -gal seule présente chez *Lb. casei*.
- (c) *Lb. bulgaricus*, *Lb. helveticus*, *Lb. casei*.
- (d) Peu de lactate produit dans le lait.

Le métabolisme des sucres est soumis à une régulation par des mécanismes de répression et de rétroinhibition. En présence de différents sucres, la bactérie va les cataboliser successivement, dans un certain ordre. Des plasmides sont associés à certaines étapes du métabolisme du lactose (Desmazeaud, 1996).

D'autres études ont été consacrées aux enzymes intervenant dans le catabolisme des sucres et il en résulte une nouvelle division des bactéries lactiques sur la base de leur équipement enzymatique en trois groupes :

- Les homolactiques obligés (Figure 1).
- Les hétérolactiques obligés (Figure 2).
- Les homolactiques facultatifs, qui peuvent suivre l'une ou l'autre des voies métaboliques. (François, 1986).

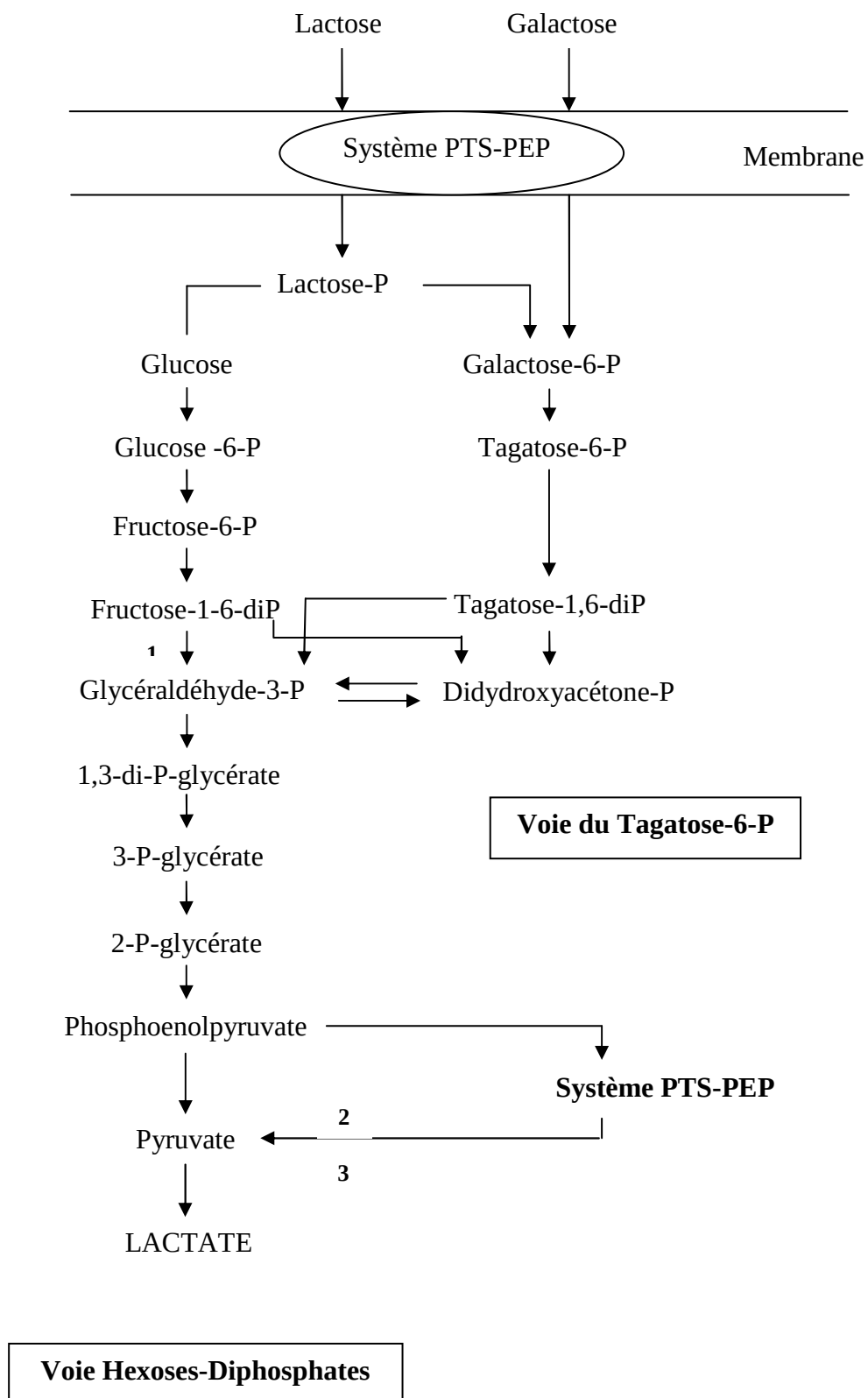


Figure 1 : Métabolisme homofermentaire du lactose et du galactose chez les bactéries lactiques (François, 1986).

1- Fructose-dip aldolase. 2- Pyruvate-kinase. 3- Lactate.

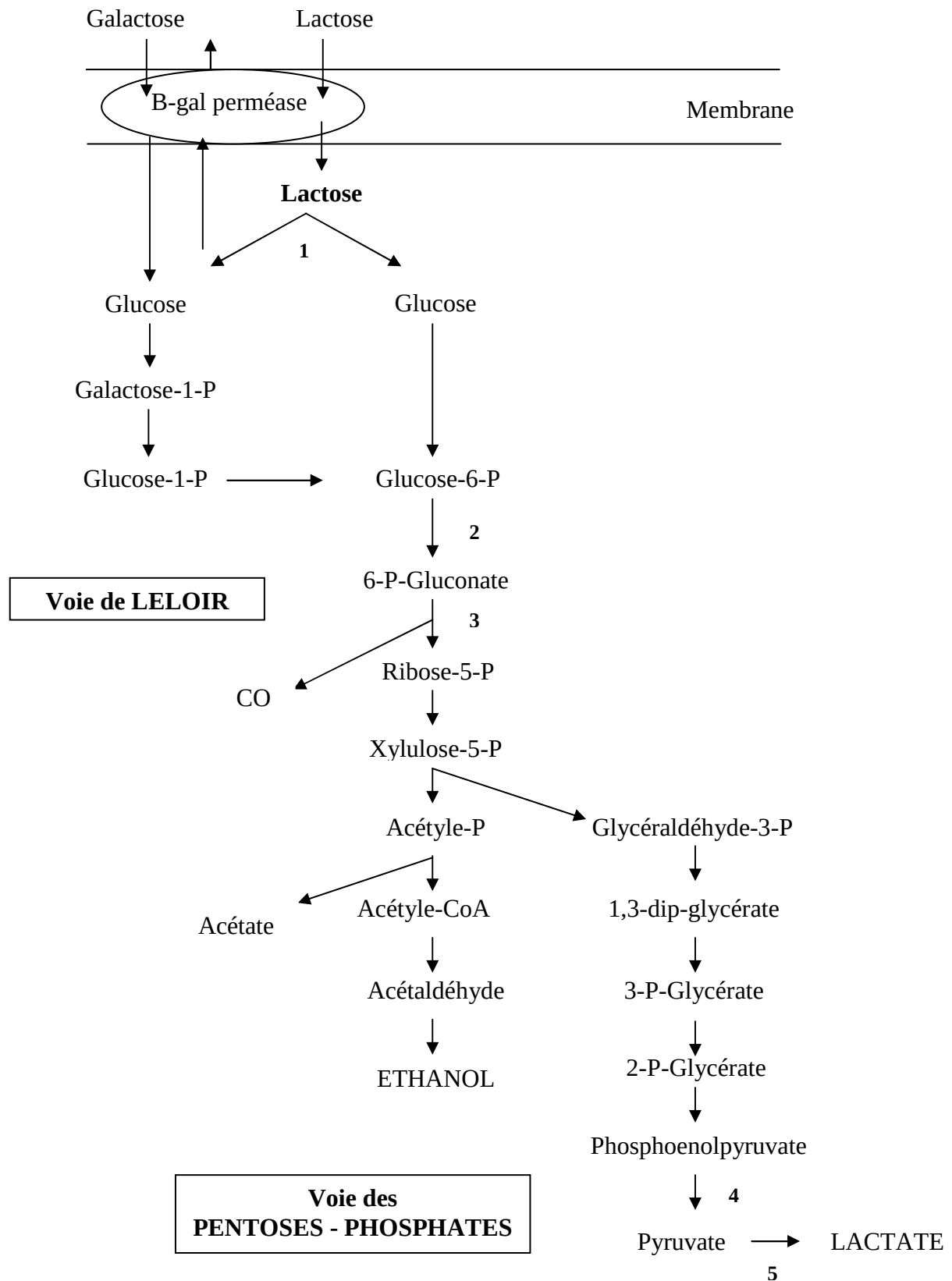


Figure 2: Métabolisme hétérofermentaire du lactose et de galactose chez les bactéries lactiques (François, 1986).

1- B-gal. 2- Galactose-6-P DH. 3- P-gluconate DH. 4- Pyruvate kinase. 5- Lactate DH.

3.4 Métabolisme du citrate :

Le citrate reste une substance clé dans l'élaboration des produits laitiers fermentés même qu'il est présent en faible quantité dans le lait (1,7 mg/ ml), par comparaison avec le lactose (49 mg/ ml) (François, 1986).

Le métabolisme du citrate conduit à la production d'arômes notamment le diacétyl particulièrement recherché dans certains produits laitiers tels que le beurre et les fromages frais.

La synthèse du diacétyl à partir du citrate chez *Lactococcus diacetylactis*, peut être variable selon les conditions de la fermentation :

Si l'oxygénation est importante, la décarboxylation oxydative de l' α - acétolactate sera favorisée et par conséquent, la formation du diacétyl (Hagenholtz, 1993). Parfois, l'absence de l' α - acétolactate décarboxylase chez certaines souches très productrices, bloque la conversion du citrate en acétoines et en 2,3- butendiol, mais comme l' α - acétolactate est très instable, la formation du diacétyl augmente malgré tout (Hagenholtz, 1993 ; Monnet *et al.*, 1999).

3.5 Métabolisme de l'arginine :

Chez les bactéries lactiques, l'arginine est un acide aminé dégradé par le système de l'arginine désaminase (ou arginine dihydrolase, voie ADI), qui fait intervenir trois enzymes agissant successivement : l'arginine désaminase, l'ornithine carbamyl transférase et la carbamate kinase, suivant l'illustration de la figure 3.

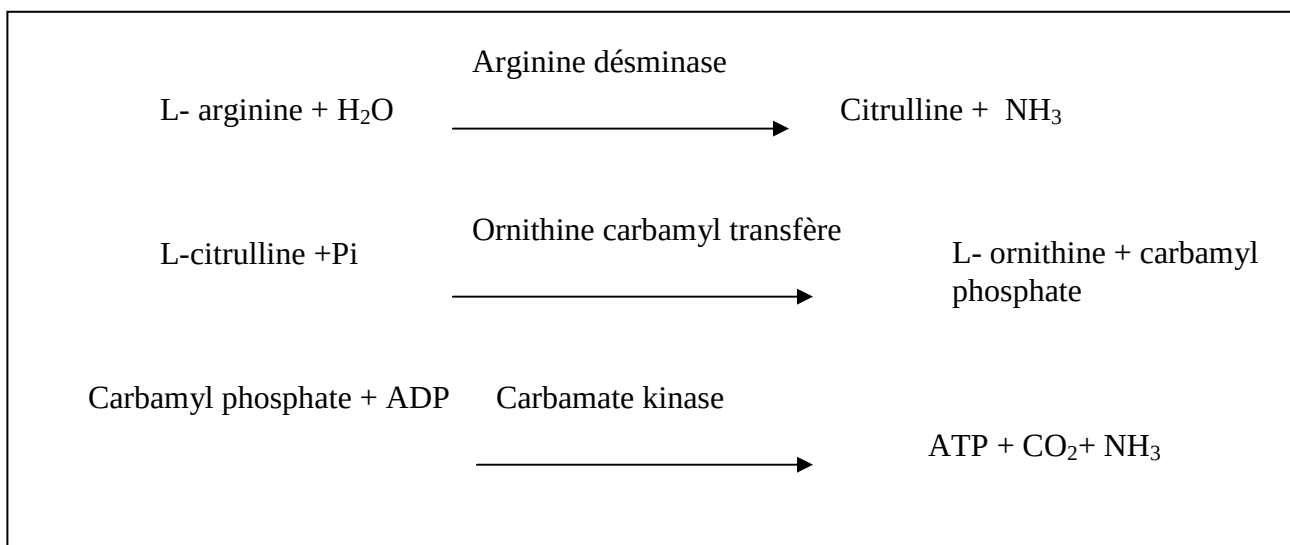


Figure 3 : Métabolisme de l'arginine

De l'arginine dans la cellule ne nécessite pas d'énergie. Ce transport se fait par un mécanisme d'antiport-arginine-ornithine, grâce aux différences de concentrations de ces deux acides aminés de part et d'autre de la membrane cytoplasmique (Thierry *et al.*, 2001).

On peut rencontrer le catabolisme de l'arginine chez le Groupe III des Lactobacilles alors qu'il est absent chez le Groupe I et II (Crow et Thomas, 1982). La caractérisation des trois enzymes a été réalisée chez *Lactobacillus buchneri* (Manca et Nadra *et al.*, 1982, 1986).

3.6 Métabolisme de l'oxygène :

Le besoin en oxygène diffère fortement entre les genres : ceux aérobies se développent exclusivement en présence d'air, les anaérobies en son absence et plusieurs genres peuvent croître dans les deux conditions. Pour les bactéries lactiques (souvent appelées bactéries aérobies facultatives), l'oxygène peut parfois leur être un substrat, mais conduit au peroxyde d'hydrogène qui leur est toxique (Desmazeaud, 1983).

La possession du NADH-oxydase semble être une propriété universelle des bactéries lactiques, en conditions d'aérobiose, les molécules de NAD réagissent avec l'oxygène pour former le peroxyde d'hydrogène grâce à des :

- NADH : H₂O₂ oxydase, décrite en premier chez *E.C. faecalis*,
- NADH : H₂O oxydase, purifiée notamment, à partir d'une souche de *Ln. mesenteroides subsp. mesenteroides* (Koike *et al.*, 1985).

De plus, une pyruvate oxydase, été découverte pour la première fois chez *Lb. delbriekii* et une α -glycerophosphate-oxydase, été rencontrée chez les espèces des genres *Enterococcus*, *Lactobacillus* et *Pediococcus pentosaceus*. Certaines souches possèdent une superoxyde desmutase à manganèse permettant l'élimination des radicaux libres oxygène. (Desmazeaud, 1996).

3.7 Activité protéolytique des bactéries lactiques :

Dans le lait, les acides aminés et les peptides sont en quantité limitante et les bactéries lactiques exigent leur présence pour assurer leur métabolisme, elles doivent donc faire appel à des sources exogènes (Mills et Thomas, 1981 ; François, 1986).

La dégradation des protéines du lait (caséines), joue un rôle crucial dans le développement de la texture et la flaveur des produits laitiers, elles sont utilisées grâce à des protéinases liées à la paroi sous l'influence des ions Ca²⁺. D'autre part, les bactéries lactiques

possèdent un riche équipement enzymatique en aminopeptidases liées aux membranes, en protéinases et en diverses exopeptidases intracellulaire (Desmazeaud, 1983).

II.4 Classification des différents genres de bactéries lactiques :

Selon Bergey's Manual (Sneath et *al.*, 1986), la classification des bactéries lactiques est représentée par quatre principaux genres, qui sont: *Streptococcus* (*Lactococcus*), *Lactobacillus*, *Pediococcus* et *Leuconostoc*, à ces genres s'ajoute récemment le genre *Bifidobacterium* (Kandler et Weiss, 1986).

4.1 *Streptococcus* :

Les espèces de ce genre peuvent croître à 45 °C, se sont les Streptocoques thermophiles, ou peuvent être mésophiles, se sont donc les lactocoques, d'où le genre *Lactococcus* et la principale espèce *Lactococcus lactis* (*Lc. lactis* subsp.). Parmi les *Lc. lactis*, deux sous espèces et un biovariant prédominant en fermentation laitière : *Lc. lactis* subsp. *lactis* (*Lc. lactis*), *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (*Lc. cremoris*) et *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* (*Lc. diacetylactis*).

La présence ou l'absence des plasmides varie entre les espèces de ce groupe de bactéries lactiques. Ils peuvent être nombreux chez les Streptocoques mésophiles et rares chez les Streptocoques thermophiles (Hoover et Steenson, 1993).

Le tableau ci-dessous (Tableau 2), montre quelques caractéristiques de ces souches.

Tableau 2 : Caractéristiques des ferments lactiques (*Lactococcus* et *Streptococcus*)
(Bourgeois et Leveau, 1991).

	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	<i>St.</i> <i>thermophilus</i>
ADH				
CO₂	+	-	+	-
Acétoïne	-	-	+	-
Culture à 10 °C	-	-	+	-
Culture à 37 °C	+	+	+	-
Culture à 40 °C	+	+	+	+
Culture à 45 °C	+	-	+	+
Croissance à pH 9,2	-	-	-	+
Résistance 30 mn à 63 °C	+	-	+	+
Culture à 4% NaCl	-	-	-	+
Culture à 4% NaCl	+	-	+	-
Acide à partir de :				
Arabinose	-	-	-	±
Dextrane	-	-	±	-
Galactose	+	+	+	-
Glucose	+	+	+	+
Maltose	+	-	+	+
Raffinose	-	-	-	±
Saccharose	-	-	-	+
Tréhalose	+	-	+	-

4.2 *Leuconostoc* :

La classification de Bergey fait apparaître quatre espèces :

1- *Ln. mesenteroïdes* qui comporte trois sous espèces : *Ln. mesenteroïdes* subsp. *mesenteroïdes*, *Ln. mesenteroïdes* subsp. *dextranum* et *Ln. mesenteroïdes* subsp. *cremovis*.

2- *Ln. paramesenteroïdes*

3- *Ln. lactis*

4- *Ln. oenos* (Sneath et al., 1986).

Les espèces de ce genre sont coccoïdes à lenticulaires et/ou coccobacilles, à Gram +, hétérofermentaires (Tableau 3) et produisent du CO₂, de l'acide lactique D (-) et de l'éthanol. Ils se développent en anaérobiose comme en aérobiose, sont mésophiles et incapables de cataboliser l'arginine. Leur présence agit sur le goût et l'arôme du lait suite à la production de certains composés aromatiques tels que l'acétoïne et le diacétyl (Laese, 2005).

4.3 *Pediococcus* :

Ce genre regroupe 8 espèces : *Pc. damnosus*, *Pc. parvulus*, *Pc. inopinatus*, *Pc. dextrinicus*, *Pc. pentosaceus*, *Pc. acidilactici*, *Pc. halophilus* *Pc. urinaeequi* (Sneath et al., 1986).

Les cellules de ces espèces sont sphériques, de 0,6 µm de diamètre, associées en tétrades, homofermentaires et produisent de l'acide lactique (DL) (Garvie, 1986). Les caractères de ces espèces sont résumés dans le Tableau 4.

Tableau 3 : Principaux caractères des *Leuconostoc*. (Novel, 1993).

	<i>Ln. mesenteroides</i> subsp.			<i>Ln. paramesenteroides</i>	<i>Ln. lactis</i>	<i>Ln. Oenos</i>
	<i>Mesenteroides</i>	<i>dextranicum</i>	<i>Cremoris</i>			
Culture à 10 °C	+	+	+	+	+	+
Culture à 37 °C	+	+	-	+	+	-
Culture à 39 °C	-	-	-	-	+	-
Culture à 45 °C	-	-	-	-	-	-
Hétérofermentation	+	+	+	+	+	+
Citratase	-	-	+	-	+	+
Formation de dextrane	+	+	-	-	-	-
Arginine dihydrolase	-	-	-	-	-	-

Tableau 4 : Principaux caractères des *Pediococcus* (Bourgeois et Leveau, 1991).

	<i>Pc. damnosus</i>	<i>Pc. parvulus</i>	<i>Pc. inopinatus</i>	<i>Pc. dextrinicus</i>	<i>Pc. pentosacens</i>	<i>Pc. acidilactici</i>	<i>Pc. halophilus</i>	<i>Pc. urinaequei</i>
Acide lactique produit	DL	DL	DL	L(+)	DL	DL	L(+)	L(+)
Croissance à 35 °C	-	+	+	+	+	+	+	+
Croissance à 50 °C	-	-	-	-	-	+	-	-
Croissance à pH 4,2	+	+	-	-	+	+	-	-
Croissance à pH 8,5	-	-	-	-	±	±	+	+
Croissance en NaCl								
A 4%	-	+	+	+	+	+	±	+
A 6,5%	-	+	±	-	+	+	+	+
A 18%	-	-	-	-	-	-	+	-

4.4 *Lactobacillus* :

Ce genre de bactéries comprend 44 espèces selon la classification de Bergey (Sneath *et al.*, 1986). Il est subdivisé en trois groupes :

-Le groupe I :

Se sont des lactobacilles homofermentaires stricts, représentés par le genre *Thermobacterium*, qui comprend 15 espèces, on peut distinguer :

- Un groupe centré sur *Lb. delbrueckii*, avec ses trois sous espèces : *Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*.
- Un autre groupe centré sur *Lb. acidophilus*. On y trouve notamment *Lb. acidophilus*, *Lb. gasseri*, *Lb. grispatus* et *Lb. helveticus* (Bottazzi, 1988 ; Joseph-Pierre et Guiraud, 2003).

- Le groupe II :

Se sont les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs, représentés par le genre *Streptobacterium*, qui comprend 03 groupes : le premier groupe formé par *Lb. plantarum*, le second par *Lb. casei* et ses sous espèces (*Lb. casei* subsp. *casei*, *Lb. casei* subsp. *pseudoplantarum*, *Lb. casei* subsp. *tolerans*, *Lb. casei* subsp. *rhamnosus*) et le troisième qui regroupe *Lb. sakei*, *Lb. curvulus* et *Lb. Bavaricus*. (Joseph-Pierre et Guiraud, 2003).

- Le groupe III :

Correspond aux lactobacilles hétérofermentaires stricts, représenté par le genre *Betabacterium* avec ses 18 espèces dont on peut citer : *Lb. bifermentans*, *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, *Lb. fermentum*, *Lb. kefi*, *Lb. confusus* et *Lb. viridescens* (Bourgeois et Leveau, 1991).

Les critères différentiels des trois groupes des *Lactobacillus* sont représentés dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Critères différentiels des trois groupes des lactobacilles (Bourgeois et Larpent, 1996).

	<i>Thermobacterium</i>	<i>Streptobacterium</i>	<i>Betabacterium</i>
A.D.H.	-	±	+
Glucose (gaz)	-	-	+
Glucosides	±	+	-
Gluconate (gaz)	-	+	+
Aldolase	+	+	-
Pentoses	-	±	±
Thiamine	-	-	+
Acide lactique	DL ou L	D ou DL	DL
G + C %	34,7 – 50,8	33 – 46,4	35 – 53,4

4.5 *Bifidobacterium* :

Les bifidobactéries, sont des bâtonnets de différentes forme : courtes, coccoïdales, ramifiées, bifurquées, spatulées, isolées ou en chaines, disposées en V ou en palissade. Se sont des bactéries non productrices de gaz, présentent dans l'intestin de l'homme, dans la cavité buccale, dans le tractus gastro-intestinal de l'animal, dans l'intestin de l'insecte et dans les eaux résiduaires. (Venturo *et al.*, 2004).

Parmi les espèces identifiées chez l'humain, il y a : *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. breve*, ... etc. (Scandovi, 1984). Tandis que les bifidobactéries d'origine animale sont principalement : *B. suis*, *B. thermophilin*, *B. animalis*, et *B. pseudolongum* (Mattenzzi *et al.*, 1971 ; Simpoon *et al.*, 2003).

II.5 Caractéristiques générales sur les lactobacilles :

C'est un genre très hétérogène dans le groupe des bactéries lactiques. Il renferme des aspects morphologiques variés entre les espèces. Les bactéries appartenant à ce genre peuvent être un bacille long et fin, un coccobacille, un bâtonnet court ou légèrement flexueux (Siegumfeldt *et al.*, 2000).

Le pH optimal pour la croissance d'un Lactobacille est compris entre 5,5 et 6,2. Il peut résister au stress acide mieux qu'un Lactocoque. Certaines souches sont thermophiles (Groupe I), d'autres mésophiles (Groupe II) (Badis *et al.*, 2005).

Les lactobacilles réalisent la fermentation homolactique suivant la voie d'Embden-Meyerof-Parnas (EMP) ou la fermentation hétérolactique suivant la voie des pentoses phosphate, dont on distingue deux cas :

- Soit hétérolactique stricts avec production de l'acide lactique, l'acide acétique, l'éthanol et le CO₂,

- Soit hétérolactique facultatifs avec production de l'acide lactique ou de l'acide lactique et l'acide acétique (Vandamme *et al.*, 1996).

D'autres caractères des lactobacilles sont mentionnés sur le tableau 6.

Les lactobacilles sont présents un peu partout dans des milieux naturels très divers d'origine animale ou végétale, dans les produits laitiers, la viande, l'eau, les eaux d'égouts, la bière, les fruits, ..., comme ils font partie aussi de la flore normale du corps humain (Lansing *et al.*, 2003).

En générale, ils ne sont pas pathogènes, par contre, ils sont d'une grande importance dans les technologies alimentaires, à savoir la fabrication des levains, l'élaboration des probiotiques, la conservation des aliments, ..., etc. (Euzeby, 2000a).

Tableau 6 : Principaux caractères des lactobacilles (Bourgeois et Leveau, 1991).

	Croissance à 15 °C	Croissance à 45 °C	Lactose	Saccharose	Gluconate	Ribose	Xylose	Arginine dihydrolase
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	-	+	-	+	-	-	-	±
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	-	+	+	+	-	-	-	±
<i>Lb. acidophilus</i>	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>Lb. gasseri</i>	-	+	±	+	-	-	-	-
<i>Lb. grispatus</i>	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>Lb. helveticus</i>	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>Lb. plantarum</i>	+	-	+	+	+	+	±	-
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i>	+	-	±	+	+	+	-	-
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>pseudoplantarum</i>	+	-	±	+	+	+	-	-
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>tolerans</i>	+	-	±	-	-	-	-	-
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>ramnosus</i>	+	-	+	+	+	+	-	-
<i>Lb. sake</i>	+	-	+	+	+	+	-	-
<i>Lb. curratus</i>	+	-	±	-	+	+	-	-
<i>Lb. bavaticus</i>	+	-	+	+	+	+	-	-
<i>Lb. bifementans</i>	+	-	-	-	-	+	-	-
<i>Lb. brevis</i>	+	-	±	±	+	+	±	+
<i>Lb. buchneri</i>	+	-	±	±	+	+	±	+
<i>Lb. fermentum</i>	-	+	+	+	+	+	±	+
<i>Lb. kefi</i>	+	-	+	-	+	+	-	+
<i>Lb. confusus</i>	+	-	-	+	+	+	+	+
<i>Lb. viridescens</i>	+	-	-	±	-	-	-	-

II.6 Intérêts des bactéries lactiques :

6.1 En alimentation :

Voilà au moins quatre mille ans que l'homme se sert des bactéries lactiques pour la fermentation d'aliments. Ces bactéries sont utilisées dans le monde entier, en particulier dans les laitages fermentés comme par exemple le yaourt, le fromage, le beurre, le babeurre,... etc.

Les bactéries lactiques appartiennent à un groupe de bactéries bénéfiques, dont les vertus se ressemblent, et qui produisent de l'acide lactique comme produit final du processus de fermentation. Elles sont partout dans la nature, et se trouvent aussi dans le système digestif de l'homme. Si elles sont surtout connues pour le rôle qu'elles jouent dans la préparation des laitages fermentés, elles sont utilisées également dans le saumurage des légumes, la boulangerie, la fabrication du vin, le saurissage des poissons et des viandes et elles améliorent aussi la conservation des aliments et agissent sur les textures et les saveurs qui se révèlent différentes de celles de l'aliment à son état originel (Euzeby, 2000a).

C'est l'acide lactique qui donne aux laitages fermentés cette saveur légèrement aigrelette caractéristique. D'autres sous-produits des bactéries lactiques donnent saveurs et arômes supplémentaires. Par exemple, l'acétaldéhyde donne au yaourt son arôme si caractéristique ; le diacétyl donne une saveur crémeuse à d'autres laitages fermentés.

6.2 Comme probiotiques :

Aujourd'hui, les " bons amis " probiotiques sont utilisés aussi dans un grand choix de laitages fermentés qui vont du kéfir (boisson liquide) jusqu'au yaourt (plus consistant).

Le yaourt est le résultat de la symbiose de deux types de bactéries lactiques qui répondent aux deux noms de *Streptococcus thermophilus* et de *Lactobacillus bulgaricus*. Chacune des deux bactéries stimule la croissance de l'autre. Ce lien symbiotique donne un produit différent des produits obtenus par les bactéries simples, prises séparément. Grâce à la symbiose des deux bactéries, la fermentation a lieu plus rapidement que s'il n'y avait qu'une seule espèce de bactérie.

Le yaourt et d'autres laitages fermentés nous donnent l'occasion de nous servir des bactéries lactiques comme de cultures probiotiques. Les cultures probiotiques favorisent le

bon fonctionnement de notre flore intestinale. Le marché mondial de ces produits se développe de plus en plus, pour répondre aux besoins d'un public de plus en plus à l'écoute de sa forme et de sa santé.

Les bactéries lactiques se comportent donc comme d'excellents ambassadeurs d'un monde microbien souvent calomnié. Elles ne se réduisent pas à leur importance économique, mais jouent un rôle important dans l'entretien et l'amélioration de la santé de l'homme. (Fuller, 1989).

III. LES DIFFERENTES INTERACTIONS EXISTANTE CHEZ LES BACTERIES LACTIQUES :

III.1 Définition des différentes interactions microbiennes :

Plusieurs microorganismes peuvent vivre dans un environnement où il s'établit obligatoirement des interactions entre eux dont chacun représente une composante d'un système. Ces interactions peuvent avoir lieu entre différentes populations, moisissures et bactéries à titre d'exemple et même au sein d'une population regroupant différentes espèces ainsi qu'entre différentes souches d'une même espèce. On peut classer ces interactions selon leur nature en tenant compte de deux principaux critères : La présence ou l'absence de contact physique entre les composantes et la conséquence de l'interaction (inhibitrice, activatrice,...) sur chacune des composantes (Renouf, 2006).

1.1 Différents types d'interactions:

✓ **Le commensalisme** : Dans laquelle une espèce (espèce commensale) tire profit de l'espèce hôte sans qu'il y ait des dommages.

✓ **La synergie** : Une des espèces élabore un produit qui favorise le métabolisme de l'autre espèce.

✓ **L'antagonisme** : Une des espèces excrète une substance à activité antibiotique ayant un effet sur l'autre espèce.

✓ **Le neutralisme** : Aucune interaction ne se manifeste entre les deux espèces cohabitant dans le même biotope.

✓ **La symbiose** : Croissance de deux espèces bactériennes dans un même biotope, à leur profil mutuel.

III.2 Différentes interactions existantes chez les bactéries lactiques :

Lorsqu'on utilise les bactéries lactiques dans une culture servant à la fermentation du lait, des interactions entre les différentes souches se manifestent. On a classé ces interactions en deux groupes : l'antagonisme et la stimulation.

2.1 Les phénomènes de stimulation :

Les phénomènes de stimulation sont divisés en plusieurs catégories. On cite le mutualisme ou la protocoopération, lorsque l'interaction est positive pour chacune des populations et le commensalisme, lorsque les substances produites stimulent une population ou une autre population détruit le facteur inhibiteur. L'interaction est nécessaire à la survie des populations dans le cas du mutualisme contrairement à la protocoopération qui constitue un caractère facultatif (Choisy *et al.*, 1997).

L'interaction qui existe entre les lactobacilles et les streptocoques thermophiles est particulièrement exploitée pour la fabrication des yaourts. Au préalable, les lactobacilles se développent en favorisant leurs activités protéolytiques et aminopeptidasiques qui permettent la stimulation de la croissance des streptocoques voir même des souches de lactocoques protéinase positive (Prt^+) et négative (Prt^-) associée en culture mixte. Certains variants de lactocoques présentent une déficience dans leur système protéolytique résultant, notamment, de la perte des plasmides codant en partie pour la protéinase de paroi (Prt^-) et le système de transport Opp (Yu *et al.*, 1996). En cultures mixtes dans le lait, la croissance des deux variants est identique tant que la concentration en NPN est suffisante. Dans un second temps, lorsque la source de NPN est épuisée, la croissance du variant Prt^- est stimulée, comparativement à une culture pure par l'activité protéolytique du variant Prt^+ qui favorise la libération de fractions azotées de faible poids moléculaire utilisables directement par les cellules. Cependant l'hydrolyse des caséines par les souches Prt^+ est trop faible afin d'assurer une croissance accrue des deux souches. Par conséquent, le développement du variant Prt^+ se trouve inhibé par compétition pour les oligopeptides avec le variant Prt^- (Julliard *et al.*, 1994 et 1996). L'association des deux types de variants est également profitable pour éviter les défauts d'amertume : les peptides amers générés par les protéinases des souches Prt^+ pouvant être dégradés par l'activité aminopeptidasique des variants Prt^- . De nombreuses études ont également porté sur l'association de *Lactobacillus* NSLAB et de lactocoques, afin de développer des arômes durant l'affinage des fromages (El Soda *et al.*, 2000).

2.2 Les phénomènes d'inhibition :

La fermentation est utilisée depuis longtemps comme un mode de conservation des aliments. Pendant la fermentation du lait, plusieurs agents antimicrobiens sont capables d'inhiber le développement de bactéries pathogènes et/ou d'une flore de dégradation de l'aliment sont produits par les bactéries lactiques. Tandis que ces agents peuvent interrompre

la croissance des souches productrices s'ils atteignent ou dépassent un certain seuil de concentration, ce phénomène s'appelle l'auto inhibition, et/ou des autres souches constituant le levain. Ce type d'interaction où on produit une substance inhibitrice est appelé l'amensalisme. C'est notamment le cas des acides organiques issus des mécanismes homofermentaires et hétérofermentaires des bactéries lactiques. Le peroxyde d'hydrogène peut aussi jouer le rôle d'inhibiteur en comparant avec d'autres genres bactériens car d'autres bactéries lactiques sont dépourvues de catalase capable de dégrader ce composé toxique. L'action inhibitrice du peroxyde d'hydrogène peut être forcée par le système lactoperoxydase-thiocynate présent naturellement dans le lait (Gilliland, 1985).

En présence d'H₂O₂, le thiocynate est oxydé en un composé bactériostatique pour les bactéries Gram positif. Quelques souches de bactéries lactiques synthétisent des bactériocines qui sont également des agents inhibiteurs très puissants dont le spectre d'activité s'étend de souches phylogénétiquement proches de la souche productrice à des espèces génétiquement plus éloignées. Pour assurer leur développement dans le lait, les lactocoques possèdent un système protéolytique capable de dégrader les caséines en acides aminés. En culture mixte dans le lait, il peut y avoir un déséquilibre au niveau des types de protéinases où les microorganismes possédant la protéinase de type P3 domine sur le type P1. Ceci résultait d'un phénomène de compétition pour les peptides relâchés par les deux types d'enzymes au niveau du système de transport des oligopeptides (Opp) ou bien d'une inhibition de la synthèse de l'enzyme P1 (Flambard *et al.*, 1997).

Lors de la fermentation du lait par une culture mixte, les phénomènes de compétition constituent la deuxième catégorie des interactions négatives fréquemment rencontrées. Certaines nappes présentes dans le lait en faible quantité et indispensables à la croissance bactérienne, peuvent être consommées préférentiellement par un groupe microbien au dépend d'un autre. C'est le cas notamment des matières azotées non protéiques (NPN de l'anglais (*Non-Protein – Nitrogen*)) regroupant l'urée, des acides aminés, de courts peptides et les bases azotées adénine, guanine, uracile et xanthine. La concentration en NPN dans le lait ne supporte la croissance que d'une faible densité cellulaire de bactéries lactiques. La croissance des souches de lactocoques qui servaient au préalable à une préculture de la souche est inférieure à celle réalisée dans du lait frais. Ce phénomène s'explique par l'épuisement de la fraction azotée de faible poids moléculaire durant la préculture (Julliard *et al.*, 1990 et 1991).

2.2.1 Composés antimicrobiens produits par les bactéries lactiques :

Pendant la fermentation lactique divers composés antimicrobiens sont élaborés par les bactéries lactiques, tels que le diacétyle, le peroxyde d'hydrogène, les acides organiques et les bactériocines (Talarico et Dobrogosez, 1989 ; Lindgren et Dobrogosez, 1990 ; Anderssen *et al*, 1998 ; Sholeva *et al*, 1998 ; Ouwehand, 1998 ; Zhennai, 2000 ; Oyetayo *et al*, 2003 ; Deegan *et al*, 2006).

Dans la biopréservation des nourritures outre les mécanismes antimicrobiens spécifiques des bactéries lactiques exploitées incluent la production des acides organiques, de l'anhydride carbonique, du diacétyle, du peroxyde d'hydrogène, des antimicrobiens à large spectre tels que la reutéline et la production de bactériocine (De Vuyst et Vandamme, 1994 ; Stiles, 1996 ; Jacobsen *et al.*, 2003 ; Vermeiren *et al.*, 2004).

La croissance des bactéries pathogènes, contaminants possibles des produits fermentés peuvent être empêché par les composés antimicrobiens produits par les bactéries lactiques (Smith et Palumbo, 1983 ; Anderson, 1986 ; Adam et Hall, 1988 ; Raccach *et al.*, 1989 ; Berry *et al.*, 1995 ; Cintas *et al.*, 1998 ; Gill et Halley, 2003 ; Guessas *et al.*, 2006).

A). Peroxyde d'hydrogène :

En général l'oxygène moléculaire (O_2) peut être transformé par les bactéries lactiques en super oxyde, en eau (H_2O_2) ou en peroxyde. Des enzymes spécifiques catalysent ces réactions généralement en présence d'un substrat à oxyder, elles ont été trouvées chez des souches de *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Pediococcus*. (Condon, 1987). En présence de l'oxygène, les bactéries lactiques produisent le peroxyde d'hydrogène sous l'action de flavoprotéine oxydase du nicotinamide adénine hydroxyperoxydase dinucléotide (NADH).

L'effet antimicrobien de H_2O_2 peut résulter de la peroxydation des lipides de membranes, qui provoque l'augmentation de la perméabilité de membrane, et l'oxydation des groupes sulfhydryliques causant la dénaturation d'un certain nombre d'enzymes (Kong et Davison, 1980). L'ADN peut être endommagé par l' H_2O_2 qui peut également agir comme précurseur pour la production de radicaux d'hydroxyle (OH) et des radicaux libres bactéricides tels que le superoxyde (O_2^-). Dans le lait cru, le système de lactoperoxydase est activé par l' H_2O_2 produisant l'ion hypothiocynate ($OSCN^-$) des oxyacides acides plus élevés ($O_2^- SCN^-$ et $O_3^- SCN^-$) et des produits intermédiaires d'oxydation qui inhibent une gamme étendue de bactéries à Gram⁺ et Gram⁻ (Reiter et Hårnulf, 1984 ; Conner, 1993).chez certains

microorganismes l'accumulation de l' H_2O_2 peut résulter d'un déséquilibre entre les moyens de synthèse et de dégradation (Condon, 1987).

Le peroxyde d'hydrogène peut aussi activer le système lactoperoxydase avec la formation de l'hypothiocynate et d'autres agents antimicrobiens (De Vuyst et Vandamme, 1994). L'ion hypothiocynate est un très puissant antimicrobien qui agit aussi bien sur les bactéries à Gram⁺ que sur les bactéries Gram⁻.

L' H_2O_2 produit par *Lactobacillus* et *Lactococcus* inhibe la croissance de divers microorganismes psychotrophes ainsi que *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas sp* (Davidson *et al*, 1983). Cette inhibition est assurée par l'effet d'oxydation fort sur des lipides de membranes et des protéines cellulaires (Morris, 1976 ; Lindgren et Dobrogosez, 1990).

Le système lactoperoxydase du lait frais peut aussi être activé par le peroxyde d'hydrogène en formant de l'hypothiocynate et d'autres agents antimicrobiens (Reiter et Hârnulv, 1984 ; Pruitt *et al.*, 1986 ; Condon, 1987).

La quantité de peroxyde d'hydrogène produite par les bactéries lactiques est strictement relative à la souche et à la disponibilité de l'oxygène (Helander *et al.*, 1997).

B). Acides organiques :

Les bactéries lactiques produisent l'acide lactique qui représente un métabolite principal causant la diminution du pH qui inhibe plusieurs microorganismes (Eklund, 1989, Magnuson et Schnûrer, 2001).

Au-dessus de la membrane des cellules la forme non dissociée et plus hydrophobe de l'acide se répond et se dissocie à l'intérieur de la cellule, libérant les ions H^+ qui acidifient le cytoplasme (Piard et Desmazeaud, 1991). En plus de l'effet du pH, l'acide non dissocié diminue le gradient électrochimique de proton, entraînant la bactériolyse et la mort des bactéries sensibles (Eklund, 1989).

L'acide acétique est produit en plus par les bactéries hétérofermentaires. Ce dernier possède un pka élevé que celui de l'acide lactique. A un certain pH équivalent à celui de l'acide lactique et ont donc une proportion accrue d'acide non dissocié.

Sur les membranes de cellules, les acides acétiques et propioniques interagissent et neutralisent le gradient électrochimique de proton, mais leur effet est extrêmement relatif à la diminution du pH provoquée par l'acide acétique (Eklund, 1989).

A un pH inférieur à 4,5, l'acide propionique diminue la croissance fongique, et affecte les membranes fongiques. L'assimilation des acides aminés est aussi empêchée par l'acide propionique et acétique (Freese *et al.*, 1973 ; Eklund, 1989).

Il peut y avoir des effets antifongiques synergiques résultant de la production de l'acide lactique pendant la croissance des bactéries lactiques et l'acétate contenu dans le MRS (De Man *et al.*, 1960) (Cabo *et al.*, 2002). Les effets inhibiteurs des acides organiques tels que l'acide acétique, lactique et propionique continueront à compliquer des études sur des effets antimicrobiens des bactéries lactiques, à moins que d'autres purifications et caractérisations rigoureuses des substances soient appliquées (Magnusson et Schûrer, 2001 ; Magnusson *et al.*, 2003).

L'accumulation d'acides organiques en plus d'une réduction du pH sont les caractéristiques de la fermentation par les bactéries lactiques (Gould, 1991 ; Podolak *et al.*, 1996).

Selon l'espèce, et la composition du milieu et des conditions de croissance les niveaux et les types d'acides organiques sont produits pendant les fermentations (Lindgren et Dobrogosez, 1990).

Le pH bas externe cause l'acidification du cytoplasme des cellules, alors que l'acide non dissocié agit en effondrant le gradient électrochimique de proton ou en changeant la perméabilité de la membrane des cellules (Smulders *et al.*, 1986, Earnskaur, 1992).

L'effet inhibiteur spécifique des acides organiques est généralement attribué à leur forme dissociée et non dissociée. Cette forme pénètre librement dans la cellule où elle s'ionise ce qui provoque un abaissement du pH interne et le blocage de certains mécanismes de transport (Parente *et al.*, 1994). Dans le cas de l'acide lactique, pour provoquer une inhibition, la concentration en acide non dissocié est de 1 Mm pour les levures, les entrobactériaceae et les micrococceae, et de 3 Mm pour les moisissures et de 4 Mm pour les Bacillaceae. (Baird- Parker, 1980 ; Adams et Hall, 1988). Dans la fermentation des bactéries lactiques, le métabolite principal est l'acide lactique ou il est en équilibre avec ses formes dissociées et non dissociées, la dissociation dépend du pH, la forme non dissociée est toxique à plusieurs bactéries, champignons et levures et la majorité d'acide lactique est sous cette forme (Podolak *et al.*, 1996).

Le comportement de différents microorganismes varie vis-à-vis l'acide lactique à pH 5, l'acide lactique n'a pas un effet inhibiteur contre les levures et les champignons, mais contre les bactéries sporulées a cet effet, l'inhibition interfère l'entretien du potentiel de

membrane et empêche le transport actif et résulte de l'action des acides sur les membranes cytoplasmique bactérienne, et peut être négocié par l'acide dissocié et non dissocié (Cherrington *et al.*, 1991).

Dans l'activité antimicrobienne, les stéréos – isomères de l'acide lactique diffèrent, l'isomère s'étant moins inhibiteur que l'acide lactique L.

Les bactéries hétérofermentaires produisent d'autres quantités d'acide organique que l'acide lactique, les lactobacilles et les leuconostocs hétérofermentaires produisent moins de lactate que d'acétate (Kandler, 1983).

Pour de nombreux microorganismes, l'acide acétique est fortement inhibiteur et il pourrait y'avoir un léger effet de synergie en présence simultanée d'acide lactique.

L'acide acétique et l'acide lactique agissent en synergie, l'acide lactique diminue le pH du milieu, de ce fait la toxicité des bactéries pathogènes et nocives ne donne pas de croissance dans un environnement acide.

Dans les produits fermentés, la baisse du pH dépend de la concentration en substrat fermentescible, et le pH minimum de croissance peut varier d'une bactérie à une autre ; elle est limitée par le pouvoir tampon du milieu et par le pH minimum toléré pour les ferments dans certains des produits, le pH atteint 4 comme dans le yaourt et le saucisson sec, le pH = 4,5 à 5,3 et certains contaminants sont éliminés (Huang *et al.*, 1986).

Les bactéries lactiques produisent les acides acétiques et propioniques par les voies hétérofermentaire et peuvent causer l'acidification intracellulaire et la dénaturation des protéines en agissant sur les membranes.

Leurs valeurs en pKa sont plus élevées que celle de l'acide lactique (acide lactique 3.08 acide acétique 4.75 et acide propionique 4.87) donc ils ont un effet antimicrobien plus fort, et un pourcentage plus élevé d'acides non dissociés à un pH donnée (Earnshaur, 1992).

Envers *listeria monocytogenes*, l'acide acétique est plus inhibiteur que l'acide citrique et l'acide lactique (Richard *et al.*, 1995), et aussi envers la croissance et la germination de *Bacillus cereus* (Chan *et al.*, 1988).

C). Acides gras :

Quelques lactobacilles et lactocoques possèdent des activités lipolytiques et sont capables de produire des quantités significatives d'acides gras, dans certaines conditions par exemple dans la fermentation du lait fermenté (Rao *et al.*, 1984) et des saucisses sèches (Sanz *et al.*, 1988).

Pendant plusieurs années, l'activité antifongique des acides gras dépend du pH, la composition et la concentration du milieu (Gould, 1991).

L'activité antimicrobienne des acides gras a été identifiée et les acides gras insaturés présentent une activité contre les bactéries à gram +.

D). Le dioxyde de carbone (CO₂) :

Les bactéries lactique hétérofermentaire produisent le CO₂ et jusqu'à nos jours, le mécanisme précis de son action antimicrobienne est inconnu. Selon les espèces le degré d'inhibition par le CO₂ varie, pour diminuer la population bactérienne de 50%, il faut qu'un taux de CO₂ de 10% (Wagner et Moberg, 1989) et entre 20 et 50% il a une forte activité antifongique (Lindgren et Dobrogosez, 1990).

E). Composants aromatiques :

Les composés d'arômes qui participent aux qualités organoleptiques des fromages sont produit par certaines bactéries lactiques, la plupart des composés d'arômes sont issus du métabolisme du citrate, tandis que l'acétoïne et le diacétyl sont les plus importants.

-Le diacétyl :

Il dérive de la fermentation du citrate par des souches de *Lc. lactis* subsp *lactis* biovar. *diacetylactis* (Lindgren et Dobrogosz, 1990 ; Cogan et Hille, 1990). Il est responsable de l'arôme et de la saveur du beurre et de quelque autres produit laitiers fermentés les niveaux sensoriels acceptables du diacétyl sont de 2 à 7 ug / ml (Earchaux, 1992). Beaucoup de bactéries lactiques peuvent produire le diacétyl par la fermentation de hexoses, son utilisation pratique en tant que conservateur est limitée.

Cependant, le diacétyl peut agir synergiquement avec d'autres facteurs antimicrobiens (Jay, 1992) et contribué aux systèmes combinés de conservation en nourritures fermentées.

Les bactéries à gram – sont plus sensibles au diacétyl que les bactéries à gram + ; 200 µg / ml et 300 µg / ml respectivement (Jay, 1982), la croissance des souches de *Listeria*, *Salmonella*, *Yersinia* et *Escherichia coli* est empêchée à une concentration de 344 µg/ml depuis les années 30, l'effet antimicrobien du diacétyl a été connu, il empêche la croissance des bactéries à gram – en affectant l'utilisation de l'arginine (Jay, 1986).

Bien que les bactéries lactiques soient généralement résistantes, le diacétyl a été démontré pour être un composé antimicrobien efficace contre un éventail de bactéries gram

négative et gram positif, les quantités de diacétyl produites par *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* varient de 0.07 à 3.72 ppm (Burrow *et al.*, 1970).

-Acétaldéhyde :

L'action d'une thréonine aldolase, clive la thréonine en acétaldéhyde et en glycine, et cette action se produit chez *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, pour empêcher la croissance de *Salmonella typhimurium*, de *Staphylococcus aureus*, et d'*Escherichia coli* dans les produits laitiers et il faut une concentration variant entre 10 à 100 ppm de l'acétaldéhyde (Piard et Desmazeaud, 1991).

Les lactocoques produisent entre 2.60 et 6.50 mg /ml de quantités d'acétaldéhyde (Bottazzi et Dellaglio, 1967).

La contribution de l'acétaldéhyde à la biopréservation est mineure puisque le seuil de saveur est beaucoup inférieur aux niveaux qui sont considérés nécessaires à l'inhibition des microorganismes (Kulshrestha et Marth, 1974).

-La reutéline :

Lactobacillus reuteri est une espèce hétérofermentaire qui vit dans l'appareil gastro – intestinal des humains et des animaux, cette espèce synthétise la reutéline (Axelsson *et al.*, 1989). Pendant la croissance anaérobie de *Lb. reuteri*, la reutéline est formée par l'action du glycérol déshydratase, qui catalyse la conversion du glycérol en reutéline (Talarico *et al.*, 1988). En présence du glucose et du glycérol ou du glyceraldéhyde, la reutéline est produite pendant la phase stationnaire de *Lactobacillus reuteri*. Elle a été chimiquement identifiée pour être le 3- hydroxypropanal (x- hydroxypropionaldéhyde), un composé fortement soluble à pH neutre qui est en équilibre avec ses formes dimères monomériques et cycliques hydratées (Axelsson *et al.*, 1989 ; Talarico et Dobrogosz, 1989).

Son spectre d'activité antimicrobienne contre certaines bactéries à gram + et gram – est très large. Les microorganismes de détérioration comprenant *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Listeria*, *Candida* et *Tripanosma* sont sensibles à la reutéline. (Axelsson *et al.*, 1989).

IV. CARACTERE PROBIOTIQUE :

IV.1 Introduction :

Probiotique, ce terme définit des microorganismes ingérés vivants capables d'exercer des effets bénéfiques sur la santé lorsqu'ils sont consommés en quantités adéquates (FAO « Food and Agriculture Organization » & OMS « Organisation Mondiale de la santé »). Comme l'équilibre ou le bon fonctionnement de la flore intestinale, la régulation du système immunitaire intestinale, ou le renforcement de la barrière intestinale sont revendiqués pour chacun de ces produits.

Le concept des probiotiques provient d'un chercheur et prix Nobel Russe, Elie Metchnikoff, qui avait pour théorie que la longévité des paysans bulgares était directement liée à leur consommation de laits fermentés. Différentes études ont montré depuis l'effet bénéfique des probiotiques et leur innocuité liée aux caractères non pathogènes de souches utilisées, et se multipliant dans l'intestin, ces bactéries permettent de réduire par simple compétition la population bactérienne potentiellement pathogène. Les probiotiques sont principalement des bactéries et des levures et les probiotiques utilisés sont des souches micro-organismes vivantes, productrices d'acides lactiques tels que les lactobacilles, certains streptocoques et les bifidobactéries, notamment *Bifidobacterium bifidum* (Fuller, 1989). Et on les trouve dans les yaourts, les laits fermentés, les fromages et les boissons (Bouziane *et al.*, 2004).

Plusieurs études ont montré de façon répétitive l'efficacité des probiotiques à soulager les symptômes liés au syndrome du côlon irritable, une réduction des ballonnements et des flatulences a été observée d'une étude à l'autre (Isaacs et Herfarth, 2008).

Bien qu'ils puissent accélérer le transit intestinale, les probiotiques sont aussi reconnus comme agents prévenifs de la diarrhée infectieuse, autant chez les enfants que chez les adultes (Pedone *et al.*, 2000).

Les probiotiques ont une meilleure tolérance au lactose, la diminution de la formation de composés carcinogènes et une amélioration du traitement des maladies inflammatoires de l'intestin.

IV.2 Généralités sur deux souches pathogènes :

2.1 *Staphylococcus aureus* :

Les staphylocoques appartiennent à la famille des Micrococcaceae et sont des bactéries à gram positif et catalase positif, de forme cocci de 0.8 à 1 µm de diamètre, ils sont

immobiles, asporulés et sans capsule, regroupés en diplocoques ou en amas (grappe de raisin). (Larpent, 2000).

Les bactéries ont un métabolisme respiratoire et fermentaire et sont aéro–anaérobies, ils se cultivent facilement en 24 heures sur milieux ordinaires, les colonies de *Staphylococcus aureus* sont lisses, de 1 à 4 mm de diamètre et de nombreuses souches produisent un pigment jaune doré ou jaune citron.

Sur gélose au sang, sont hémolytiques et *Staphylococcus aureus* est capable de produire des enzymes extracellulaires, et d'après des caractères enzymatiques lysotypiques et métaboliques, cette espèce est séparée en quatre biotypes (Berche, 1989).

Ce germe est responsable de 10% des toxi–infections alimentaires, la maladie est causée par l'ingestion d'une toxine produite et non par la bactérie elle-même. Dans la majorité des cas, les symptômes sont violentes (maux de tête, vomissements, fortes douleurs abdominales) mais disparaissent complètement dans les deux jours, la mortalité est fort heureusement très rare.

On trouve les staphylocoques naturellement au niveau de la peau et des muqueuses (nez et gorge), lors des coupures, d'inflammation cutanée (abcès,...) ou de maladie (rhinites, angines), ils se développent et provoquent une infection. Ils peuvent donc facilement contaminer les aliments par manipulation ou par émission (éternuement, mouchage), ce portage intestinal est fréquent chez l'Homme, comme chez les animaux.

Dans les produits fermentés, pour inhiber la croissance de *Staphylococcus aureus* est d'ajouter des bactéries lactiques qui vont produire de l'acide lactique et acétique ainsi de bactériocines, et ces derniers sont les responsables majeurs de l'inhibition de *Staphylococcus aureus*, par contre le pH bas en produit fermenté n'est pas responsable de l'inhibition de ce germe, comme le yaourt (Ananou et al, 2005).

2.2 *Escherichia coli* :

Le genre *Escherichia* fait partie de la famille des entérobactéries et comprend cinq espèces dont une seule, *Escherichia coli* est utilisée à titre d'indicateur de la qualité des eaux. *Escherichia coli* est un bacille gram négatif, radiorésistant et constitue tout au long de la vie de l'homme l'espèce bactérienne dominante de la flore aérobie intestinale, et fermente le glucose par la voie des acides mixtes.

Et la presque totalité des souches d'*Escherichia coli* ne sont pas pathogènes puisque cette bactérie est un hôte normal de l'intestin des mammifères (Rice, 1999), de plus fermentation du lactose, du mannitol, production d'indole à partir du tryptophane, ne

possède pas d'uréase, ne produit pas d'H₂S, il est possible de procéder à l'identification d'*Escherichia coli* en repiquant les colonies issues des testes de détection des coliformes fécaux, en procédant directement en utilisant l'échantillon d'eau à tester sans passer par l'étape de recherche des coliformes totaux (CT) ou des coliformes fécaux (CF). (Eckner, 1998).

Le milieu utilisé est habituellement un bouillon de culture qui contient un premier substrat chromogénique scindé par l'enzyme B-galactosidase que possèdent tous les coliformes, et un deuxième scindé par l'enzyme B-glucuronidase spécifique à *Escherichia coli*. (Bitton, 1999, Clesceri *et al.*, 1998, Edberg *et al.*, 2000).

Après 24 heures d'incubation à 35°C, la présence d'une fluorescence bleue, visible seulement sous un éclairage par rayonnement ultraviolet, indique la présence d'*Escherichia coli* (Clesceri *et al.*, 1998 ; CEAEQ, 2000 a 2000 b).

L'utilisation d'un bouillon avec substrats chromogénique ne permet cependant pas d'énumérer les bactéries car c'est un test qualitatif de type présence – absence, il existe des variantes de la méthode permettant une énumération (US EPA, 2000). Comme, par exemple la technique NPP (nombre le plus probable).

Ces méthodes ne permettent pas d'identifier l'appartenance à un groupe ou un sérotype particulier d'*Escherichia coli*, recherche qui nécessite une procédure plus complexe impliquant notamment l'emploi de tests sérologiques et l'utilisation de la réaction en chaîne de la polymérase (Bopp *et al.*, 1999 ; Chalmers *et al.*, 2000).

L'espèce *Escherichia coli* est subdivisée en de nombreuses souches pathogènes pour l'Homme et les animaux sur base de la possession de propriétés ou de la production de facteurs spécifiques qui sont responsables de leurs pouvoirs pathogènes.

Certaines souches spécialisées d'*Escherichia coli* sont associées à des pathologies très diverses tant chez l'être humain que chez l'animal ; diarrhées, gastro-entérites, infections urinaires, méningites, sépticémie, etc..., les techniques modernes de la biochimie, de la génétique, de la biologie moléculaire et de la microbiologie cellulaire ont permis d'identifier et d'analyser les mécanismes impliqués de l'interaction des *Escherichia coli* pathogènes avec leur hôte. Malgré la diversité des affections provoquées par les souches d'*Escherichia coli* pathogènes, toutes ces souches utilisent une stratégie classique d'infection, commune à de nombreux autres agents pathogènes, comme la plupart des pathogènes des muqueuses, les souches d'*Escherichia coli* responsable de diarrhée et d'infections extra-intestinales utilisent une stratégie d'infection dont les points clés sont les suivantes : colonisation des muqueuses,

éventuellement invasion des cellules, multiplication, évasion des défences de l'hôte dommages à l'hôte. (Slutsker *et al.*, 1998).

IV.3 Propriétés inhibitrices des bactéries lactiques :

3.1 Preformances dans le domaine thérapeutique :

3.1.1 Critères de sélection des souches probiotiques :

Les bactéries probiotiques doivent :

- Rester vivantes pendant leur conservation et pendant leur passage à travers la partie supérieure du tube digestif, et donc résister aux différents mécanismes de défense dans l'hôte. (Chafai, 2006).

- Etre non pathogène et non toxique, exercer un effet bénéfique sur l'hôte est un effet métabolique pendant le transit intestinale.

- Avoir une capacité de coloniser transitoirement la muqueuse intestinale, et une ressemblance avec des bactéries de la microflore intestinale humaine.

- Rester viables pendant le stockage et l'utilisation.

- Résister aux enzymes présentes dans la cavité buccale, au pH acide de l'estomac et avoir un taux de survie élevé après ces passages, aux ferments lactiques, aux sucs pancréatiques et aux concentrations de mucus et de bile présentes dans l'intestin grêle (Malinen, 2002). L'activité antimicrobienne des lactobacilles se fait par la production d'acides organiques à partir des glucides de la ration alimentaire tels que l'acide lactique en abaissant le pH, le développement *Escherichia coli* et *Salmonella*. (El – Nagger, 2004).

L'inhibition du développement des germes indésirables peut se faire :

- Soit par la production de substances antimicrobiennes naturelles appelées bactériocines, de peroxyde d'hydrogène et d'acides organiques (Lima *et al.*, 2005).

- Soit en adhérant temporairement à la paroi intestinale et en renforçant la barrière physique contre les pathogènes, elles entrent en compétition avec eux pour le site d'adhésion à la paroi intestinale et pour les nutriments qui s'y trouvent. (Chafai, 2006).

3.1.2 Mécanismes d'actions des probiotiques :

A). Action contre l'invasion des pathogènes :

Les pathogènes sont des microorganismes capables de causer une maladie. De nos jours, la présence de pathogènes dans l'eau, la nourriture et les établissements publics peuvent devenir une menace pour notre santé.

De plus, la prise de médicaments comme les antibiotiques et les antiacides peuvent détruire la flore intestinale, causer des diarrhées et augmenter le risque d'infection. Les bonnes bactéries qui composent la flore intestinale assurent la première ligne de défense contre les pathogènes, elles rentrent en compétition avec eux pour le site d'adhésion à la paroi intestinale et pour les nutriments qui s'y trouvent elles produisent également des substances antimicrobiennes naturelles appelées bactériocines, ces deux modes d'action défensifs nuisent à l'implantation, la croissance et la survie des pathogènes. (Callaway *et al.*, 2005).

La production d'acides organiques, de peroxyde d'hydrogène et de diacétyl par les bactéries lactiques, notamment *Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus casei*, inhibe l'action des pathogènes. La production d'acides lactiques et acétiques est propre aux bactéries lactiques, les acides organiques régularisent le pH intestinal pour le maintenir à un niveau non favorable à la croissance d'agents infectieux. (Grajek *et al.*, 2005).

Certaines souches utilisées comme probiotiques possèdent la capacité de déconjuguer les sels biliaires : les formes déconjuguées ont un pouvoir inhibiteur plus important sur le développement de bactéries que les formes conjuguées (Marteau, 2001).

B). Amélioration de la digestibilité de la ration alimentaire :

La production d'enzymes par les souches probiotiques favorise la digestion des glucides et des protéines, les lactobacilles excrètent la B-galactosidase qui facilite la digestion du lactose. (Lee *et al.*, 2006).

L'assimilation des acides aminés essentiels par l'hôte est améliorée par les souches probiotiques soit en les synthétisant, soit en inhibant l'action des désaminases et des décarboxylases bactériennes excrétées par la microflore du tube digestif. (Chafai, 2006).

C). Système immunitaire intestinale :

L'intestin est très riche en lymphocytes que l'on retrouve sous la muqueuse intestinale. En raison de son contact direct avec des envahisseurs extérieurs susceptibles d'induire des infections, l'intestin doit être en mesure de défendre l'organisme adéquatement.

Il tient une place prépondérante dans l'immunité de l'individu, la flore bactérienne normale d'un individu est également impliquée dans les réponses immunitaires par l'intermédiaire des cellules épithéliales de l'intestin composant la muqueuse. (Mowat, 2003).

D). Probiotiques et système immunitaire :

La consommation de bactéries bienfaisantes comme les *Lb. acidophilus* et *Lb. casei* renforce l'immunité au niveau des muqueuses intestinales (immunité mucosale) de même que l'immunité à travers l'organisme (immunité systémique), de façon plus détaillée la consommation chez l'humain de *Lactobacillus* stimule l'activité phagocytaire et augmente la production de lymphocytes T et B et la production d'anticorps, notamment les IgM , IgA et IgG, toutefois, la stimulation de ces réponses immunitaires intestinales par les bactéries commensales (propres à l'Homme) ou probiotique ne provoque pas d'emblée une réponse inflammatoire importante, comme on peut l'observer en présence d'un agent infectieux un individu peut donc consommer régulièrement en toute sécurité ces bactéries à caractère probiotique. (Luquet *et al.*, 2005).

E). Action sur le système digestif :**-Système digestif :**

Les aliments doivent être décomposés en nutriments pour être assimilés par l'organisme. Ce processus s'appelle la digestion, les nutriments comme les sels minéraux (fer, calcium, etc.), les vitamines, les acides gras et les fibres sont essentiels pour répondre aux besoins vitaux d'un des troubles digestifs variés et plus ou moins sévères peuvent également découler de la présence de matières non digérées dans l'intestin, les bonnes bactéries qui colonisent nos intestins participent activement à la digestion. Elles produisent les aliments de façon à ce qu'ils puissent être absorbés et agir sur l'ensemble du corps. La flore intestinale joue donc un rôle très important dans la digestion et la santé de l'individu. (Penna *et al.*, 2000).

-Probiotique et système digestif :

Les *Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus casei* comptent parmi les bonnes bactéries qui composent la flore intestinale, ces bactéries améliorent la digestion des aliments et la capacité d'absorption de l'organisme. La consommation de probiotiques aide à maintenir l'équilibre de la flore intestinale, ils fournissent ainsi à l'organisme une quantité importante de bonnes bactéries et facilitent, entre autres, la digestion des aliments et l'assimilation des nutriments tout en améliorant la santé du système digestif. (Penna *et al.*, 2000).

F). Autres applications thérapeutiques des probiotiques :**-Cholestérol :**

Certaines études ont démontré que les probiotiques pouvaient aider à diminuer le taux de mauvais cholestérol (LDL), leur mécanisme d'action n'a pas encore été bien élucidé. Toutefois, les bactéries probiotiques pourraient être impliquées dans la déconjugaison de la bile limitant ainsi la réabsorption du cholestérol (le cholestérol est un composant majeur de la bile). (Werber, 2004).

-Candida albicans et infections vaginales :

Un déséquilibre de la flore intestinale peut avoir des répercussions sur l'ensemble de l'organisme, notamment le système vaginal, et entraîner une surcroissance de pathogènes se traduisant en infections vaginales bactériennes ou à levures, comme le *Candida albicans*.

Les *Lactobacillus acidophilus* sont des bactéries les plus importantes de la flore vaginale et intestinale, cette bonne bactérie crée un environnement hostile à la croissance de pathogènes en maintenant un pH faible dans la flore et en produisant des bactériocines, de plus les *Lb. acidophilus* produisent du peroxyde d'hydrogène et de l'hypothiocyanate qui inhibent la croissance du *Candida albicans*. (Fitzsimmons, 1994).

-Cancer :

Plusieurs chercheurs se sont penchés sur la question du rôle possible des probiotiques dans le traitement ou la prévention du cancer. D'après certaines recherches les probiotiques, pourraient avoir un rôle protecteur dans le développement de certains cancers, notamment le cancer du côlon, en inhibant dans le corps la production de mutagènes et d'agents carcinogènes. (Sanders, 2000).

IV. 4 Activités antimicrobienne due à des bactériocines :**4.1 Définition des bactériocines :**

Différentes définitions des bactériocines ont été données au cours du temps. Cependant, la définition qui reste la plus largement acceptée est celle de Klaenhamme (1988) qui définit les bactériocines comme des protéines, ou complexes de protéines, avec une activité bactéricide contre des espèces proches de la souche productrice. Les bactériocines représentent une large classe de substances antagonistes qui varient considérablement du point de vue, de leur spectre d'action et de leur mode d'action (Klaenhammer, 1988). Toutes les bactériocines produites par des bactéries lactiques décrites jusqu'à présent ont une activité dirigée contre les bactéries Gram+, aucune bactériocine produite par des bactéries lactiques

avec une activité contre des bactéries Gram- n'a été décrite, la membrane externe des bactéries Gram- ne permettant pas aux bactériocines d'atteindre la membrane interne, siège de leur activité (Klaenhammer, 1988).

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont des peptides antimicrobiens de faible poids moléculaire inhibant la croissance des bactéries pathogènes, les souches les produisant peuvent donc également être utilisées dans des produits nom fermentés en tant que culture protectrice, une culture protectrice est une culture antagoniste ajoutée à un produit alimentaire pour inhiber les bactéries pathogènes et ainsi prolonger sa durée de vie en changeant ses propriétés organoleptiques le moins possible. (Rodgers, 2001 ; Vermeiren *et al.*, 2004).

4.2 Classification des bactériocines :

Pour classer une substance sous le terme de bactériocine, on utilise plusieurs critères : (Klaenhammer 1993) :

- Présence d'une partie biologiquement active de nature protidique.
- Spectre d'activité étroit.
- Présence sur ces cellules cibles des récepteurs spécifiques à la bactériocine.
- Mode d'action antibactérien sans lyse des cellules cibles.

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont réparties en quatre classes, comme proposé par Klaenhammer (1993), ces quatres classes sont :

A). Classe I : les lantibiotiques :

Peptides de taille inférieur à 5 k Da, stable à la chaleur et qui contiennent des acides aminés inhabituels soufrés formés post- traductionnellement, c'est-à-dire la lanthionine, la B-méthyl lanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine.

Ils sont synthétisés par plusieurs genres bactériennes Gram positif et ils sont thermorésistants. Selon la structure et le mode d'action des lantibiotiques peuvent être divisés en deux types :

-Lantibiotiques de type A :

Se sont des peptides cationiques, hydrophobes allongés dont l'action est de dépolariser la membrane cytoplasmique bactérienne, et ce type contient 34 acides aminés, on trouve la nisine, subtiline, épide mine, lactocine 481, épiliacine k7 et lactococcine S. (Sahl *et al.*, 1991 et 1995).

-Lantibiotique de type B :

Comprend les peptides globulaires chargés négativement ou sans charge nette, montrant une activité inhibitrice d'enzymes spécifiques, dans ce type on trouve les cinamycines, mersacidine, actagardine et contient jusqu'à 19 acides aminés (Mc Auliffe *et al.*, 2001 ; Twomey *et al.*, 2002). Certains lantibiotiques sont par ailleurs constitués de deux peptides agissant ensemble pour avoir une activité comme la lacticin 3147.

B). Classe II : les non lantibiotiques :

Peptides de taille inférieure à 10 KDa, stables à la chaleur, ne contenant pas d'acides aminés modifiés, hydrophobes, les plus connus sont la pédiocine PA-1 et AH, la lactococcine A et B et la lacticine F. (Mathot *et al.*, 1996).

Cette classe est divisée en 3 sous classes :

- La sous classe IIa :

Les bactériocines de cette sous classe, contiennent entre 27 et 48 acides aminés et ont toutes une partie N- terminale hydrophobe contenant un pont disulfure et une partie C- terminale moins conservée, hydrophobe ou amphiphile qui détermine la spécificité d'action.

Elles ont toutes une activité contre *Listeria monocytogenes*, certaines bactériocines de cette sous classe contiennent également un deuxième pont disulfure dans leur domaine C-terminale qui semble être important dans la stabilisation de la structure tertiaire, il semble par ailleurs qu'il leur conférerait une meilleure activité antimicrobienne, une meilleure résistance à l'exposition à des hautes températures et un spectre d'action plus large. (Drider *et al.*, 2006).

-La sous classe IIb :

Comprend les bactériocines ayant besoin de deux peptides pour avoir une activité, deux types de bactériocines de classe IIb peuvent être distingués : le type E (Enhancing) où la fonction d'un des deux peptides est d'augmenter l'activité de l'autre et le type S (Synergy) où les deux peptides sont complémentaires (Klaenhammer, 1993).

- La sous classe IIc :

Contient les bactériocines ne pouvant pas être classées dans les autres sous classes et qui contiennent du groupement thiol actif correspondant à des résidus cystéines (Klaenhammer, 1993).

C). Classe III :

Protéines de taille supérieures à 30Da et sensible à la chaleur. La structure et le mode d'action de ces bactériocines diffèrent complètement des autres bactériocines produits par les bactéries lactiques, cette classe ne contient que quatre bactériocines : l'helveticin J produite par *Lactobacillus helveticus*, l'enterolysin A produite par *Enterococcus faecium*, la zoocin A produite par *Streptococcus zooepidemicus* et la millericin B produite par *Streptococcus milleri*. (Nilsen *et al.*, 2003 ; Papagianni 2003).

D). Classe IV :

Peptides requérant une partie carbohydratée ou lipidique pour avoir une activité, se sont des bactériocines inactivées à la fois par les protéases et par d'autres types d'enzymes, ce qui suppose l'existence d'une partie non protéique active dans les phénomènes d'inhibitions (Klaenhammer, 1993).

4.3 Les mécanismes d'action des bactériocines :

Le siège d'activité des bactériocines est la membrane cellulaire, raison pour laquelle les bactériocines n'ont pas d'activité contre les bactéries Gram-, cependant, les mécanismes d'action des bactériocines sur la membrane sont variés.

A). Les lantibiotiques :

Les lantibiotiques interagissent avec la membrane cellulaire par des interactions électrostatiques ou par liaison à des récepteurs spécifiques tels que le lipide II (undecaprenyl – pyrophosphoryl- MurNac- pentapeptides- GlcNAc), un précurseur de peptidoglycanes, suite à cette liaison, les lantibiotiques peuvent former des pores larges et non spécifiques dans la membrane cytoplasmique, ce qui va causer l'efflux rapide des petits composés cytoplasmiques tels que les ions, les acides aminés, L'ATP, etc, cette augmentation de la perméabilité membranaire va conduire à la dissipation des deux composantes de la force proton motrice, à la cessation rapide des activités cellulaires et à la mort de la cellule, l'interaction avec le lipide II permet d'augmenter la stabilité des pores formés et de réduire la

concentration du lantibiotique nécessaire à la formation des pores, mais peut également conduire à l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire (Mc Auliffe *et al.*, 2001 ; Twomey *et al.*, 2002 ; Bauer *et al.*, 2005 ; Patton *et al.*, 2005).

B). Les bactériocines de classe II :

Le mécanisme d'action supposé des bactériocines de classe IIa est l'interaction de la bactériocine avec la membrane ou un récepteur spécifique, la « mannose perméase », pour ensuite former un pore dans la membrane de la cellule, ce qui induit la perméabilisation de la membrane, la dissipation des deux composantes de la force proton motrice et la mort de la cellule (Dalet *et al.*, 2000 ; Héchard *et al.*, 2001 ; Gravesen *et al.*, 2002 ; Arous *et al.*, 2004 ; Vadyvaloo *et al.*, 2004 ; Bauer *et al.*, 2005). Le mécanisme de formation des pores n'est pas connu, même si l'hypothèse la plus courante est l'association de différentes molécules de la bactériocine. (Ennahar *et al.*, 2000 ; Fimland *et al.*, 2000 ; Diep *et al.*, 2007).

Les bactériocines de classe IIb ont en général un spectre d'action inhibant une large gamme de bactéries Gram⁺. Elles forment des pores et rendent la membrane perméable à différentes petites molécules, des cations monovalents ou des anions, ce qui dissipe une ou les deux composantes de la force proton motrice. Les ions transportés sont spécifiques de la bactériocine. Néanmoins, les mécanismes d'interaction des deux bactériocines entre elles et avec la membrane cellulaire ne sont que très peu connus. Il a été montré qu'il n'y avait pas de liaison au même récepteur que pour les bactériocines de classe IIa (la « mannose perméase ») (Diep *et al.*, 2007).

C). Les bactériocines de classe III :

Le mode d'action de ces bactériocines diffère complètement des bactériocines des autres classes. En effet, l'enterolysin A, la zoocin A et la millericin B agissent par l'hydrolyse des liens peptidiques des peptidoglycanes des cellules sensibles. La zoocin A a un spectre d'action étroit alors que l'enterolysin A et la millericin B ont un spectre d'action large. L'helveticin J a un mode d'action bactéricide (Nilsen *et al.*, 2003).

IV.5 La production et le conditionnement des bactériocines :

5.1 La production des bactériocines :

Les bactériocines sont généralement produites à la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire de croissance. Elles peuvent ensuite être dégradées par les

protéases produites par la bactérie lactique productrice (Savijoki *et al.*, 2006) ou être adsorbées à sa surface, ce qui mène à la baisse de la concentration de bactériocines dans la culture. Les facteurs influençant la production de bactériocines sont principalement la souche productrice, la température, le pH, la composition du milieu et la technologie de fermentation employée.

Pour la production de sakacin P par *L. sakei*, une même bactériocine peut être produite par des souches ou espèces différentes dont la capacité de production peut être variable. Lors d'une optimisation de production, si différentes souches sont disponibles, le choix de la souche pourra être déterminant. (Moretro *et al.*, 2000).

Les conditions de culture influencent fortement la production de bactériocines. En effet, l'optimisation de la croissance ne résulte pas nécessairement en l'optimisation de la production de bactériocines (Parente *et al.*, 1999). Il a même été suggéré que des conditions de croissance défavorables permettent de stimuler leur production (Verluyten *et al.*, 2004). Les températures et pH optimaux de production sont souvent inférieurs à ceux optimaux pour la croissance. C'est par exemple le cas pour la production de bactériocine par *L. curvatus* LTH1174 (Messens *et al.*, 2003), *Leuconostoc mesenteroides* L124 et *L. curvatus* L442 (Mataragas *et al.*, 2003), de sakacin P par *L. sakei* CCUG42687 (Moretro *et al.*, 2000), d'amylovorin L471 par *L. amylovorus* DCE471 (De Vuyst *et al.*, 1996) et de pediocin PA-1 par *Pediococcus damnosus* (Nel *et al.*, 2001).

La composition du milieu, tout particulièrement les sources et concentrations de carbone et azote, affectent fortement la production de bactériocines. Les bactéries lactiques productrices requièrent de nombreux nutriments pour leur croissance et des milieux riches contenant de l'extrait de viande, de levure et des hydrolysats de protéines sont nécessaires. Il a déjà été montré que l'augmentation des concentrations en extrait de levure, extrait de viande ou peptone peut permettre une augmentation de la production de bactériocines (Aasen *et al.*, 2000 ; Nel *et al.*, 2001 ; Mataragas *et al.*, 2003 ; Todorov *et al.*, 2004 ; Verluyten *et al.*, 2004). D'autre part, quelques études ont montré que la source de carbone utilisée et sa concentration est un facteur important dans l'optimisation de la production de bactériocines (Leal-Sanchez *et al.*, 2002 ; Leroy *et al.*, 2006 ; Chen *et al.*, 2007 ; Anastasiadou *et al.*, 2008). L'ajout de ces nutriments lors d'une culture *fed-batch* permet souvent d'augmenter la production comparativement à une culture en *batch* (Callewaert *et al.*, 2000 ; Lv *et al.*, 2005 ; Pérez Guerra *et al.*, 2005).

L'utilisation de la technique des cellules immobilisées peut permettre d'augmenter la durée et la stabilité de la production de bactériocines. Les cellules peuvent être immobilisées dans des biofilms ou des billes d'alginate de calcium. Cette technique a déjà été utilisée avec succès pour la lacticine 3147 et la nisine (Scannell *et al.*, 1997 ; Pongtharangkul *et al.*, 2006).

5.2 Le conditionnement des bactériocines :

Il est très difficile de conditionner les bactériocines sous une forme purifiée. La purification des bactériocines est une procédure longue et coûteuse qui nécessite la mise en œuvre de nombreuses techniques, à savoir une précipitation des protéines au sulfate d'ammonium, différentes combinaisons de chromatographies sur colonne telles que des échanges d'ions ou des interactions hydrophobes et une étape finale de chromatographie liquide à haute performance en phase inverse. Ces traitements ne sont pas applicables à l'échelle industrielle. La stratégie souvent mise en œuvre consiste dès lors en l'adsorption de la bactériocine sur la cellule productrice suivie d'une centrifugation ou d'une ultrafiltration de la culture et de la désorption de la bactériocine par abaissement du pH à 2 et augmentation de la concentration en chlorure de sodium. Les bactériocines semi-purifiées peuvent alors être conditionnées sous forme sèche par atomisation ou lyophilisation par exemple (Parente *et al.*, 1999). La nisine, la seule bactériocine légalement approuvée comme additif alimentaire, est commercialisée sous une forme semi-purifiée.

IV.6 Les applications des bactériocines dans l'industrie alimentaire :

6.1 Les propriétés des bactériocines pour une application alimentaire :

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

6.2 L'application de la bactériocine :

Les bactériocines purifiées ou semi-purifiées sont appliquées après production en fermenteur, purification ou semi-purification et conditionnement par les techniques adéquates, qui peuvent être relativement coûteuses. D'un point de vue législatif, une telle préparation est considérée comme un additif alimentaire. Jusqu'à présent, seule la nisine, un lantibiotique, est acceptée comme additif alimentaire (E234). (Guinane *et al.*, 2005).

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

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

Pour que ces substances inhibitrices produites par les bactéries lactiques puissent avoir un réel développement en tant qu'un additif industriel, elles devraient présenter plusieurs caractères :

-Avoir une action bactéricide et pas seulement bactériostatique, il s'agit dans les produits alimentaires, d'éliminer définitivement la contamination initiale, afin qu'aucun développement de bactéries nuisibles ne puissent reprendre dès que les conditions de pH favorables à ces germes réapparaissent. (Charchar, 2003).

-Avoir un spectre d'activité étendu, en étant actives à la fois sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, car elles doivent être éliminées des produits alimentaires non seulement *Listeria monocytogene*, *Staphylococcus aureus* ou certaines bactéries sporulées mais aussi les souches d'*Escherichia coli* pathogènes et les Salmonelles. (Charchar, 2003).

-Présenter une stabilité et une bonne activité dans les conditions technologiques régnant à tous les stades des fabrications des produits, notamment dans toute la gamme des pH et des températures caractéristiques de ceux-ci. (Charchar ,2003).

-Présenter une bonne innocuité pour les consommateurs notamment ne pas entraîner de réactions d'allergie, même pas les produits de leur dégradation et ne pas perturber les équilibres de la flore intestinale et ne pas perturber les cinétiques d'acidification de levains acidifiants.

6.3 Les facteurs influençant l'activité des bactériocines dans les produits alimentaires :

Lors d'une application alimentaire, la composition du produit est un des premiers facteurs pouvant réduire ou totalement dissiper l'activité de la bactériocine de par son adsorption sur des composantes du produit, la limitation de sa solubilité et de sa diffusion, sa dégradation par des protéases, l'interaction avec des additifs alimentaires ou des ingrédients et/ou un pH inapproprié. Les traitements appliqués aux produits constituent un deuxième facteur pouvant limiter l'activité inhibitrice dans un produit alimentaire. En effet, des traitements thermiques trop élevés peuvent dégrader les bactériocines présentes. La température de stockage pourra également réduire l'activité des bactériocines, qui varie en fonction de la température (Galvez *et al.*, 2007).

Un autre facteur limitant l'activité des bactériocines est la flore autochtone, principalement sa concentration, la présence de bactéries résistantes, la présence de microorganismes produisant des protéases dégradant la bactériocine et l'état physiologique de cette flore. Un état physiologique stationnaire ou stressé ainsi que la formation de spores peut conduire à une résistance accrue. En outre, dans les produits solides, les bactéries forment des microcolonies ou des biofilms dont la résistance aux bactériocines peut être plus élevée (Schöbitz *et al.*, 2003).

D'autre part, il sera également important de considérer l'impact de la bactériocine sur la flore résidente favorable des aliments. Si celle-ci est sensible à la bactériocine, son déséquilibre pourra conduire à la croissance de microorganismes résistants aux bactériocines, pathogènes et/ou altérants avec des conséquences sanitaires et/ou organoleptiques défavorables. A notre connaissance, malheureusement, cet aspect n'a pas encore été étudié en détail.

Ces phénomènes peuvent conduire à :

- Une absence totale d'activité antimicrobienne,
- Une inhibition partielle des bactéries cibles,
- Une diminution initiale de la concentration des bactéries cibles sous la limite de détectabilité suivie d'une reprise de croissance au cours du stockage, un phénomène appelé « rebond »,
- Un effet inacceptable sur l'état sanitaire et/ou sur les qualités organoleptiques (Bouttefroy *et al.*, 2000 ; Schöbitz *et al.*, 2003).

6.4 La combinaison de différentes bactériocines pour augmenter la durée de vie du produit :

La combinaison de différentes bactériocines permet d'augmenter l'activité et le spectre d'action, tout particulièrement en combinant des bactériocines appartenant à des classes différentes. Cependant, une attention toute particulière devra être portée au développement de résistances chez les bactéries cibles. Le mécanisme de résistance aux bactériocines de classe IIa, par exemple, semble être identique pour toutes les bactériocines de cette sous-classe. Une bactérie résistante à une bactériocine de classe IIa sera donc résistante à d'autres bactériocines de classe IIa. D'autre part, des « *cross-resistances* », c'est-à-dire l'apparition de résistance à des bactériocines de classes différentes chez une bactérie cible, peuvent également être observées (Deegan *et al.*, 2006 ; Naghmouchi *et al.*, 2007).

Matériels et Méthodes

MATERIELS ET METHODES :

1. Introduction :

Le lait de chèvre présente des caractéristiques nutritionnelles (meilleure digestion et absorption) et thérapeutiques (action antiacides et hypo-allergisante) plus appréciables que le lait de vache.

Des laits crus été choisis pour réaliser des isollements de bactéries lactiques, en particulier des lactobacilles pour faire une étude écologique de cette flore, il faut avoir un certain nombre d'échantillon et ceci pour obtenir de nouvelles souches de bactéries lactiques possédant des potentialités fermentaires intéressantes en industries agro-alimentaires.

Le travail présent aura pour but principal d'étudier des interactions entre des souches de bactéries lactiques et deux bactéries pathogènes responsables de toxi-infection alimentaire (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, et *Escherichia coli* ATCC 25921).

2. Matériels biologique et conditions de culture :

2.1 Les échantillons :

Deux échantillons de lait cru de chèvre ont été collecté à partir de deux chèvre différentes dans deux fermes de la région ouest d'Algérie (Oran), (Tableau 7) , le prélèvement a été réaliser dans des conditions stériles, en lavant soigneusement les mamelles à l'eau tiède contenant 2% de l'eau de javel, les premiers jets ont été éliminé, puis une quantité suffisante de lait a été soutiré dans un flacon stérile qui est immédiatement placé dans la glacière (4%), jusqu'à son utilisation afin d'éviter tout risque de contamination .

Tableau 7 : Origine des échantillons utilisés :

Echantillons	Origine	Date de la récolte
Lait cru de chèvre L2	Oran, Saint Rémy	18 décembre 2008
Lait cru de chèvre L1	Oran, Es sénia	24 Novembre 2008

2.2 Provenances des bactéries pathogènes :

Deux espèces de bactéries pathogènes ont été sélectionnées afin d'effectuer le test des interactions bactériennes.

Tableau 8 : Les codes et les origines des souches pathogènes :

Souches	Code	Origine
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	ST	Laboratoire central médical du CHU d'Oran
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25921	EC	Laboratoire central médical du CHU d'Oran

2.3 Milieux et conditions de culture :

Les milieux soit liquides, soit solides par addition d'agar 1.5%, et la stérilisation se fait par autoclavage à 121 °C pendant 20min, à part les milieux qui contiennent du lait, leurs autoclavages se font à 110 °C pendant 10min.

Tableau 9 : Milieux de cultures utilisés et conditions d'incubation pour les lactobacilles :

Milieux de culture	PH	T C°	Incubation
MRS	5,4 (pour l'isolement des lactobacilles)	30 C°	aérobiose
MRS BCP	6,9	30C°	aérobiose
M16 BCP	6,5	30C°	aérobiose
MH solide et semi solide	7.4	30C°	aérobiose
Lait écrémé	7	30C°	aérobiose

La composition des milieux de cultures utilisés sont rassemblés dans l'annexe. Le milieu MRS (De Man Rogosa et Sharpe, 1960) est utilisé pour les cultures courantes et acidifiées pour les lactobacilles, MRS BCP et M16 BCP pour les tests biochimiques, MH (Muller et Hinton, 1941) pour l'étude des interactions et le lait écrémé pour l'étude de la cinétique d'acidification, pour la conservation des souches on utilise le lait écrémé à 30% de glycérol.

3. Isolement et dénombrement des bactéries lactiques :

3.1 Isolement des bactéries lactiques sur milieu MRS :

Il a été effectué sur milieu MRS gélosé (De Man *et al.*, 1960) à pH 5,4 (lactobacilles), le pH est mesuré à l'aide du pH mètre.

L'échantillon de lait a été enrichi en l'incubant à 30°C pendant 24h (jusqu'à coagulation), des suspensions de dilutions décimales dans l'eau physiologique ont été préparées, un millilitre des trois dernières dilutions (10^{-6} , 10^{-7} et 10^{-8}) a été ensemencé en profondeur sur milieu MRS acidifié (3 boîtes de pétri / dilution), après solidification des milieux, les boîtes de pétri ont été incubées à 30°C pendant 48 h (Carr *et al.*, 2002), 5 à 10 colonies bien isolées ont été prélevées et transférées dans du bouillon MRS, seules les colonies à Gram+ et catalase négatif sont retenues pour purification.

3.2 Dénombrement des flores microbiennes dans le lait cru :

Les bactéries lactiques sont dénombrées sur le milieu MRS solide, le dénombrement aura une influence sur le déroulement de la fabrication des produits à base de lait cru.

L'échantillon du lait cru enrichi, après agitation au vortex pendant 2 minutes et réglé au maximum, les dilutions décimales sont réalisées dans l'eau physiologique, et les tubes sont agités pendant 10 secondes au vortex, 1ml est ensemencé en profondeur sur milieu solide, (3 boîtes pour chaque dilution), après solidification des milieux, les boîtes de pétri sont incubées à 30°C pendant 48h. (Carr *et al.*, 2002).

Seules les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies sont utilisées pour le comptage.

4. Purification des isolats de bactéries lactiques:

La purification de la souche est faite sur MRS solide par la méthode de stries et milieu liquide après croissance et comptage des colonies en boîtes, on prélève de chaque boîte 5 à 10 colonies bien isolées sur lesquelles sera effectuée une coloration de Gram et une recherche de

catalase, les bactéries à caractère gram positif et catalase négatif sont retenues et repiquées sur MRS liquide et solide jusqu'à l'obtention d'une culture pure. La pureté est vérifiée par observation macroscopique et microscopique par coloration de gram, en fin de la purification les caractères Gram positif et catalase négatif doivent persister.

5. Conservation des souches pures :

On utilise deux techniques de conservation :

5.1 Conservation courte durée :

Les souches pures sont ensemencées sur MRS gélosé incliné dans des tubes stériles à essai et incubées à 30°C pendant 18 heures. Les cultures sont conservées à 4°C, et leur renouvellement se fait par repiquage toutes les 3 semaines. (Samelis *et al.*, 1994).

5.2 Conservation longue durée:

Les souches sont ensemencées dans du MRS liquide et incubées à 30°C pendant 18 heures, les culots sont récupérés par centrifugation à 3000 *rpm* pendant 5 minutes, une fois le surnageant éliminé, on additionne au culot du lait écrémé à 30% de glycérol, après agitation au vortex, les cultures sont conservées en suspension et en épendorfs à -20°C.

Au fur et à mesure des besoins, les cultures sont décongelées et repiquées dans du lait écrémé avant chaque utilisation. (Mathot *et al.*, 1994 ; Moulay *et al.*, 2006).

6. Caractérisation et identification des souches :

Les souches à caractère Gram positif et catalase négatif ont été isolé et purifié, la plupart des souches présentent la même morphologie donc elles peuvent être identiques en présentant les mêmes caractères, l'identification est déterminée par l'étude des caractères morphologiques, physiologiques, biochimiques et une détermination du profil fermentaire.

6.1 Etude morphologique :

6.1.1 L'étude macroscopique:

Cette étude consiste à observer les cultures obtenues sur milieu MRS solide à l'œil nu pour caractériser la taille, la forme et la couleur des colonies, et aussi la présentation du trouble en milieu liquide.

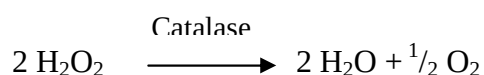
6.1.2 L'étude microscopique:

Cette étude permet d'observer la morphologie cellulaire, le mode d'association et leur gram par la coloration de Gram au microscope, et aussi d'identifier les souches selon leur pureté.

6.2 Tests biochimique et physiologique :

6.2.1 Test de catalase :

La catalase est une enzyme respiratoire qui permet la dégradation du peroxyde d'hydrogène.



Cette étude consiste à différencier entre la majorité des bactéries lactique (catalase négatif) et les entérocoques (catalase positif).

Et c'est en prélevant une colonie bien isolée et l'étaler sur une lame avec une goutte d'eau oxygénée à 10 en milieu liquide on ajoute 1ml de peroxyde d'hydrogène à 3% à une culture jeune (18heures) en tube, un résultat positif se traduit par un dégagement de bulles gazeuses et c'est l'activité positive de l'enzyme catalase qui décompose le peroxyde d'hydrogène.

Les colonies ne produisant pas de bulles d'air sont catalase négatif. (Larpent *et al.*, 1990).

6.2.2 Hydrolyse de l'arginine :

Ce test consiste à identifier les lactobacilles (ADH +) et (ADH -).

Le milieu utilisé pour ce test est le M16 BCP (milieu M16 solide avec un indicateur de pH qui est le pourpre de bromocrésol).

Des cultures jeunes sontensemencées par la méthode des multipoints, sur du M16 BCP , après 24 heures à 48 heures d'incubation, le milieu va être acidifiés ,car les bactéries vont fermenté le lactose et le milieu va prendre une couleur jaune puis les bactéries qui possèdent l' ADH vont utilisé l'arginine et réalcalinisés le milieu par la production de l'ammoniac (NH₃) ,et c'est pour cela que le milieu redeviendra violet (Arg positif),et si le

milieu reste jaune donc les bactéries ne possèdent pas l'enzyme (Arg négatif) .(Thomas ,1973).

6.2.3 Croissance à différente température :

Ce test consiste à différencier entre les bactéries lactiques mésophiles des thermophiles.

On aensemencé les isolats dans du MRS liquide (pH=6,8), puis on les a incubés à différentes températures à 15°C, 30°C et 45°C , pendant 24 heures à 48 heures .

La croissance se manifeste par un trouble bien défini du milieu et l'apparition du dépôt au fond du tube.

6.2.4 Test de thermoresistance :

Tous les microorganismes ne réagissent pas de la même façon à la chaleur. On peut alors dire que leur « thermorésistance » peut être plus ou moins élevée.

Lorsque le milieu n'est pas favorable à l'activité des levures et des bactéries (dans un milieu où on ajoute beaucoup de sucre, par exemple), la thermorésistance des microorganismes augmente.

Une série de cultures jeunes des souches a subit un chauffage à 63°C ,au bain marie pendant 30 minutes puis incubée à 30°C pendant 24 heures.

6.2.5 Croissance en présence de 4% et 8% de NaCl :

Ce test sert à différencier entre les genres de bactéries lactiques (Samelis *et al.*, 1994) .

Il consiste à ensemencer les souches à partir de cultures jeunes (18 heures) dans un milieu MRS liquide additionné de 4% de NaCl et un autre à 8% de NaCl en les incubant à 30°C pendant 24 heures à 48 heures .

La croissance se manifeste par un trouble du milieu.

6.2.6 Recherche du type fermentaire :

Ce test permet d'identifier le type du métabolisme (homofermentaire ou hétérofermentaire), par lequel le substrat carboné est transformé.

Il consiste à verser dans des tubes à essais contenant des cloches de durham le milieu MRS liquide (pH=6,8), et à ensemencer les souches puis à les incuber à 30°C pendant 24 heures à 48 heures.

6.3 Identification des espèces :

6.3.1 Etude du profil fermentaire :

Après les tests d'identification du genre, on a sélectionné 19 souches, sur les quelles on a étudié le profil fermentaire des lactobacilles, et c'est en réalisant le test des sucres, il est utilisé pour discerner les espèces de *Lactobacillus*.

La fermentation de 14 sucres a été testés pour l'ensemble des isolats .Les sucres utilisés sont : Mannitol, Saccharose, Levulose, Rhamnose, Galactose, Xylose, Esculine, Sorbitol, Arabinose, Maltose, Fructose, Lactose, Glucose et Raffinose.

Après obtention des cultures jeunes des souches, dans des tubes épendorf stérile, on a déposé un volume de 2ml de la solution bactérienne qu'on a centrifugé à raison de 5000 *rpm* pendant 5minutes, on a jeté le surnageant et lavé le culot avec 1ml du tampon phosphate, puis après agitation au vortex on a fait une deuxième centrifugation à 3000 *rpm* pendant 3minutes, le surnageant a été jeté ensuite on a ajouté au culot 2 ml de MRS BCP.

L'étape suivante consiste à répartir 100µl des différents sucres dans des tubes à hémolyse contenant déjà 1ml de milieu MRS BCP en ajoutant aussi 100µl de chaque isolat.

Les conditions d'anaérobiose sont assurées par ajout d'une couche d'huile de paraffine stérile à la surface et l'incubation se fait à 30°C pendant 24 heures à 48 heures.

Un résultat positif s'exprime par le virage de la couleur du milieu, du violet au jaune. (Klein *et al.*,1998 et Stiles *et al.*,1997).

7. Etude cinétique :

Les milieux utilisés dans cette étude sont le milieu MRS solide et le lait écrémé, l'évaluation de l'acidité produite par les souches pures est réalisée par pH métrie et par titrimétrie.

L'acidité est exprimée en degrés Dornic.

1D°=0,1g/l d'acide lactique.

Acidité= $V_{NaOH} \times 10$

V_{NaOH} =Volume de la soude coulée.

A partir de cultures jeunes de 18 heures, des solutions bactériennes dans 10 ml de lait écrémé ont étéensemencé souches étudiés, l'incubation se fait de 18 heures à 24 heures à 30°C jusqu'à coagulation du lait (le temps de coagulation a été noté).

On a pris aléatoirement 3 tubes : un tube contenant du lait fortement coagulé, un autre contenant du lait moyennement coagulé et un dernier contenant du lait faiblement coagulé.

De chaque tube, 3ml de lait écrémé coagulé a été transvasé stérilement dans 100ml de lait écrémé et été homogénéisé, le mélange a été réparti dans des tubes stériles à raison de 10ml par tube. Les mesures de la croissance et de l'acidité ont été réalisées simultanément aux intervalles de temps réguliers suivants : 0h, 2h, 4h, 6h, 8h, 18h et 24h.

7.1 Mesure de l'acidité par titrimétrie et pH métrie :

L'acidité titrable du lait peut être exprimée de plusieurs manières, dans l'industrie laitière, on emploie le plus souvent les degrés Dornic (°D).

L'équivalence est en général détectée par le virage d'un indicateur de pH, substance dont la couleur change selon le pH du milieu réactionnel, dans ce cas acide faible + base forte : le pH à l'équivalence est basique, indicateur le phénolphtaléine.

10ml de lait écréméensemencé a été transvasé dans un petit bécher, le pH est mesuré à l'aide du pH mètre puis cinq gouttes de phénolphtaléine (à 1% dans l'éthanol à 95°C) ont été ajouté et on a titré avec une solution de soude (NaOH N/9) ajoutée à la burette jusqu'à ce que la couleur blanche du lait sous agitation vire au rose pâle, cette couleur doit persister au moins 10 secondes puis le volume de la soude versée a été noté.

7.2 Mesure de la croissance :

On a mesuré la croissance bactérienne par la méthode de dénombrement sur milieu MRS solide, on aensemencé chaque solution bactérienne dans 10 ml de lait écrémé stérile et après incubation (18h ou plus) et coagulation, on a réalisé une série de dilution dans 9ml d'eau physiologique, les souches ont étéensemencé en profondeur puis on a ajouté le milieu MRS solide en surfusion à 45°C, on a dénombré seulement les boîtes contenant entre 30 à 300 colonies et ceci après incubation à 30°C pendant 24h à 48heures. (Guiraud, 2003).

Les résultats sont exprimés selon la relation (joffin et leyrat, 2006) :

$$N = \frac{\sum c}{(n_1 + 0,1 n_2) d}$$

$\sum c$: est la somme des colonies comptées sur les boites.

n_1 : est le nombre de boites comptées à la dilution la plus faible

n_2 : est le nombre de boites comptées à la dilution la plus élevée

D : est la valeur correspondant à la dilution à partir de la quelle les premiers dénombrements ont été retenus.

8. Etude des interactions avec les bactéries pathogènes :

8.1 Recherche des inhibitions :

La recherche de souches bactérienne productrice de substances antimicrobienne est effectuée sur les 19 isolats.

On a utilisé la méthode directe de Fleming *et al.*, (1975), pour mettre en évidence des interactions bactériennes, ce test est réalisé sur milieu MRS solide tamponnée pour visualiser l'inhibition de la croissance de la bactérie pathogène. Cette méthode consiste à cultiver les deux souches dans le même milieu en double couche.

A partir de cultures jeunes (18 heures) de souches lactiques ont été ensemencé en touches (ST) à l'aide de l'inoculateur multipoint à la surface du milieu solide, après séchage de ces touches à température ambiante (25°C), les boites de pétri ont été mis à l'étuve et incubé à 30°C pendant 24 heures.

Après croissance des colonies, on a ensemencé en masse avec 8ml de MH semi solide contenant 50µl de culture jeune de bactéries pathogènes (*Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*) respectivement, après solidification du milieu, les boites de pétri ont été incubé à 30°C pendant 24 heures. (Fleming *et al.*, 1975).

L'inhibition s'observe par la présence d'un halo clair autour des souches ensemencées en touche, après 24heures d'incubation, on a mesuré leurs dimensions.

8.2 La nature de la substance antimicrobienne :

La recherche de la nature de l'agent inhibiteur a été réalisé en milieu solide et en milieu liquide, l'inhibition se traduit par la présence de zones d'inhibition claires autour des colonies des souches tests ensemencés en multipoints, cet effet antagonisme peut être attribué à n'importe quel facteur antibactérien produit par les bactéries lactiques : acide organique, bactériophage, ou la synthèse d'une bactériocine.

On a réalisé un certains nombres de tests pour caractériser l'agent responsable des inhibitions observées.

8.2.1 Production d'acides organiques :

Le milieu de culture utilisé pour les cultures bactériennes est un milieu MRS tamponné à pH 7 avec un tampon phosphate, pour détecter l'influence du pH du milieu sur le développement des souches testées.

Après réalisation de la technique de la double couche, on compare les inhibitions obtenues sur milieu non tamponné (témoin) et tamponné.

8.2.2 Recherche de bactériocine :

Le but de ce test est de prouver d'une manière assez simple, mais n'est au moins précise la nature de la substance antimicrobienne élaborée par nos isolats.

Nous avons utilisé des enzymes protéolytiques, la trypsine et l' α -chymotrypsine et l'effet de ces enzymes sur l'activité inhibitrices des souches sélectifs a été réalisé sur milieu liquide et solide (MRS et MH).

8.2.3 Traitement enzymatique et Thermique :

La solution enzymatique de chaque enzyme (trypsine et α -chymotrypsine) a été préparée dans des tampons phosphate stérile (2mg d'enzyme +1 ml de tampon phosphate).

A partir des cultures jeunes de 18 heures des souches étudiés dans du MRS liquide, été prélevé dans des tubes épendorfs stériles qu'on a centrifugé à une vitesse de 8000 *rpm* pendant 10 minutes, a partir des surnageants obtenus, on a récupéré un volume de 500 μ l auquel on a additionné 250 μ l de chaque enzyme (trypsine et α -chymotrypsine) respectivement.

Concernant le traitement thermique, on a coulé 10ml de milieu MH solide en surfusion additionné à 200 μ l de *Staphylococcus aureus* dans des boîtes de pétri. Après la solidification du milieu, on a creusé 5 puits à l'aide d'une pipette pasteur stérile et on a exposé le reste du surnageant à un chauffage de 100°C pendant 30 minutes.

Dans les puits, on a versé respectivement 20 μ l de :

- Surnageant bactérien non traité (témoin +).
- MRS (pH=6,8) liquide (témoin -).
- Surnageant bactérien + trypsine.
- Surnageant bactérien + α -chymotrypsine.
- Surnageant bactérien chauffé à 100°C. (De Roissart et Luquet, 1994).

Le tout est incubé à 37°C pendant 24 heures à 48 heures.

8.2.4 Recherche de phage :

Ce test a été réalisé pour éliminer la supposition d'une inhibition causée par les phages bactériens.

Le chloroforme utilisé dans ce test, a pour but de tuer les bactéries prélevées avec la gélose.

Cette technique consiste à découper à l'aide d'une pipette pasteur stérile un fragment de gélose dans la zone d'inhibition, que l'on ajoute à 1ml d'une solution de tampon phosphate contenant 300µl de chloroforme, après agitation et incubation à une température ambiante pendant 10minutes, on a versé 1 ml de ce mélange dans 10 ml de gélose MRS molle, le tout été agité et coulé stérilement dans une boîte de pétri (De Roissart et Luquet, 1994).

Après incubation à 30°C pendant 24 heures, on note la présence ou l'absence des phages de lyse qui indique la présence de phage.

Résultats et Discussion

RESULTATS ET DISCUSSION :

1. Examen des échantillons :

Les processus du prélèvement sont souvent très complexes sur place jusqu'à l'analyse de l'échantillon au laboratoire, ne sont la plus part du temps pas connus, les connaissances nécessaires des facteurs et de leur impact sur l'échantillon ainsi que sur les paramètres ou indicateurs de qualité à analyser font également défaut.

Il a été prouvé que le processus d'échantillonnage est souvent sous-estimé et représente, même la plus grande source d'erreurs dans certains cas.

Résultats de l'échantillonnage, composition et état de l'échantillon, réserves et dérogations éventuelles par rapport aux prescriptions et au plan d'échantillonnage, événements particuliers survenues au cours de l'échantillonnage et transport.

L'importance de l'échantillonnage est de plus en plus reconnue parmi les spécialistes, raison pour laquelle on l'a intégré dans l'accréditation et on réfléchi à son application (Roux *et al.*, 1995).

On a mesuré le pH et étudié l'aspect du lait cru liquide et coagulé pour déterminer la qualité hygiénique et microbiologique dans échantillon de lait cru, avant l'isolement des bactéries lactiques.

Les valeurs de pH obtenues sont les suivantes :

6,7 lait cru de chèvre (L1), 6,6 lait cru de chèvre (L2).

Les échantillons liquides ont une couleur blanche, opaque, l'odeur est normale.

Les coagulants obtenus après 24 heures d'incubation à 30 °C sont homogènes, ce qui signifie que c'est une fermentation lactique, ce qui correspond à la définition du lait (FAO, 1998 a).

2. Dénombrement de la microflore lactique :

Le dénombrement des microorganismes viables après culture est la plus utilisée, pour établir le niveau de contamination globale du lait, l'avantage est que l'on compte que les cellules vivantes et le principale inconvénient est le temps d'incubation.

La principale méthode est le dénombrement en milieu solide, le type de dénombrement repose macroscopiquement, cependant les bactéries forment des groupements en suspension ne donneront qu'une seule colonie, c'est pourquoi on n'exprime pas le résultat en nombre de cellules mais en unité formant colonie (*ufc*) par unité de volume.

Les résultats de dénombrements ont été réalisés sur les échantillons de lait cru de chèvre (L1 et L2) et sont inscrits dans le tableau 7, à partir des cultures obtenues lors de l'isolement et à partir des trois dernières dilutions.

Généralement le milieu MRS acidifiant est utilisé pour séparer les lactobacilles.

Cette méthode permet l'emploi des milieux sélectifs. (Guiraud, 2003).

Un lait cru de très bonne qualité doit contenir un nombre réduit de microorganismes, moins de 10^5 germes/ml au moment de la traite. (FAO, 1998 b). Le résultat du dénombrement de la microflore contenu dans le lait cru de chèvre est de $2,9 \times 10^8$ ufc/ml, ces résultats peuvent être comparés aux résultats obtenus par Guetouache, (2007) qui a montré que le nombre de la flore totale contenu dans le lait cru de chèvre est de $6,6 \times 10^8$ ufc/ml.

Tableau 10 : Le dénombrement de la microflore contenu dans le lait cru de chèvre

Milieu / Dilutions	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
MRS pH _{5,4}	108	92	34
	>300	209	127
	81	77	51
	121	65	11
			67

Les résultats sont exprimé selon la relation suivante : (joffin et leyrat, 2006)

$$N = \frac{\sum c}{(n_1 + 0,1 n_2) d}$$

$\sum c$: est la somme des colonies comptées sur les boites

n_1 : est le nombre de boites comptées à la dilution la plus faible

n_2 : est le nombre des boites comptées à la dilution la plus élevée

D : est la valeur correspondant à la dilution à partir de la quelle les premiers dénombrements ont été retenus.

Pour trois dilutions, la loi est :

$$N = \frac{\sum c}{(n_1 + 0,1 n_2 + 0,01 n_3) d}$$

On applique :

$$N = \frac{108 + 81 + 121 + 92 + 209 + 77 + 65 + 34 + 127 + 51 + 67}{(3 \times 1) + (4 \times 0,1) + (4 \times 0,01) \times 10^{-6}}$$

$$N = 2,9 \times 10^8 \text{ ufc/ml}$$

3. Isolement, identification et caractérisation des isolats :

L'utilisation du milieu MRS solide (pH =5,4), nous a permis d'isoler les espèces de *Lactobacillus*, l'isolement a été effectué en profondeur après incubation à 30°C pendant 48 heures, les résultats ont été caractérisé microscopiquement et macroscopiquement.

3.1 Caractérisation macroscopique :

Après purification des clones isolées et après l'ensemencement en profondeur sur milieu solide, on a deux types de colonies : lenticulaire et ronde de taille variable de 1 mm jusqu'à 2mm de diamètre, de couleur blanchâtre, d'une surface lisse et d'un pourtour circulaire régulier. (Figure 4).

Sur milieu liquide, la croissance des bactéries apparaît au fond du tube sous forme de trouble opaque et une zone claire à la surface et elle devient de plus en plus claire au fur et à mesure qu'on purifie les souches. (Figure 5).

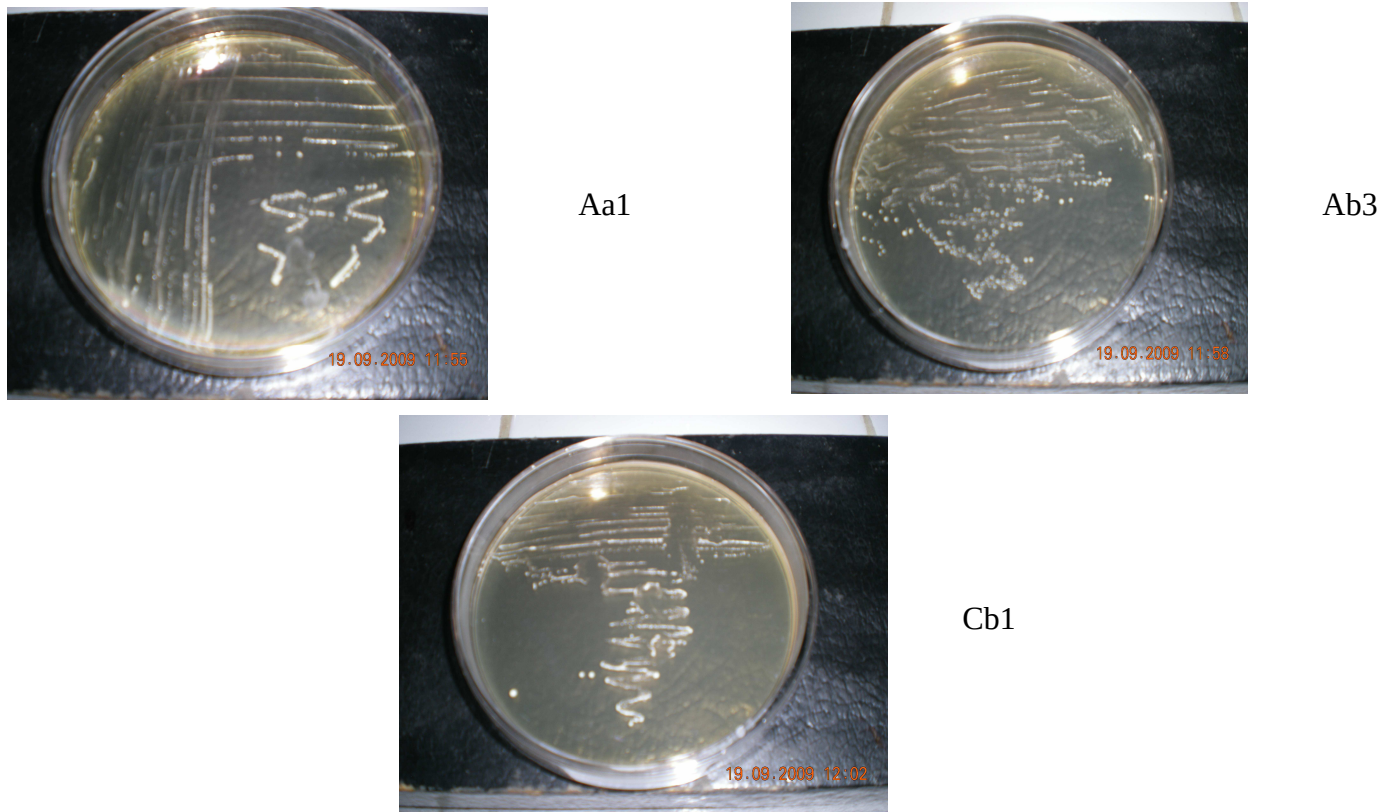


Figure 4 : Aspects des colonies de bactéries lactiques en surface sur milieu MRS solide.

Aa1 : *Lb. intestinalis*

Ab3 : *Lb. Casei*

Cb1 : *Lb. johnsonii*



Figure 5 : Aspects des cultures pures des lactobacilles en milieu MRS liquide
(De gauche à droite : Témoin – Ab7- Bb4- Cb1- Aa3- Ab9 et Bb5)

A : Zone claire (pas de croissance)
B : Trouble (présence de croissance)

Ab7 : *Lb.casei*

Bb4 : *Lb.intestinalis*

Cb1 : *Lb.johnsonii*

Aa3 : *Lb.plantarum*

Ab9 : *Lb.acidophilus*

Bb5 : *Lb.intestinalis*

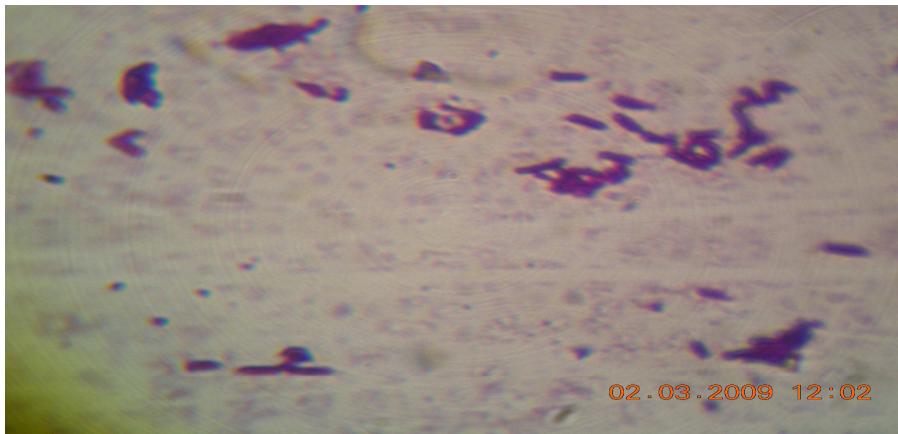
3.2 Caractérisation microscopique :

Après purification des clones isolés, l'observation microscopique a été effectuée après la réalisation de la coloration de Gram et au grossissement ($\times 100$).

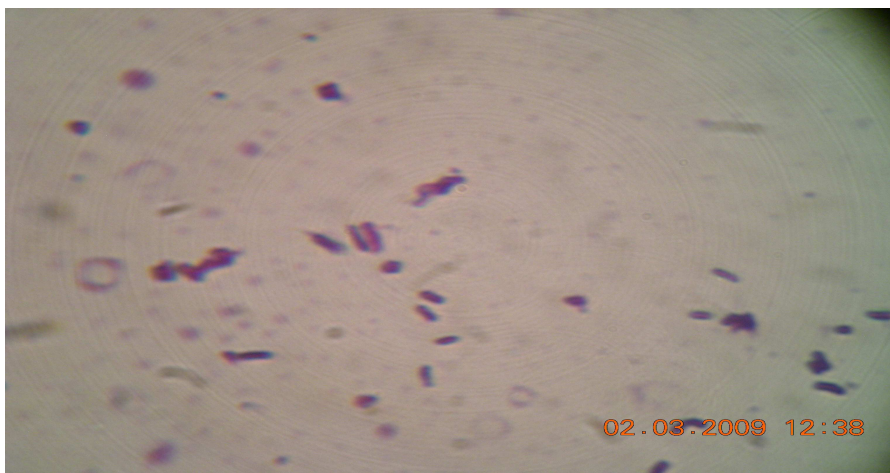
Leurs aspects microscopiques ont été notés sur le Tableau 11. Parmi les souches isolées, on a retenu 19 souches à Gram+ et catalase – et de forme bâtonnet et de différentes modes d'association, souvent isolées et en diplo. (Figure 6).

Tableau 11 : Les différentes formes et modes d'associations des souches isolées observés au microscope ($G \times 100$).

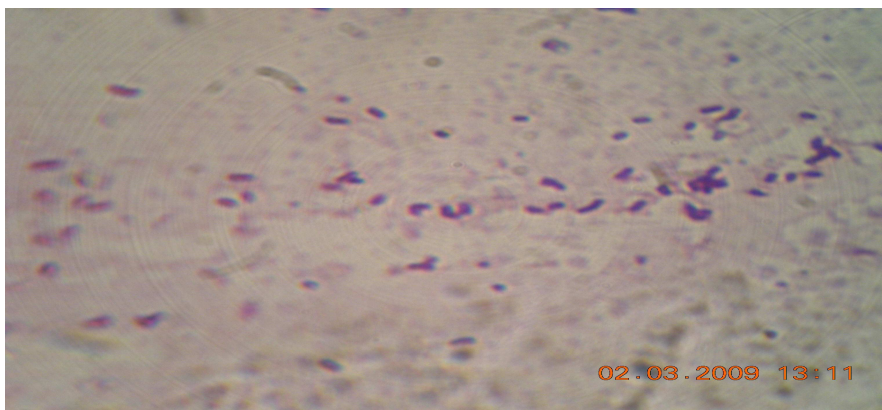
Référence de la souche	Gram	Forme des cellules	Mode d'association	T°C
Aa1	+	Bâtonnets courts	Isolés et en chaines	30°C
Aa1'	+	Bâtonnets	En diplo	30°C
Aa2	+	Bâtonnets courts	Isolés et en diplo	30°C
Aa3	+	Bâtonnets courts	Isolés et en chaines	30°C
Ab2	+	Bâtonnets fins et longs	Isolés	30°C
Ab3	+	Bâtonnets courts et longs	Isolés et en palissade	30°C
Ab5	+	Bâtonnets courts	Isolés et en diplo	30°C
Ab6	+	Bâtonnets courts	Isolés	30°C
Ab7	+	Bâtonnets	Isolés et en diplo	30°C
Ab8	+	Bâtonnets courts et longs	en diplo	30°C
Ab9	+	Bâtonnets courts	Isolés et en chaines	30°C
Bb1	+	Bâtonnets	Isolés et en diplo	30°C
Bb2	+	Bâtonnets	Isolés et en diplo	30°C
Bb3	+	Bâtonnets	en diplo	30°C
Bb4	+	Bâtonnets très courts	Isolés et en diplo	30°C
Bb5	+	Bâtonnets	en diplo	30°C
Cb1	+	Bâtonnets	Isolés et en diplo	30°C
Cb1'	+	Bâtonnets courts	En chaine et en diplo	30°C
Cb2	+	Bâtonnets courts	Isolés et en diplo	30°C



(A)



(B)



(C)

Figure 6 : Observation microscopique des souches de bactéries lactiques (au grossissement $\times 100$).

A : représente la souche Ab3

B : représente la souche Ab7

C : représente la souche Bb4

3.3 Caractérisation physiologique et biochimique :

L'objectif de cette partie est d'identifier les souches isolées et purifiées. L'étude d'identification a été effectuée en réalisant des tests physiologiques et biochimiques et en comparant les résultats avec les tableaux référentiels. (Collins *et al.*, 1987 ; Kandler et Weiss, 1986).

Les résultats des tests des 19 souches sont notés dans le Tableau 12.

3.3.1 Type fermentaire, température de croissance et NaCl :

L'étude du type fermentaire (figure) révèle que toutes les souches isolées sont homofermentaires, les souches homofermentaires vont produire 90% d'acides lactiques et seulement 1% de CO₂, les souches hétérofermentaires quand à elles, vont produire de l'acide lactique et du CO₂ à proportions égales, et cela se manifeste par l'apparition de gaz (CO₂) dans la cloche de Durham. (Carr *et al.*, 2002), et elles croissent à la température 30°C, 14 souches se développent à 15°C et 11 souches sont des thermophiles, les restantes sont des mésophiles.

Toutes les souches ont donné simultanément des résultats positifs aux tests de thermorésistance sauf une seule souche (Aa3) n'a pas résisté au test, l'augmentation de la thermorésistance se produit lorsque le milieu dans lequel vivent les microorganismes devient défavorable par rapport au milieu aqueux initial.

A l'opposé, la présence d'antiseptiques (comme l'éthanol contenu dans le vin) permet de réduire la thermorésistance des microorganismes.

Flore thermorésistante. Un certain nombre de bactéries sont capables de résister aux traitements thermiques usuels utilisés dans le but d'assainir ou de conserver le lait. Elles sont dites thermorésistantes. Leur développement ultérieur peut altérer les produits et, parfois, être dangereux pour la santé.

Les souches Aa1, Ab6, Ba9, Bb1, Bb5, Cb1 et Cb2, sont aptes à se développer à 15°C et 45°C, propriétés trouvées chez *Lactobacillus intestinalis*, *Lb delbruechii subsp delbruechii*, *Lb johnsonii* et *Lb acidophilus*, les souches Aa2, Aa3, Ab2, Ab3, Ab5, Ab7 qui poussent à 15°C et pas à 45°C caractère rencontré chez *Lb rhamnosus*, *Lb Plantarum*, *Lb Casei*, ces résultats ont été confirmés après l'étude du profil fermentaire.

Toutes les souches ont montré une croissance sur MRS à 4% et 8% de NaCl.

3.3.2 Hydrolyse de l'arginine :

Ce caractère est très important (Figure 7), les souches des lactobacilles sont différenciées par le test d'ADH. De son étude, les résultats obtenus sont négatifs pour toutes

les souches sauf les deux souches (Ab6 et Cb1') sont arg⁺ qui représentent des lactobacilles homofermentaires et thermophiles du groupe I et appartient au *Lb.delbrueckii* subsp *delbrueckii*.

L'incapacité à hydrolyser l'arginine de certaine lactobacille est un résultat normale du à leur appartenance au groupe II des lactobacilles. Le milieu donne une couleur jaune lors de l'absence d'enzyme (ADH-) tandis que la présence de l'enzyme (ADH+), le milieu ne change pas de couleur. (Bourgeois et Larpent, 1996).

Tableau 12 : Caractères Physiologiques et biochimiques des souches de lactobacilles

Les souches Tests	Aa1	Aa1'	Aa2	Aa3	Ab2	Ab3	Ab5	Ab6	Ab7	Ab8	ba9	Bb1	Bb2	Bb3	Bb4	Bb5	Cb1	Cb1'	Cb2'
Type fermentaire	Homo-fermentaire	Homo-fermentaire	Homo-fermentaire	Homo-fermentaire	Homo-fermentaire	Homo-fermentaire	Homo-fermentaire	Homo-fermentaire	Homo-fermentaire	Homo-fermentaire	Homo-fermentaire	Homo-fermentaire	Homo-fermentaire	Homo-fermentaire	Homo-fermentaire	Homo-fermentaire	Homo-fermentaire	Homo-fermentaire	Homo-fermentaire
NaCl à 4%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl à 8%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Croissance aux températures 15°C 30°C 45°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Thermorésistante	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hydrolyse de l'arginine	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

+ : réaction positif
- : réaction négatif

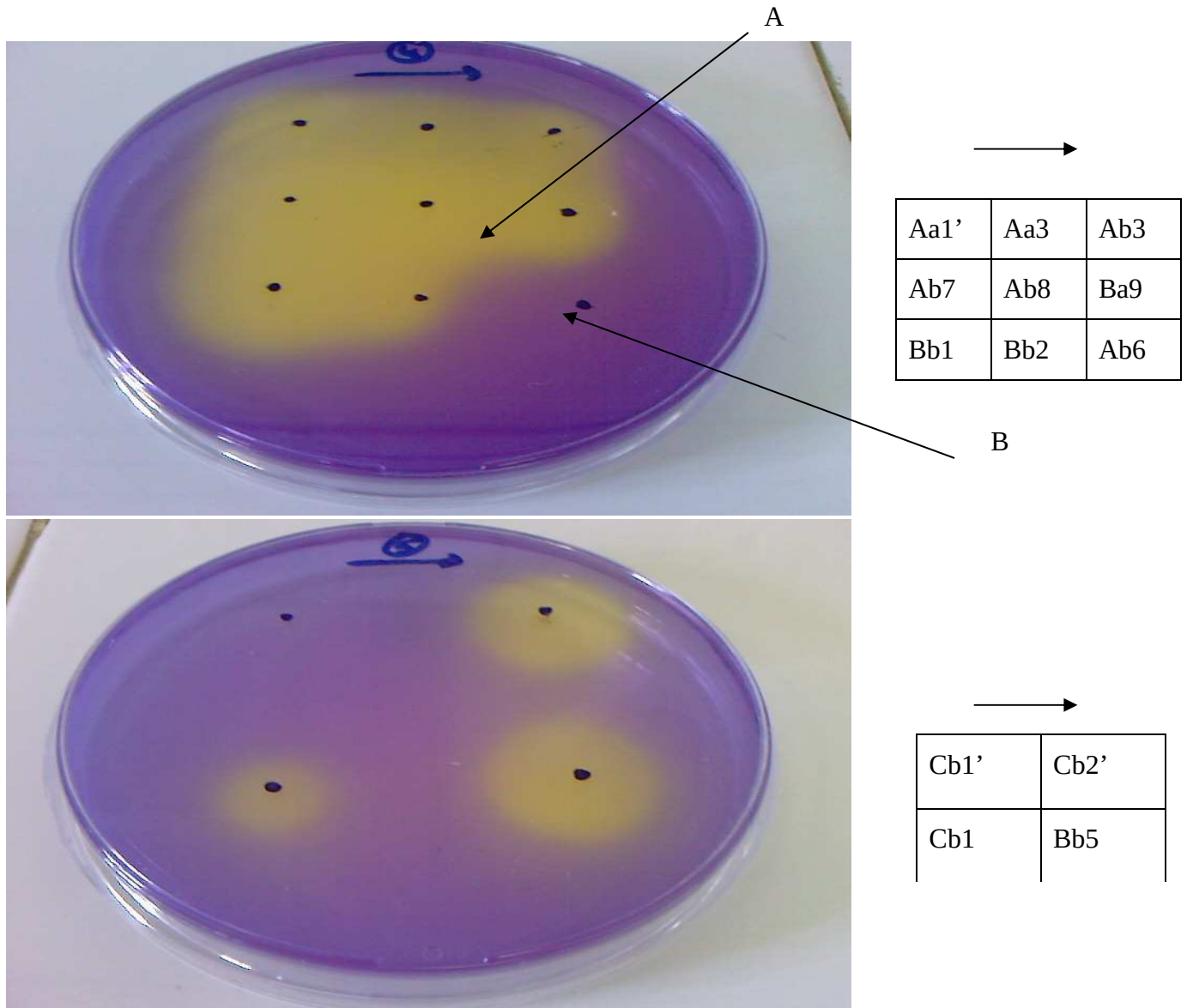


Figure 7 : L'aspect des colonies de lactobacilles sur milieu M16 BCP

A : présence de couleur jaune signifie les souches qui ne possèdent pas une ADH

B : Absence de couleur jaune signifie les souches qui possèdent une ADH.

3.3.3 Test du profil fermentaire :

Les résultats obtenus du test du profil fermentaire sont regroupés dans le Tableau 13. Le profil fermentaire a permis d'identifier les bactéries lactiques, le résultat final du test est après 48 heures. La détermination des genres et des espèces bactérienne, réside essentiellement dans leur capacité à fermenter les sucres en acide lactique et autres acides organiques. Les résultats du profil fermentaire (Figure 8) de quatorze sucres ont montré que le glucose, le saccharose, le lactose et le fructose sont fermentés par tous les lactobacilles et ont confirmé l'identité des souches établit par Carr *et al*, (2002) et Kandler et Weiss, (1986) en se basant sur des données bibliographique.

L'utilisation de ce caractère permet de conclure la pré identification et de mieux identifier les isolats au niveau de l'espèce (Tableau 15). La comparaison des caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques révèle que certains isolats possèdent des caractères très proches, ce qui a permis de les classer dans la même espèce.

La capacité de fermenter le mannitol dissocie les lactobacilles en 2 groupes : Le groupe mannitol positif renferme l'espèce *Lb plantarum*, *Lb intestinalis*, *Lb casei* et le groupe mannitol négatif comprend *Lb delbrueckii subsp delbrueckii*, *Lb acidophilus*, *Lb johnsonii*.

Les souches qui fermentent le mannitol, le ribose, l'arabinose sont identifiées comme *Lb Plantarum*, La souche Aa3 est homofermentaire mésophile et n'hydrolyse pas l'arginine et possède un profil fermentaire qui correspond à celui de *Lb plantarum*, d'après les résultats de Guetouache (2007).

Les souches Aa1' et Aa2 croissent à 15°C et pas à 45°C, n'hydrolyse pas l'arginine mais elle hydrolyse l'esculine (Collins *et al*, 1989) et fermentent le rhamnose, elles sont identiques à *Lb rhamnosus*.

Les souches Aa1 et ba9 sont aptes à se développer à 15°C et 45°C, fermentent le raffinose et pas le sorbitol, propriétés trouvées chez *Lb intestinalis* et *Lb acidophilus*, d'après les résultats de Guetouache (2007).

Les souches Ab6 et Cb1' sont des thermophiles, hydrolysent l'arginine et ne fermentent pas le galactose, elles sont identiques à *Lb delbrueckii subsp delbrueckii* d'après les résultats de Carr *et al*, (2002).

La souche Cb1 est thermophile mais n'hydrolyse pas l'arginine et ne fermente ni le mannitol ni le sorbitol mais fermente le raffinose, et possède un profil fermentaire qui correspond à celui de *Lb.johnsonii*. (Kandler et Weiss, 1986).

Les souches Ab7 et Ab8 sont des mésophiles, fermentent le mannitol, Galactose, Sorbitol et l'esculine propriétés trouvés chez *Lb.paracasei subsp. Paracasei* et *Lb.casei*, comme les résultats trouvés de Mami, (2007).

8 espèces appartenant à *Lactobacillus* ont été isolé et se répartissent comme suit :

Lactobacillus intestinalis : 4 souches (Aa1, Bb3, Bb4 et Bb5).

Lactobacillus rhamnosus : 2 souches (Aa1'et Aa2).

Lactobacillus plantarum : 1 souche (Aa3).

Lactobacillus casei : 4 souches (Ab2, Ab3, Ab5 et Ab7).

Lactobacillus delbrueckii subsp delbrueckii : 2 souches (Ab6 et Cb1').

Lactobacillus paracasei subsp paracasei : 1 souche (Ab8).

Lactobacillus acidophilus : 3 souches (ba9, Bb1 et Bb2).

Lactobacillus johnsonii : 2 souches (Cb1 et Cb2').

La Figure 8 distingue les profils fermentaires des souches de lactobacilles Ab8 et Aa3.

Tableau 13 : Résultat du test des sucres pour l'indentification des espèces.

Les sucres Les souches	Aa1	Aa1'	Aa2	Aa3	Ab2	Ab3	Ab5	Ab6	Ab7	Ab8	Ab9	Bb1	Bb2	Bb3	Bb4	Bb5	Cb1	Cb1'	Cb2
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Levulose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rhamnose	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculine	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+
Sorbitol	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arabinose	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Raffinose	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+



Figure 8 : Résultats du test des sucres : T: témoin, S1 : Mannitol, S2 : Saccharose, S3 : Levulose , S4 :Rhamnose ,S5:Galactose, S6:Xylose, S7: Esculine, S8:Sorbitol, S9: Arabinose,S10:Maltose, S11:Fructose,S12:Lactose,S13: Glucose et S14: Raffinose.

A : Le profil fermentaire des sucres de la souche Ab8 (Lb.Paracasei subsp Paracasei)

B : Le profil fermentaire des sucres de la souche Aa3 (Lb.Plantarum)

Tableau 14 : Résultats d'identification des genres et espèces après comparaison avec des tableaux référentiels (BjörKroth et Holzapfel, 2006 ; Hammes et Hertel ,2006).

Souches	L'identification du genre et espèces
Aa1	<i>Lactobacillus intestinalis</i>
Aa1'	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
Aa2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
Aa3	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Ab2	<i>Lactobacillus casei</i>
Ab3	<i>Lactobacillus casei</i>
Ab5	<i>Lactobacillus casei</i>
Ab6	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp <i>delbrueckii</i>
Ab7	<i>Lactobacillus casei</i>
Ab8	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp <i>paracasei</i>
Ab9	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Bb1	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Bb2	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Bb3	<i>Lactobacillus intestinalis</i>
Bb4	<i>Lactobacillus intestinalis</i>
Bb5	<i>Lactobacillus intestinalis</i>
Cb1	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
Cb1'	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp <i>delbrueckii</i>
Cb2	<i>Lactobacillus johnsonii</i>

4. Etude technologique :

4.1 Cinétique d'acidification et mesure de croissance :

4.1.1 Cinétique d'acidification sur milieu pure (lait) :

La production de l'acide lactique a été suivie en fonction du temps en utilisant les cultures pures de souches sélectionnées. Cette activité acidifiante est souvent utilisée dans le choix des souches pour l'industrie laitière (Desmazeaud, 1996).

La croissance des bactéries lactiques se traduit par la production d'acides lactiques, ce métabolite a une grande importance puisque d'une part, il provoque la coagulation du lait en raison de la chute du pH et d'autre part il a un pouvoir d'inhibition.

L'évaluation de l'activité produite par les souches est réalisée par titrimétrie en mesurant la quantité d'acide lactique (l'acidité est exprimé en degré dornic °D) et par pH-mètre en mesurant le pH en fonction du temps.

Les résultats sont présentés sous forme de graphes (Figure 9) et les valeurs du pH ainsi que la quantité d'acide lactique produite sont présentés dans le Tableau 15.

La décroissance du pH du lait est due à la production d'acide lactique à partir de la fermentation du lactose (Thomson *et al.*, 1994).

Selon le pouvoir acidifiant des souches, sont répartis en trois groupes :

Groupe 1 : souches faiblement acidifiantes : Ab8, Ba9, Bb1, Bb2, Ab6 et Cb1'.

Groupe 2 : souches moyennement acidifiantes : Ab2, Ab3, Ab5, Ab7, Aa1, Bb3, Bb4 et Bb5.

Groupe 3 : souches fortement acidifiante : Cb1, Cb2', Aa3, Aa1' et Aa2.

Le choix des souches aléatoirement (une souche de chaque groupe) été étudié pour leur aptitude technologique. Du premier groupe on a pris la souche Ab8 (faiblement acidifiante), du deuxième groupe on a pris la souche Ab2 (moyennement acidifiante) et du troisième groupe on a pris la souche Cb1 (fortement acidifiante).

Au temps 0 heure le pH initial du lait écrémé est de 5,8 à 6,25 pour les souches testées, ce pH diminue en fonction du temps pour arriver à 3,8 jusqu'à 5,1. Pour l'acidité nous avons noté qu'au 0 heure, la quantité d'acide lactique mesurée est de 11 à 19 °D pour les souches testées.

L'acidité augmente en fonction du temps d'une façon variable, pour arriver après 24 heures jusqu'à 62 °D chez la souche fortement acidifiante (Cb1) et jusqu'à 35 °D chez la souche faiblement acidifiante Ab8.

Nos observations ont porté également sur le temps de coagulation, les souches fortement acidifiantes ont coagulé le lait avant 18 heures, les souches moyennement

acidifiantes ont coagulé le lait après 18 heures et les souches faiblement acidifiantes ont coagulé le lait après 24h d'incubation. La production d'acide lactique est suivie par l'abaissement du pH (Bourgeois *et al.* , 1996).

Les résultats obtenus sont exprimés par des courbes que démontrent les figures (9et 10) et les calculs des paramètres des cinétiques de croissance et d'acidification sont résumés dans les Tableaux (15, 16 et 17).

En milieu lait, l'acidité produite par *lactobacillus johnsonii* (Cb1) est de 25°D après 2 heures, 31°D après 4 heures, 39°D après 6heures de culture, la production a augmenté pour atteindre 62°D après 24 heures de culture, par contre le pH a diminué après chaque 2 heures d'incubation, il est de 5,7 après 2 heures, 5,3 après 4heures, 4,8 après 6heures et 3,8 après 24 heures.

Alors que pour *lactobacillus casei* (Ab2), produit une quantité d'acide lactique de 17°D après 2 heures, 21°D après 4 heures, 27°D après 6 heures et 42°D après 24 heures d'incubation, le pH est de 5,98 après 2heures, 5,78 après 4 heures, 5,52 après 6 heures et 4,9 après 24 heures. Et pour *lactobacillus paracasei subsp paracasei* (Ab8), l'acidité produite est de 14°D après 2 heures, 18°D après 4 heures, 23°D après 6 heures et 35°D après 24 heures de culture, et le pH est de 6,01après 2 heures, 5,9 après 4 heures, 5,76 après 6 heures et 5,1 après 24 heures. *Lactobacillus paracasei subsp paracasei* étudié par Mami, (2007) a produit une quantité d'acide lactique de 43,5°D après 24 heures et le pH est de 5,8 après 9 heures et 4,7 après 24 heures d'incubation, ces résultats sont proches de nos souches. Le suivi du pH montre une diminution progressive pour toutes les souches isolées, la souche la plus performante est la souche Cb1 avec un pH de 3,8 et une quantité d'acide lactique de 62°D après 24 heures d'incubation.

- Interprétation des graphes :

Les trois souches testées présentent des courbes de cinétique d'acidification dans la figure 9 et 10. Au cours des deux premières heures, aucune différence n'a été remarquée mais après 3 heures les trois souches (Cb1, Ab2 et Ab8) ont continuent de produire approximativement la même augmentation de l'acide lactique en fonction du temps qui produisent une quantité d'acide lactique variant de 11 à 62°D et les valeurs du pH diminuent en fonction du temps variant de 6,25 à 3,8. L'acidité finale produite par les souches Cb1, Ab2 et Ab8 varie respectivement de 62, 42 et 35°D après 24 heures d'incubation. Le facteur le plus utilisé dans la variation de la cinétique d'acidification, est l'aptitude des souches a possédé une activité protéolytique, qui est codé par un matériel extra chromosomique qui est le plasmide (Juillard et Richard ,1994).

Tableau 15 : La variation du pH et la production de l’acide lactique (°D) des 3 souches :

13	0h			2h			4h			6h			8h			18h			24h		
Tests Souches	pH	QAL	°D	pH	QAL	°D	PH	QAL	°D	PH	QAL	°D	PH	QAL	°D	PH	QAL	°D	pH	QAL	°D
Cb1	5,8	1,9	19	5,7	2,5	25	5,3	3,1	31	4,8	3,9	39	4,5	4,2	42	4,1	5,1	51	3,8	6,2	62
Ab2	6,25	1,3	13	5,98	1,7	17	5,78	2,1	21	5,52	2,7	27	5,1	3,4	34	5	3,8	38	4,9	4,2	42
Ab8	6,2	1,1	11	6,01	1,4	14	5,9	1,8	18	5,76	2,3	23	5,58	2,9	29	5,3	3,2	32	5,1	3,5	35

QAL : Quantité de l’acide lactique en g/l

°D : Degré dornic

]

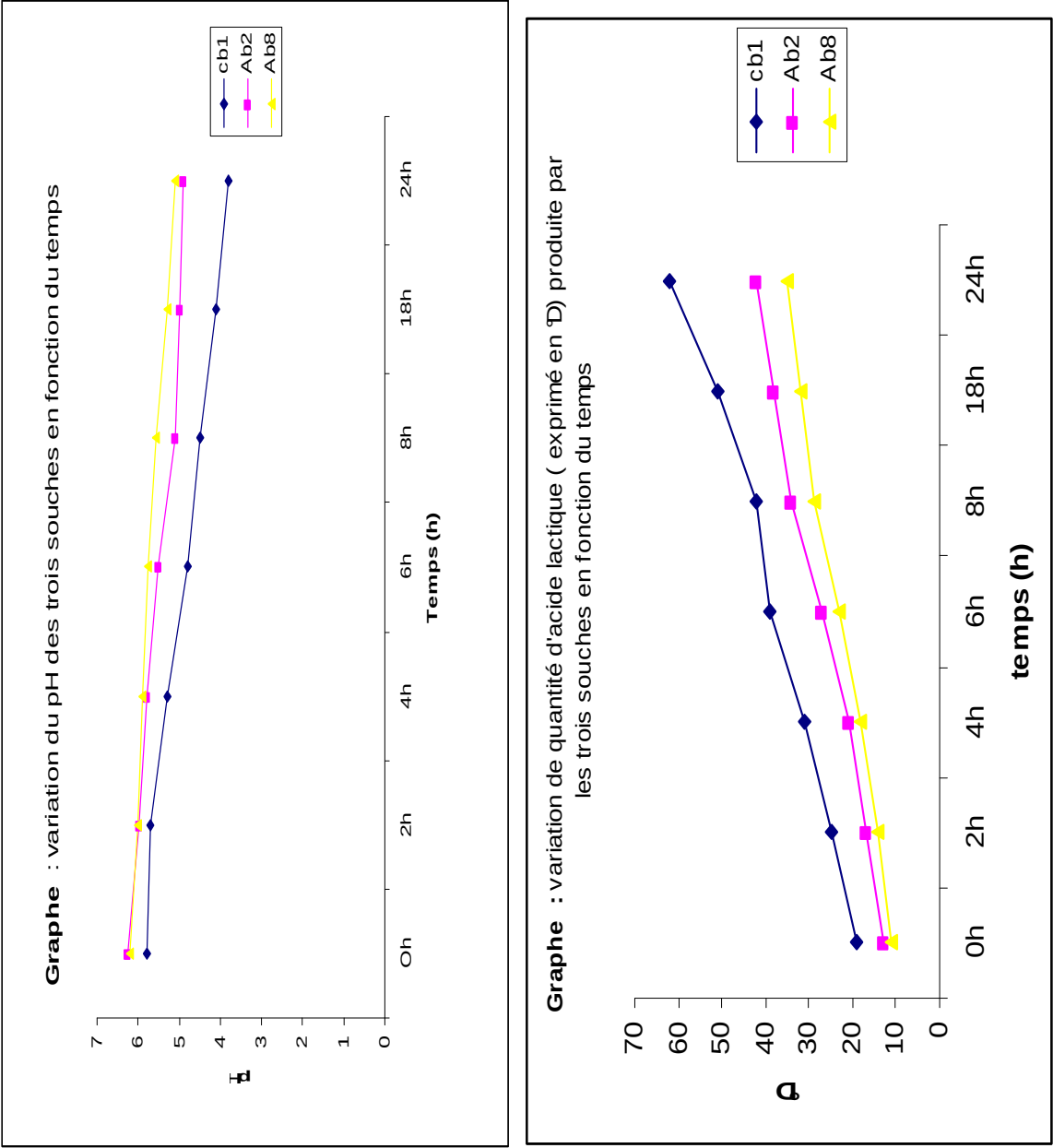


Figure 9 : Variations du pH et de quantité d'acide lactique (exprimé en °D) produite par les trois souches En fonction du temps.

4.1.2 Cinétique de croissance :

Pour mesurer la croissance bactérienne en parallèle avec la cinétique d'acidification, on utilise la méthode de numération sur milieux solides, après le dénombrement les résultats obtenus ont été notés dans le Tableau 16.

Pour la mesure de la croissance des souches lactiques (Cb1, Ab2 et Ab8) dans un milieu MRS solide, la croissance bactérienne de la souche Cb1 est de $3,8.10^8$ après 2 heures et 25.10^8 après 8 heures d'incubation, puis a augmenté pour atteindre 31.10^8 ufc/ml après 24 heures.

Pour la souche Ab2, la croissance bactérienne est de $4,5.10^8$ après 2 heures et 19.10^8 après 8 heures et 35.10^8 ufc/ml après 24 heures d'incubation. Alors que pour la souche Ab8, la croissance bactérienne est de $2,7.10^8$ après 2 heures, 6.10^8 après 8 heures et 23.10^8 ufc/ml après 24 heures de culture.

On a réalisé aussi la croissance bactérienne exprimé par $\log (\text{Nombre} \times 10^8)$ en fonction du temps en prenant les résultats du calcul de $\log (\text{Nombre} \times 10^8)$, résumés dans le Tableau 17 et Figure 10.

Tableau 16: Résultats du dénombrement chez les 3 souches.

		Temps (h)						
		0h	2h	4h	6h	8h	18h	24h
Les souches Nbre $\times 10^8$ ufc/ml	Cb1	2,7	3,8	5,6	9,2	25	29	31
	Ab2	3,4	4,5	7	13	19	31	35
	Ab8	2,1	2,7	3,5	4,3	6	18	23

Tableau 17 : Résultats du calcul du log (Nbre× 10⁸)

		Temps (h)						
		0h	2h	4h	6h	8h	18h	24h
Les souches log(Nbre×10 ⁸) ufc/ml	Cb1	8,4	8,5	8,7	8,9	9,3	9,4	9,5
	Ab2	8,5	8,6	8,8	9,1	9,2	9,5	9,5
	Ab8	8,3	8,4	8,5	8,6	8,7	9,2	9,3

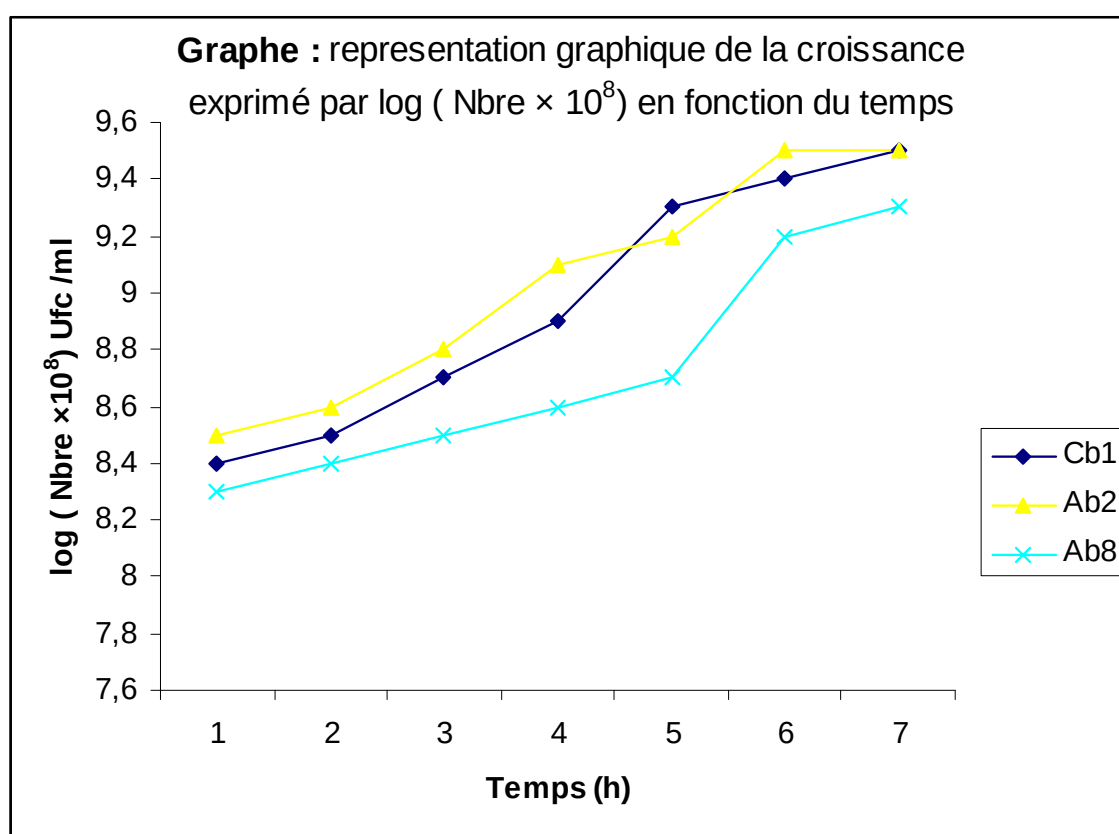


Figure 10 : Représentation graphique de la croissance exprimé par log (Nbre.10⁸) en fonction du temps.

-Interprétation du graphe :

Après étude du graphe, on a remarqué qu'au cours des deux premières heures, aucune différence n'a été remarquée mais après 2 heures, les deux souches (Cb1 et Ab2) se développent rapidement par rapport à la souche Ab8 et continuent à se développer approximativement la même augmentation en fonction du temps, leurs croissances varient de 8,4 à 9,5 ufc/ml. Alors que la souche Ab8 se développe faiblement jusqu'à 8 heures d'incubation mais après 8 heures sa croissance augmente jusqu'à 9,2 ufc/ml après 18 heures et cette croissance continue pour atteindre 9,3 ufc/ml après 24 heures d'incubation. Le développement rapidement des souches Cb1 et Ab2 est dû à leur appartenance respectivement aux souches fortement et moyennement acidifiantes, par contre la souche Ab8 se développe faiblement puisque c'est une souche faiblement acidifiante et nos résultats sont proches à celles obtenus par Guetouache, (2007).

5. Résultats des interactions entre les bactéries lactiques et les bactéries pathogènes :

Après l'étude du pouvoir acidifiant des souches, nous avons étudié d'autres propriétés technologiques de nos souches qui consiste à mettre en évidence les interactions entre les bactéries lactiques et les bactéries pathogènes « *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Escherichia coli* ATCC 25921 », ces dernières sont parmi les germes pathogènes principale impliqués dans les toxi-infections alimentaires (Benhamouche, 2005 ; Guessas ,2007) et au cours de la fabrication des produits fermentés et de leur conservation, ses produits sont toujours exposés à des contaminations par les bactéries indésirables.

5.1 La nature de l'agent inhibiteur :

Les bactéries lactiques sont généralement connus par leur production d'acides organiques dans le milieu, se qui se manifeste par l'apparition de zone claires, la présence d'une inhibition n'est pas dû uniquement à la production d'acide organique, les bactéries lactiques produisent une variété de composés antimicrobiens, tels que le peroxyde d'hydrogène, les phages lysogènes, le diacétyle et les bactériocines (Castano *et al.*, 2005).

L'intérêt de ces bactéries pourra donc être pris en considération pour l'élaboration de ferments possédant la capacité d'améliorer la qualité sanitaire de produits laitiers. (Bredholt *et al.*, 2001 et Brillet *et al.*, 2005).

Les tests d'interactions entre les bactéries lactiques isolées dans la 1^{ère} partie de notre travail et les bactéries pathogènes, nous ont permis de conclure que toutes les souches lactiques présentent des zones claires, leurs diamètres variant de 0,4 à 1,2 cm (zones d'inhibitions). (Figures 11 et 12) et le diamètre d'inhibition varie selon les espèces. Pour s'assurer de la nature exacte de l'agent inhibiteur, des tests s'avèrent nécessaires, ceci nous permettra de s'assurer et aussi de vérifier si les inhibitions que nous avons obtenues sont dues ou non à l'action de substances antimicrobiennes type bactériocine.

Trois critères sont indispensables pour qu'une substance antimicrobienne soit définie en tant que bactériocine (Klaenhammer, 1988) :

1. La présence d'une partie biologiquement active de nature protéique
2. Un spectre d'activité limitée aux espèces taxonomiquement proches ou occupant la même niche écologique.
3. Un mode d'action bactéricide.

Pour rechercher, si la cause des inhibitions est due à une substance de nature protéique (bactériocine), on a éliminé deux causes d'inhibitions : l'acidification du milieu et la production de phage lysogène.

5.1.1 L'acidification du milieu :

Pour minimiser la production d'acides, qui peuvent être une cause principale d'inhibition des souches pathogènes et pour maintenir le pH constant, nous avons utilisé un milieu tamponné à pH 7, avec un tampon phosphate pour exclure l'effet de l'acidité (Sambrook et al., 1986), qui présente un pouvoir antimicrobien.

L'évaluation des résultats obtenus avec le milieu normale (non tamponné) et le milieu tamponné à pH 7, nous ont permis de déterminer si la production d'acides est un facteur actif des inhibitions observées.

L'inhibition due à la production d'acides lactiques a été mise en évidence par (Budde et al., 2003).

Selon Ammor et al, 2005 une bonne acidification lactique provoque l'inhibition des germes pathogènes et plus particulièrement les espèces de *Staphylococcus aureus*.

Les résultats obtenus ont montré que les souches inhibitrices observées en milieu non tamponné étaient plus importantes que celles observées en milieu tamponné, ces résultats sont comparables à ceux trouvés par Mami, (2007).

5.1.2 La production de phage lysogène :

Ce test a été réalisé pour éliminer la supposition d'une inhibition causée par les phages bactériens puisque les phages peuvent être l'origine des inhibitions dans la croissance bactérienne. (Davies et Gasson, 1980).

Le résultat du test des phages s'est révélé négatif pour l'ensemble des souches, aucune phage de lyse n'est apparue après incubation, donc les inhibitions ne sont pas causées par les phages bactériens.

5.1.3 La sensibilité de la substance inhibitrice à l'action des enzymes et sa résistance à la température :

Selon Jack *et al.*, 1995 : « les bactériocines sont des molécules de nature protéique, synthétisées par la voie ribosomique, sécrétées dans le milieu extracellulaire et douée d'une activité bactéricide dirigée essentiellement contre des espèces taxonomiquement proche de l'organisme producteur ».

Comme les bactériocines sont de nature protéique, les réponses obtenues après l'action des enzymes protéolytiques (Trypsine et α -chymotrypsine) nous permettra d'identifier les substances antibactériennes comme étant des bactériocines, si l'halo d'inhibition disparaît en présence de l'action d'une enzyme protéolytique, l'agent inhibiteur est de nature protéique (Calleweart et De Vuyst, 2000, Aslim *et al.*, 2005).

Le Tableau 21 illustre les résultats obtenues après traitement de la substance inhibitrice issu des souches lactiques par des enzymes protéolytiques (Trypsine et α - chymotrypsine) et par la chaleur.

Les résultats montre l'absence de la zone d'inhibition de la croissance de la souche test *Staphylococcus aureus* en présence de la trypsine et l' α -chymotrypsine et la perte de l'activité antimicrobienne après le traitement thermique donc l'activité antagoniste à 100 °C de ces souches est due à une substance protéique c'est-à-dire une bactériocine, ceci indique la sensibilité des composés actifs sécrétés par toutes les souches mises en culture.

Ces résultats concordent avec ceux qui ont été rapportés par Scheved *et al.*, (1993) au cour de leur recherche sur la nature des agents inhibiteur de types bactériocines. La sensibilité d'une souche dépend du genre, de l'espèce et même de la sous-espèce, ces variations de sensibilité sont dues aux caractérisations des souches (présence ou absence de sites récepteurs) et donc au niveaux de lésions occasionnées par le facteur inhibiteur (kalchayanand *et al.*, 1992).

5.2 L'action des lactobacilles sur la croissance de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* sur milieu solide :

Les résultats obtenus dans l'interaction entre les souches lactiques et les bactéries pathogènes dans le milieu tamponné montrent une inhibition variante d'une espèce à une autre, les souches test utilisées dans l'interaction à Gram positive *Staphylococcus aureus* et à Gram négatif *Escherichia coli* comme souches pathogènes (Tableau 20).

On a remarqué que le diamètre des zones d'inhibitions diffère selon les espèces, et les souches Cb1 et Cb2 (*Lactobacillus johnsonii*) et Ab8 (*Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei*) ont donné des inhibitions considérables vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*, ces résultats de conforment avec ceux de Hamedi et Mostefaoui (2007).

Cette inhibition est due à une substance inhibitrice sachant que l'expérience a été conduite en milieu tamponné afin d'écarter l'effet d'acidité due à la production d'acide lactique, les tests supplémentaires réalisés : test des phages, l'effet des enzymes protéolytiques et du traitement thermique confirme la nature de cette substance ainsi l'inhibition est due à une bactériocine.

Les autres souches ont aussi donné des inhibitions vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* à différents diamètres de zone d'inhibition mais inférieur à 0,8 cm à celles des souches Cb1, Cb2 et Ab8.

D'après les travaux de Prioult (2003) et Rousseau (2004), les souches *Lactobacillus casei* (Ab2, Ab3, Ab5 et Ab7) sont connus pour leurs effets bénéfiques sur la santé tels que la stimulation du système immunitaire et beaucoup d'autres et malgré cela on néglige pas leurs effets inhibiteurs, seulement il est moins important.

On a remarqué que la souche Ab8 (*Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei*) a présenté un diamètre de 0,9 cm avec *Escherichia coli* et 1 cm avec *Staphylococcus aureus*.

La souche Cb1 (*Lactobacillus johnsonii*) a présenté un diamètre de 0,9 cm avec *Escherichia coli* et 1 cm avec *Staphylococcus aureus*.

La souche Cb2 (*Lactobacillus johnsonii*) a présenté un diamètre de 0,8 cm avec *Escherichia coli* et 1 cm avec *Staphylococcus aureus*.

Pour les autres souches Aa1, Bb3, Bb4, Bb5, Aa1', Aa2, Aa3, Ab2, Ab3, Ab5, Ab7, Ab6, Cb1', Ba9, Bb1 et Bb2 ont présenté un diamètre qui varie entre 0,4 et 0,7 cm avec *Escherichia coli* et entre 0,4 et 0,8 cm avec *Staphylococcus aureus*.

Les résultats se conforment avec ceux réalisés par Ananou *et al.*, (2005) et Guessas, (2007) montrant que les bactéries lactiques possèdent une activité antimicrobienne contre des espèces taxonomiquement proches de ces bactéries productrices de bactériocines.

Ryan *et al.*, (1996) a décrit que la production de bactériocines et l'acidité étaient toutes les deux importantes en production fromagères.

Pour remplacer les conservateurs qui sont composés de produits chimiques, les bactéries lactiques productrices de substances inhibitrices sont mieux utilisées pour préserver les aliments, et la réduction des cas des intoxications alimentaires due aux germes nuisibles peut se réaliser par l'exploitation des potentialités de bactéries lactiques capable de produire des substances diverses dotées d'une activité antimicrobienne.

Tableau 18 : Résultats du traitement thermique et enzymatique et enzymatique :

Souches	Traitement thermique	α -chymotrypsine	Trypsine
Aa1	-	-	-
Aa1'	-	-	-
Aa2	-	-	-
Aa3	-	-	-
Ab2	-	-	-
Ab3	-	-	-
Ab5	-	-	-
Ab6	-	-	-
Ab7	-	-	-
Ab8	-	-	-
Ab9	-	-	-
Bb1	-	-	-
Bb2	-	-	-
Bb3	-	-	-
Bb4	-	-	-
Bb5	-	-	-
Cb1	-	-	-
Cb1'	-	-	-
Cb2'	-	-	-

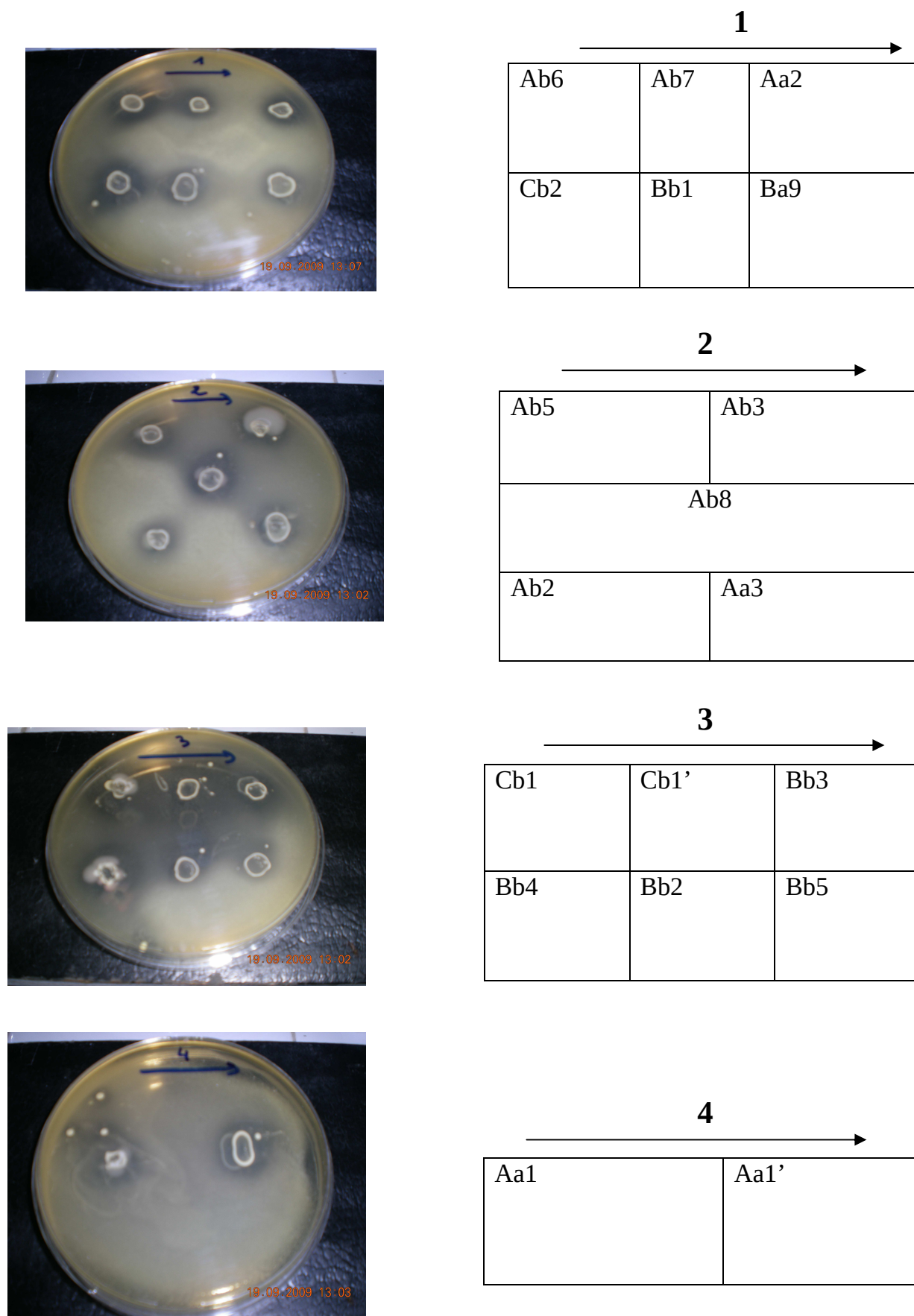
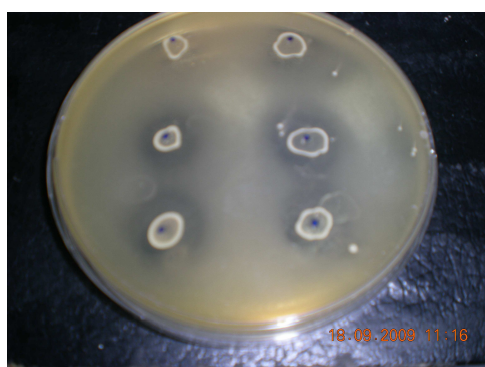


Figure 11 : Résultats des interactions des bactéries lactiques avec *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.



5

Aa3	Ab2
Ab7	Ab5
Ab3	Ab6



6

Ba9	Ab8	
Bb1	Bb2	Aa2



7

Bb3	Bb4
Bb5	Cb1'



8

Cb2'	Aa1
Cb1	Aa1'

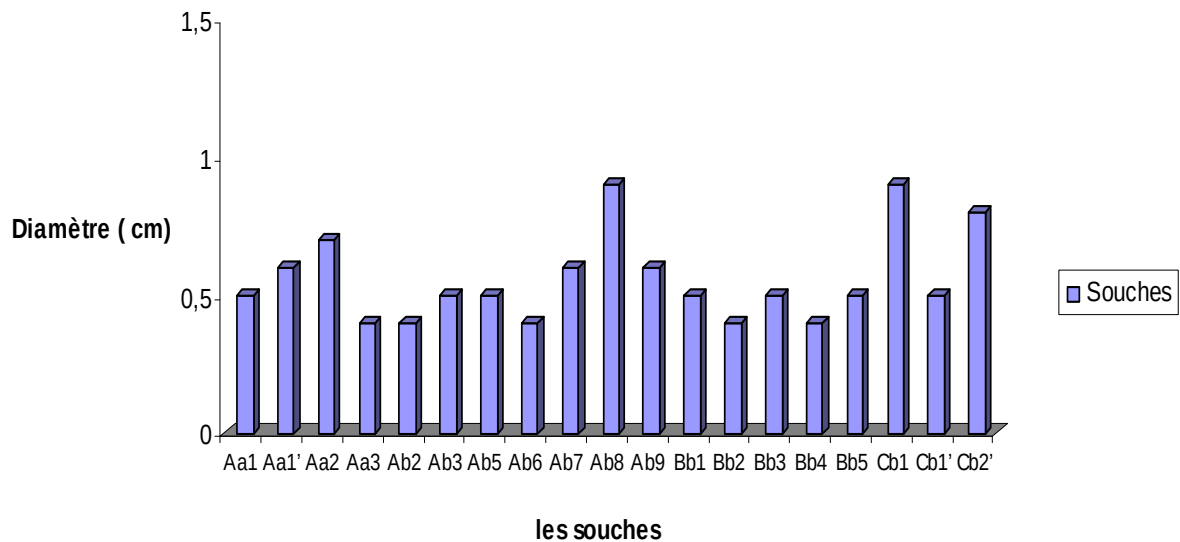
Figure 12 : Résultats des interactions des bactéries lactiques avec *Escherichia coli* ATCC 25921.

Tableau 19 : Résultats des zones d'inhibitions des bactéries lactiques avec les bactéries pathogènes.

	Øcm	
Souches	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Aa1	0,5	0,4
Aa1'	0,6	0,5
Aa2	0,7	0,6
Aa3	0,4	0,5
Ab2	0,4	0,5
Ab3	0,5	0,6
Ab5	0,5	0,7
Ab6	0,4	0,6
Ab7	0,6	0,7
Ab8	0,9	1
Ab9	0,6	0,7
Bb1	0,5	0,8
Bb2	0,4	0,6
Bb3	0,5	0,7
Bb4	0,4	0,6
Bb5	0,5	0,4
Cb1	0,9	1,2
Cb1'	0,5	0,7
Cb2'	0,8	1

Ø : Diamètre de la zone d'inhibition en cm

Graphe : Diamètres des zones d'inhibitions (en cm) des souches de bactéries lactiques avec *Escherichia coli* pour chaque souche



Graphe : Diamètres des zones d'inhibitions (en cm) des souches de bactéries lactiques avec *Staphylococcus aureus* pour chaque souche

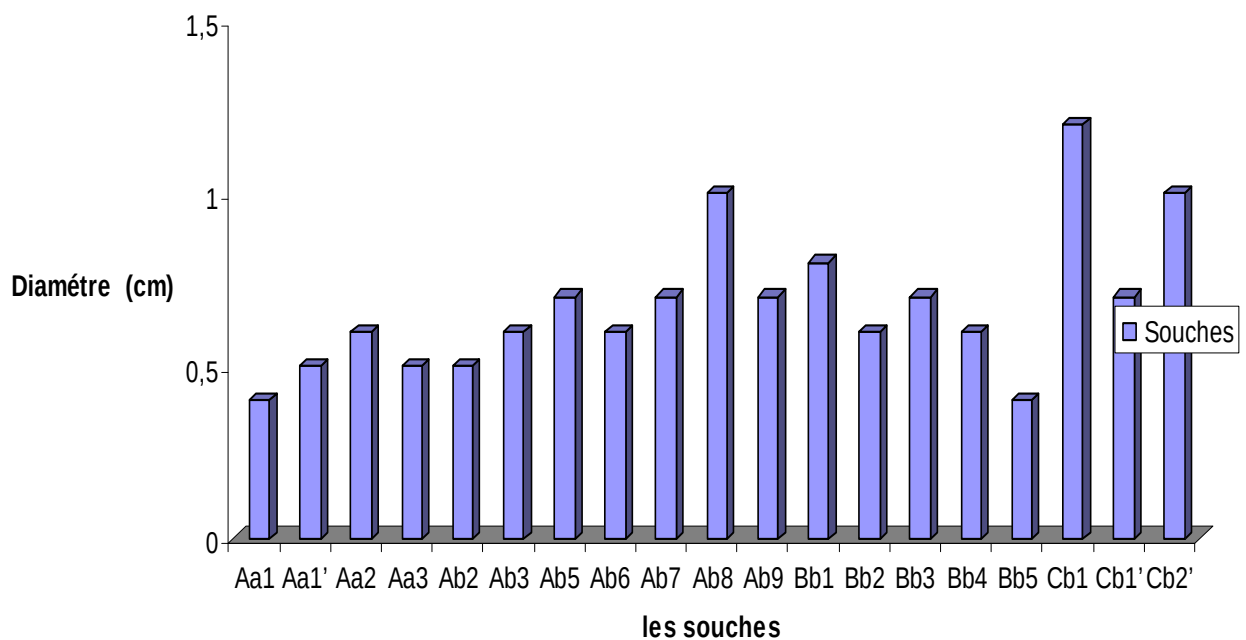


Figure 13 : Diamètre des zones d'inhibitions (en cm) des souches de bactéries lactiques avec *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

Conclusion

Notre étude sur les bactéries lactiques du genre lactobacille du lait cru de chèvre, a permis d'isoler, de caractériser et d'identifier plusieurs espèces de ce genre dont 19 souches, appartenant aux espèces suivantes :

Lactobacillus intestinalis , 4 souches (Aa1, Bb3, Bb4 et Bb5).

Lactobacillus rhamnosus, 2 souches (Aa1', Aa2).

Lactobacillus plantarium, 1 souche (Aa3).

Lactobacillus casei, 4 souches (Ab2, Ab3, Ab5 et Ab7).

Lactobacillus delbrueckii Subsp delbrueckii, 2 souches (Ab6, Cb1').

Lactobacillus paracasei subsp paracasei, 1 souche (Ab8).

Lactobacillus acidophilus, 3 souches (Ba9, Bb1 et Bb2).

Lactobacillus johnsonii, 2 souches (Cb1 et Cb2).

L'identification des espèces nécessite au moins une quinzaine de sucres pour qu'on puisse donner une systématique des bactéries lactiques qui progressent et changent continuellement (Leisner *et al.*, 2000) et ce travail nous a permis d'étudier leur aptitudes technologiques tell que le pouvoir acidifiant et la production de substances antimicrobiennes (qui sont de nature protéique).

L'action et la nature de ces substances sont des caractéristiques de bactériocines qui ont un pouvoir inhibant envers deux bactéries pathogènes *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* qui sont responsable de toxi-infections.

Les lactobacilles possèdent des propriétés technologiques remarquables, elles se développent dans le lait avec une croissance rapide qui est due surtout à la présence des enzymes protéolytique, ces enzymes extracellulaire sont capable d'hydrolyser les caséines du lait et fournir les acides aminés essentiels à leurs croissance.

Toutes les souches de lactobacilles retenus isolés du lait cru de chèvre ont montré une activité antimicrobienne, leur diamètre variant de 0,4cm à 1,2 cm vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, et *Escherichia coli* sur milieu solide. On a remarqué que les bactériocines produites par les lactobacilles appartenant aux espèces *Lb. johnsonii* (Cb1 et Cb2) et *Lb paracasei subsp paracasei* (Ab8) ont donné des inhibitions importantes vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.

L'intérêt de la recherche sur les bactéries lactiques est de développer une stratégie permettant de contrôler et de limiter la croissance des germes indésirables.

L'étude de la production d'acide lactique par rapport au pH a permis de diviser nos souches en celles à fermentation rapide (Cb1, Cb2', Aa3, Aa1' et Aa2) et lente (Ab8, Ba9, Bb1, Bb2, Ab6 et Cb1').

Après des années de recherches scientifiques, le pouvoir acidifiant commence à être utilisé dans la bio conservation des aliments : "Les bactéries lactiques forment un groupe hétérogène composé de coques et de bacilles, dont la principale caractéristique est la production d'acide lactique à partir de la fermentation des sucres. Leur utilisation est apparue depuis des millénaires, dans la fabrication des aliments comme les fromages, les charcuteries, les boissons fermentées, le pain au levain, les sauces, les saumures, les légumes fermentés, les ensilages etc. Elles permettent, de part leur métabolisme, d'augmenter la durée de conservation d'origine des denrées et leur confèrent une saveur et une texture différente" (Badis *et al.*, 2005).

Dans le domaine thérapeutique, l'utilisation de ces bactéries autant que probiotique est en progrès surtout dans l'agroalimentaire et qui ont des effets bénéfiques sur la santé, tels que la stimulation du système immunitaire, la réduction du cholestérol et la prévention contre les infections urogénitale (Hekmat *et al.*, 2009).

Ces résultats préliminaires ouvrent des perspectives peuvent compléter ce travail en étudiant des performances technologiques de ces souches (production d'acétoïne, d'acide lactique) en culture mixte. Et d'autres perspectives intéressantes sur l'étude de la substance inhibitrice en l'isolant, là purifiant et en l'identifiant avec plus de précision (Biologie moléculaire, PCR, RADP etc...) afin d'orienter son exploitation dans la bio préservation des produits alimentaires.

Références bibliographiques

Bibliographie

- Aasen. I.M, Moreto. T, Katla. T, Axelsson. L et Storro. I, (2000):** Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocins production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 53:159-166.
- Adams. M.R et Marteau. P, (1995):** On the safety of lactic acids bacteria from food, *Int. J. Food. Microbial*, 27: 263-264.
- Adams. M.R, et Hall. C.J, (1988):** Growth inhibition of food borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. *Int. J. Food Sci. Technol*, 23: 287-292.
- Ammor. S, Tauveron. G, Dufour. E et Chevallier. I, (2005):** Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility –Screening and characterization of the antibacterial compounds, *Food control. Elsevier*, 1: 2-6.
- Ananou. S, Maqueda. M, Martinez-Bueno. M, Gálvez. A et Valdivia. E, (2005) :** Control of *Staphylococcus aureus* in sausages by enterocin AS-48. *Meat Science*, 71: 549-556.
- Anastasiadou. S, Papagianni. M, Ambrosiadis. I et Koidis. P, (2008) :** Rapid quantifiable assessment of nutritional parameters influencing pediocin production by *Pediococcus acidilactici* NRRL B5627. *Bioresource. Technol*, 99 (14): 6646-6650.
- Anderssen. E.L, Diep. B.D, Nes. I.F, Eijsink. V.G.H, et Nissen-Meyer. J, (1998):** Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A. *Appl. Environ. Microbiol*, 64: 2269-2272.
- AnGR, (2003) :** Animals Genetics Ressources, Rapport National sur les Ressources Génétiques Animales. (Algérie/Commission Nationale).
- Anonyme, (2000 a) :** Statistiques Agricoles, 1990-1999. Série B, superficies et production. ONS (Office National des Statistiques), Alger. Algérie.
- Anonyme, (2000 b) :** Note de conjoncture sur les performances zootechniques des élevages bovins laitiers en Algérie 1999-2000. Institut Technique des élevages (ITELV), Alger. Algérie.
- Arous. S, Dalet. K et Héchard. Y, (2004) :** Involvement of the mpo operon in resistance to class IIa bacteriocins in *L. monocytogenes*. *FEMS. Microbiol. Lett*, 238: 37-41.

- Aslim. B, Yuksekdağ. Z.N, Sarikaya. E et Beyatli. Y, (2005) :** Determination of the bacteriocin-like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products. *LWT*, 38: 691-694.
- Axelsson. L.T, (1998) :** Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial. Ecol. Health Dis*, 2 : 131-136.
- Badis. A, Laouabdia-Sellami. N, Guetarni. D, Kihal. M, Ouzrout. R, (2005):** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales « Arabia et Kabile ». *in0 scien. Tech*, 23 :30-37.
- Baird-Parker. A.C, (1980):** Organic acids. *In J. H. Silliker* (Ed.), *Microbial ecology of foods* (pp: 126-135). New York: Academic press.
- Balows. A, Truper. H.G, Dworkin. M, Harder. W et Schleifer. K.H, (1992):** The prokaryotes and Ed-vol.11, Springer Verlage, New York.
- Balows. A, Truper. H.G, Workin. D, Harder. M et Schleifer. K.H, (1992):** The prokaryotes and Ed. Vol.11, Springer Verlage, New York.
- Bauer. R et Dicks. L.M.T, (2005):** Mode of action of lipid II-targeting antibiotics. *Int. J. Food. Microbiol*, 101 : 201-216.
- Benhamouche. N, (2005) :** Sélection de bactéries lactiques productrices de substances antimicrobiennes de la collection du laboratoire de microbiologie appliquée (LMA). Thèse de Magister. Université d'Oran Es-Senia.
- Berche. P, Gaillard. J.L et Simonet. M, (1989):** Bactériologie, les bactéries des infections humaines. Flamario medicine-France, 230-245.
- Bergey's Manual, (1986-1989):** Manual of determinative bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Berodier. A, (2005) :** Quelles sont les évolutions de la flore microbienne dans les laits et les fromages. 6p.
- Berry. E.D, Liewen. M.B, Mandigo. R.M et Hutkins. R.W, (1990):** Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bacteriocin-producing *Pediococcus* during manufacture of fermented semi- dry sausage. *J. Food Protect*, 53: 194-197.
- Bitton. G, (1999):** Wastewater Microbiology. John Wiley and Sons, 578p.
- Bjorkroth. J et Holzapfel. W, (2006) :** Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. chapl 1.2.9. *In Prokaryotes*, 4: 267-319.
- Bopp. C.A, Brenner. F.W, Wells. J.G et Strockbine. N.A, (1999):** *Escherichia*, *Shigella* and *Salmonella*. *In Murray. PR, EJ. Baron, MA. Pfaller, FC. Tenover et RH. Tenover*,

éditeurs, Manual of clinical microbiology, 7^e édition, American Society for Microbiology Press, pp: 459-474.

Bottazzi. V, (1988): An introduction to redshaped lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70: 303-315.

Bourgeois. C.M et Larpent. J.P, (1996) : Microbiologie Alimentaire, Tome 2, Aliments fermentés et fermentation alimentaires 2eme édition, Technique documentation, 16-22.

Bourgeois. C.M et Larpent. J.P, (1996) : Microbiologie Alimentaire Tome 2. Aliment fermentes et fermentation alimentaires 2eme édition, Technique documentation, 29-31.

Bourgeois. C.M et Leveau. J.Y, (1991) : Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires (le contrôle microbiologique), 2^e édition, revue, Tec Doc, ISSN : 0243-5624, 151-153.

Bouttefroy. A et Millière. J.B, (2000) : Nisin-curvaticin 13 combinations for avoiding the regrowth of bacteriocin resistant cells of *L. monocytogenes* ATCC15313. *Int. J. Food Microbiol*, 62 : 65-75.

Bouziane. T, Elmajdoub. T, Thonart. P.H et Hamdi. M, (2004) : Sélection de bactéries lactiques probiotiques d'origine animale. *Microb. Hyg. Alim*; Vol 16. N°46.

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

Burrow. C.D, Sandine. W.E, Elliker. P.R et Speckman. C, (1970): Characterization of diacetyl negative mutants of *Streptococcus diacetylactis*. *J. Dairy Sci*, 53: 121-125.

Cabo. M.L, Braber. A.F et Koenraad. P.M, (2002): Apparent antifungal activity of several lactic acid bacteria against *Penicillium discolor* is due to acetic acid in the medium. *J. Food. Protection*, 65: 1309-1316.

Callaway. T.R, Anderson. R.C, Edrington. T.S, Elder. T.O, Genovese. K.L, Bischoff. K.M, Poole. T.L, Jung. Y.S, Harvey. R.B et Nisbet. D.J, (2003): Preslaughter intervention strategies to reduce food-born pathogens in food animals. *J. Anim. Sci*, 81: 17-23.

Callewaert. T et De Vuyst. L, (2000) : Bacteriocin production with *L. amylovorus* DCE471 is improved and stabilized by fed-batch fermentation. *Appl. Environ. Microbiol*, 66(2) : 606-613.

Carr. F. J, Chill. D et Maida. N, (2002): The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Rev. Microbiol*, 28: 281-370.

- Castano. S, Desbata. B, Delfour. A, Dumas. J.M, Silva. A et Dufourcq. J, (2005):** Study of structure and orientation of mesentericin Y105, a bacteriocin from Gram-positive *Leuconostoc mesenteroides*, and its Trp-substituted analogues in phospholipid environments. *Bioch. Bioph. Acta*, 1668: 87-98.
- CEAEQ, (2000a) :** Recherche et dénombrement des coliformes totaux; méthode par filtration sur membrane. Centre d'expertise en analyse environnementale, Gouvernement du Québec, 25p.
- Chafai. S, (2006) :** Effet de l'addition des probiotiques dans les régimes alimentaires sur les performances zootechniques du poulet de chair, Mémoire de magister en Sciences Vétérinaires. Université El-hadj-Lakhdar de Batna.
- Chalmers. R.M, Aird. H et Bolton. F.J, (2000) :** Waterborne *Escherichia coli* O 157. *Journal of Applied Microbiology*, 88(supplément): 124S-132S.
- Charchar. N, (2003) :** Les bactériocines. Thèse de D.E.S. Université d'Es-Sénia, Oran.
- Chen. Y.S, Srionnual. S, Onda. T et Yanagida. F, (2007):** Effects of prebiotic oligosaccharides and trehalose on growth and production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Lett. Appl. Microbiol*, 45 : 190-193.
- Cherrington. C.A, Hinton. M, Mead. G.C et Chopra. I, (1991):** Organic acids: chemistry, antibacterial activity and practical applications. *Adv. Microbiol. Phys*, 32: 87-108.
- Choisy. C, Desmazeaud. M, Gueguen. M, Lenoir. J, Schmidt. J.L et Tourneur. C, (1997) :** Les phénomènes microbiens. In : Le fromage, pages 377-446. Ed. Eck A, Gillis JC, Lavoisier Tec & Doc, Paris, France.
- Cintas. L.M, Casaus. P, Holo. H, Hernandez. P.E, Nes. I.F et Havarstein. L.S, (1998) :** Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J. Bacteriol*, 180: 1988-1994.
- Clesceri. L, Greenberg. A.E et Eaton. A.D, (1998):** Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association et Water Environment Federation, 20e édition, pagination multiple.
- Cogan. T.M, (1980) :** Les levains lactiques mésophiles, le lait, 60 : pp : 397-425.
- Cogan. T.M, (2002):** Improving Cheddar cheese flavour by microbiological way. *Int Dairy Congress*, Paris, France, 26 September: 24-27.
- Collins. M.D, Farrow. J.A.F, Phillips. B.A, Ferusu. S et Jones. D, (1987):** Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola* and Some Catalase-Negative, Asporogenous, Rod-Shaped Bacteria from Poultry in a New Genus, *Carnobacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 37: 310-316.

- Collins. M.D, Phillips. B.A et Zaroni. P, (1989 a):** Deoxyribonucleic Acid Homology Studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov., ssp. *paracasei* and ssp. *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 39: 105-108.
- Condon, S, (1987):** Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiol. Rev*, 269-280.
- Conner. D.E, (1993):** Naturally occurring compounds. In. *Antimicrobials in Foods*, 2nd edition. eds. Davidson, P.M. and Branen, A.L. pp: 441-468. Marcel Dekker Inc, New York.
- Crow. V.L et Teromas. T.D, (1982) :** Anginogenic metabolism in lactic streptococci. *J.Bacteriol*, 150: 1024-1034.
- Dalet. K, Briand. C, Cenatiempo. Y et Héchard. Y, (2000) :** The rpoN gene of *Enterococcus faecalis* directs sensitivity to subclass IIa bacteriocins. *Curr. Microbiol*, 41(6) : 441-443. *Environ. Microbiol*, 72(7) : 4761-4766.
- Davidson. B.E, Kordias. N et Dolos. M.A.J, (1996):** Genomic organization of lactic acid bacteria: Antonie Van Leeuwenhoek, 70 (2-4): 161-83.
- Davies. E.A, Bevis. H.E et Delves-Broughton. J, (1997):** The use of the bacteriocin, nisin, as a preservative in ricotta-type cheeses to control the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol*, 24: 343-6.
- De Man. J.C, Rogosa. M et Sharpe. E.M, (1960):** A medium for the cultivation of *Lactobacillus*. *J.Appl. Bacteriol*, 23: 130-135.
- De Roissard. H.B et Luquet. F.M, (1994) :** Taxonomie, métabolisme, croissance et génétique des bactéries lactiques. Vol. Bactéries lactiques (Tome 1), Ed.lorica.France p: 25 : 204.
- De Vuyst. L, Callewaert. R et Crabbé. K, (1996) :** Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *L. amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. *Microbiology*, 142 : 817-827
- Deegan. L.H, Cotter. P.D, Hill. C et Ross. P, (2006):** Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J*, 16: 1058-1071.
- Dellaglio. F, Delassart. I, Tavvani. S, Curk. M.C et Janssens. D, (1995) :** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. *J. Bactéries lactiques aspects fondamentales et technologique*, 1 : 25-114.
- Desmazeaud. M, (1983) :** Comment les bactéries lactiques se comportent-elle dans le lait? *Techn. Lait*, 976 : 11-18.

- Dezmazeaud. (1996) :** Les bactéries lactiques dans l'alimentation humaine : utilisation et innocuité. Cahiers «Agricultures», 5 :5, pp : 331-343.
- Diep. D, Salehian. Z, Holo. H et Nes. I.F, (2007):** Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocin. *Proc. Natl Acad. Sci*, 104 : 2384-2389.
- Drider. D, Bekkal. S et Prévost. H, (2004):** Genetic organization and expression of citrate permease in lactic acid bacteria. *Genet Mol Res*, 3: 273-281.
- Drider. D, (2006):** The continuing story of class IIa bacteriocin. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*, 70(2) : 564-582.
- Earnshaw. R.G, (1992):** The antimicrobial action of lactic acid bacteria: natural food preservation systems. In: *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*. ed. Wood, B.J.B. pp: 211-232. *Elsevier Applied Science*, London and New York.
- Eckner. K.F, (1998):** Comparison of membrane filtration and multiple-tube fermentation by the Colilert and Enterolert methods for detection of waterborne coliform bacteria, *Escherichia coli*, and enterococci used in drinking and water quality monitoring in southern Sweden. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 3079-3083.
- Edberg. S.C, Rice. E.W, Karlin. R.J et Allen. M.J, (2000):** *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 106S-116S.
- Eklund. T, (1984):** The effect of carbon dioxide on bacterial growth and on uptake processes in the bacterial membrane vesicles. *Int. J. Food Microbiol*, 1: 179-185.
- El Soda. M, Madkor. S.A et Tong. P.S, (2000):** Adjunct Cultures: recent developments and potential significance to the cheese industry. *J Dairy Sci*, 83: 609-619.
- El-Nagger. M.Y.M, (2004):** Comparative of probiotic cultures to control the growth of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Biotechnology*, 3 (2) : 173-180.
- Ennahar. S, Sashihara. T, Sonomoto. K et Ishizaki. A, (2000):** Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev*, 24 : 85-106.
- Euzéby. J.P, (2002 a) :** Nomenclature bactérienne. Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire.
- FAO, (1996) :** Bulletin d'information sur les Ressources Génétiques Animales, Les Populations Caprines.
- FAO, (1998 a) :** Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Collection FAO : Alimentation et nutrition n°28. Bibliothèque David Lubin. FAO. Rome Italie.
- FAO, (1998 b) :** Microflore du lait. Collection FAO : Alimentation et nutrition n°28. Bibliothèque David Lubin. FAO. Rome Italie.

- FAO/Who. Expert. Consultation. Group, (2007-2008):** Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Genève: L'organisation; 2007. World Gastroenterology Organisation Practice guide line, Probiotics and Prebiotics, 2008. Site Internet : www.worldgastro-enterology.org/probiotics-prebiotics.html (Date de Lonsultation: Le 25 août 2008).
- Fernandes. I, Gomez. J, Gomez. R, Kalantzopoulos. G, Ledda. A, Medina. M, Rea. M.C et Rodriguez. E, (1997):** Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *J.Dairy.Res*, 64: 409-421.
- Filion et Marie Michèle, (2006) :** Amélioration de la stabilité thermique du lait par modulation du potentiel d'oxydoréduction. Thèse 2006 : 23-497.
- Flambard. B, Richard. J et Juillard. J, (1997):** Interaction between proteolytic strains of *Lactococcus lactis* influenced by different types of proteinase during growth in milk. *Appl Environ Microbiol*, 63: 2131-2135.
- Flambard. B, Richard. J et Juillard. J, (1997):** Interaction between proteolytic strains of *Lactococcus lactis* influenced by different types of proteinase during growth in milk. *Appl Environ Microbiol*, 63: 2131-2135.
- Fleming. H.P, Erchells. J.L et Caslilow. R.N, (1975):** Microbiol inhibition on isolate *Pediococcus* from cucumber bune. *Appl. Environ.Microbiol*, 30 :1040-1042.
- François. M et Luquet, (1986) :** 3 qualités- énergie et tables de composition, lait et produits laitiers vache, Brebis et chèvre. Technique et documentation (Lavoisier) Volume 3, ISSN : 0243-5624, 343-344.
- Freyney. J, Renaud. F, Hensen. W et Bollet. C, (2000):** Précis de bactériologie chimique. Ed. ESKA. 19696p.
- Fuller. R, (1989):** Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66: 365-378.
- Galvez. A, Abriouel. H, Lopez. R.L et Ben Omar. N, (2007):** Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol*, 120(1-2) : 51-70.
- Ganzel. G, Holtzel. M.A, Walter. J, Jung. G et Hammes. W.P, (2000):** Characterization of reutericyclin produced by *Lactobacillus reuteri* LTH 2584. *Appl and Environ. Microbiol*, 4325-4333.
- Garvie. E.I, (1986):** *Genus Leuconostoc* van Tieghem 1878. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M.E. Sharpe, et J.G. Holt (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology* 1071-1075. Baltimore: Williams and Wilkins.

- Gasson. M.J et Davies. F.L, (1984) :** The genetics of dairy lactic acid bacteria. In: *Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and fermented Milk*, F.L., Davies, B.A., Law. Ed., Ch. 4, 99-126, *Elsevier Applied Science Publ*, London.
- Gill. A.O et Halley. R.A, (2003):** Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24°C. *Int. J. Food Microbiol*, 80: 251-259.
- Gilliand. S, Oklahoma State Université. USA, (2001):** Technological and commercial applications of lactic acid bacteria, health and nutritional benefits in dairy products . FAO / WHO Expert consultation Evaluation of health and nutritional properties of powder milk with live lactic acid bacteria.
- Gilliland. S.E, (1985):** Concentrated starter culture. In: *Bacterial starter cultures for foods*, pages 145-157. Ed. Gilliland SE, CRC Press, Inc. Boca Raton USA.
- Goto. S.H, Takahashi. S, Kawasaki. B, Kimura. T, Fujii. M, Nakatsujii. I, Watanabe, (2004):** Detection of *Leuconostoc* strains at a meat processing plant using polymerase chain reactin. *Shokuhin Eise igaku Zasshi*. Feb, 45 (1): 25-8.
- Gould. G.W, (1991):** Antimicrobial compound. In: *Biotechnology and Food Ingredients*. eds. Goldberg, I. and Williams, R. pp. 461-483. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Grajek. W, Olejnik. A et Sip. A, (2005):** Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional foods. *ACTA Biochimica. Polonica*. Vol. 52, N°3: 665-671.
- Gravesen. A, Ramnath. M, Rechinger. K.B, Andersen. N, Jansch. L, Hechard. Y, Hastings. J.W et Knochel. S, (2002b):** High-level resistance to class IIa bacteriocins is associated with one general mechanism in *Listeria monocytogenes*. *Microbiology*. 148: 2361-9.
- Guerra. N.P et Pastrana. L, (2003):** Influence of pH drop on both nisin and pediocin production by *Lactococcus lactis* and *Pediococcus acidilactici*. *Lett Appl Microbiol*, 37: 51-55.
- Guessas. B, (2007) :** Les particularités métaboliques des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre dans le bio-contrôle de *Staphylococcus aureus*. Thèse de doctorat. Université d'Oran Es-senia.
- Guessas. B, Hadadji. M, Saidi. N et Kihal. M, (2006):** Inhibition of *Staphylococcus aureus* Growth by Lactic Acid Bacteria in Milk. *Dirasat, Agricultural Sci*, 32 (3): 304-312.
- Guetouache. M, (2007) :** Caractérisation des lactobacilles protéolytiques isolées à partir du lait cru de chèvre et détermination de leur aptitude technologique. Mémoire de Magister. Université d'Oran Es-Senia.

- Guinane. C.M, Cotter. P.D, Hill. C et Ross. P, (2005):** A review: microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota of food. *J. Appl. Microbiol*, 98 : 1316-1325.
- Hammedi. A, et Mostefaoui. M, (2007) :** Les interactions Bacteriennes et leur exploitation en Bactériothérapie, Mémoire de fin d'études. D.E.S.
- Hammes. W.P et Hertel. C, (2006):** The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. Chap.1.2.10. In prokaryotes, 4: 320-403.
- Hasen. J.N, (1994):** Nisin as model food preservative. *Crit .Rev. Food Sci .Nutr*, 34: 69-93.
- Hécharde. Y, Pelletier. C, Cenatiempo. Y et Frère. J, (2001) :.** Analysis of sigma (54)-dependent genes in *Enterococcus faecalis*: a mannose PTS permease (EII (Man)) is involved in sensitivity to a bacteriocin, mesentericin Y105. *Microbiology*, 147 : 1575-1580.
- Hekmat. S, Soltani. H et Reid. R, (2009) :** Growth and survival of *Lactobacillus reuteri* RC-14 and *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 in yogurt for use as a functional food . *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10 :293-296.
- Helander. I.M, Von Wright. A et Mattila-Sandholm. T.M, (1997):** Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends. Food. Sci. Technol*, 8(5): 146-50.
- Hermier. J, Lenoir. J et Weber. F, (1993) :** Les groupes microbiens d'intérêt.laitier, 9-49.
- Hossaini Hilali. J, (1995) :** Terre et Vie, Lait de chèvre : Bienfaits nutritionnels et thérapeutiques (53) N°17.
- Huang. L, Forsberg. C.W et Gibbins. L.N, (1986):** Influence of external pH and fermentation products on *Clostridium acetobutylicum* intracellular pH and cellular distribution of fermented products. *Appl. Environ. Microbiol*, 51: 1230-1234.
- Hugenholtz J., 1993.** Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS microbial Rev* 12: 165-178.
- 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. *Curr. Opin. Biotechnol*, 10(5) : 492-497.
- Isaacs. K et Herfarth. H, (2008):** Role of probiotic therapy in IBD. *Inflamm Bowel Dis*, 14(11): 1597-605.
- Jack. R.W, Tagg. G.R et Ray. B, (1995):** Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Microbiol. Rev*, 59: 171-200.

- Jacobsen. T, Budde. B.B et Koch. A.G, (2003):** Application of *Leuconostoc carnosum* for biopreservation of cooked meat products. *J. Appl. Microbiol*, 95: 242-249.
- Jay. M.J, (1982):** Antimicrobial properties of diacetyl. *Appl. Environ. Microbiol*, 44: 525-532.
- Jay. M.J, (1986):** Modern Food Microbiology, Fermented foods And Related Products of Fermentation, 3th ed., Van Nostrand Reinhold Company, New York, 239-255 and 362-406.
- Jay. M.J, (1992):** Modern Microbiology, Van Nostrand Reinhold, 4th ed., New York, 371-409.
- Joffin. J.N et Leyral. G, (1996) :** Microbiologie technique. Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine bordeaux, p : 219-223.
- Joseph Pierre et Guiraud, (2003):** Microbiologie alimentaire. Dunod, Paris, pour la nouvelle présentation. INBN 2100072595, 291-294.
- Juillard. V, Foucaud. C, Flambard. B, Furlan. S, Bellengier. et Richard. J, (1998) :** Interactions entre bacteria mésophiles, rôle des facteurs nutritionnels. *Le Lait*, 78 : 91-97.
- Juillard. V, Furlan. S, Foucaud. C et Richard. J, (1996):** Mixed cultures of proteinase-positive and proteinase-negative strains of *Lactococcus lactis* in milk. *J Dairy Sci*, 79: 964-970.
- Juillard. V et Richard. J, (1994):** Mixed cultures in milk of a proteinase-positive and a proteinase-negative variant of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: influence of initial percentage of proteinase-positive cells on the growth parameters of each strain and on the rate of acidification. *Lait*, 74: 3-12.
- Kalchayanand. N, Hanilin. M.B et Ray. B, (1992):** Sublethal injury makes Gram-negative and resistant Gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins pediocin AcH and nisin. *Lett. Appl. Microbiol*, 15: 239-243.
- Kandler. O et Weiss. N, (1986):** Genus *Latobacillus*. In : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol 2, 9ième ed. Ed. Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG. Williams and Wilkins, Baltimore USA.
- Kandler. O, (1983):** Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49: 209-224.
- Kihal. M, (1996) :** Etude de la production du dioxyde de carbone par *Leuconostoc mesenteroides*, éléments d'application en technologie fromagère type fromage bleu. Thèse de Doctorat d'Etat, Université d'Oran.
- Klaenhammer. T.R, (1988):** Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70 : 337-349.

- Klaenhammer. T.R, (1993):** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS. Microbiol. Rev*, 12(1-3) : 39-85.
- Klein. G, Pack. A, Bonaparte. C et Reuter. G, (1998):** Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food. Microbiol*, 41: 103-125.
- Koike. K, Tobayashi. T.I et Saitoh. M, (1985):** Purification and Characterization of NADH Oxydase from a strain of *Leuconostoc mesenteroides*. *J.Biochem*, 97: 1270-1288.
- Kong. S et Davison. A.J, (1980):** The role of interactions between O₂, H₂, OH and O₂ in free radical damage to biological systems. *Arch. Biochem. Biophys*, 204: 13-29.
- Kulshrestha. D.C et Marth. E.H, (1974):** Inhibition of bacteria by some volatile and non-volatile compounds associated with milk. I. *Escherichia coli*. *J. Milk Food Technol*, 37: 510-516.
- Lansing. M.P, Fohn. P.A et Donald. A.K, (2003) :** Microbiologie 2eme édition française. ISBN : 2-8041-4256-6, ouvrage original: Microbiology, fifth Edition by Prescott. L, Harley. J et Klein. D : 529-530.
- Larpent. J.P, (2000) :** Introduction à la nouvelle classification bactérienne. Les principaux groupes bactériens. Editions *Te et Doc*, 01 : 166-178.
- Leisner. J.J, Vancanneyt. M, Goris. J, Christensen. H et Rusul. G, (2000):** Description of paralactobacillus selangorensis gen. Nov, a new lactic acid bacterium isolated from chili bo, a Malaysian food ingredient. *Intern. J. of system. And Evolut. Microbiol*, 50: 19-24.
- Lima. E.T et Andreatti Filho. R.L, (2005):** Bacteriocins: nomenclature, detection, mechanism of action and potential use in poultry production. *J. Food. Agri. Enviro*, 3 (2): 62-66.
- Lindgren. S.E et Dobrogosz. W.J, (1990):** Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Rev*, 87: 149-164.
- Liu. W et Hansen. J.N, (1993):** The antimicrobial effect of a structural variant of subtilin against outgrowing *Bacillus cereus* T spores and vegetative cells occurs by different mechanisms. *Appl Environ Microbiol*, 59: 648-651.
- Luchansky. J.B et Call. J.E, (2004):** Evaluation of nisin-coated cellulose casings for the control of *L. monocytogenes* inoculated onto the surface of commercially prepared frankfurters. *J. Food Prot*, 67 : 1017-1021.
- Luquet. F.M et Corrieu. G, (2005) :** Bactéries lactiques et probiotiques Tec et Doc Lavoisier.

- Lv. W, Zhang. X, Cong. W, (2005) :** Modelling the production of nisin by *Lactococcus lactis* in fed-batch culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 68 : 322-326.
- Magnusson. J et Schnûrer. J, (2001):** *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Appl. Environ. Microbiol*, 67: 1-5.
- Magnusson. J, Strôm. K, Roos. S, Sjögren. J et Schnûrer. J, (2003) :** Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Let*, 219: 129-135.
- Mami. A, (2007) :** Le biocontrôle de *Staphylococcus aureus* par les bactéries lactiques du genre *Lactobacillus* isolées du lait cru de chèvre. Mémoire de Magister .Université d'Oran Es-senia.
- Manca. De Nadra. M.C, De Ruiz. Holgado. A.A et Olivier. G, (1986) :** Carbamate Kinase of *Lactobacillus buchneri* NCDO110 . Purification and proprieties. *Biotechnol. Appl. Biochem*, 8: 46-52.
- Mansour. M et Milliére. J.B, (2004):** An inhibitory synergistic effect of a nisin monolaurin combination on *Bacillus spp.* Vegetative cells in milk. *Food. Microbial*. 18: 87-94.
- Marteau. P, (2001):** Safety aspects of probiotic products. *Scand. J.Nutr*, 45: 8-12.
- Mataragas. M, Metaxopoulos. J, Galiotou. M et Drosinos. E.H, (2003) :** Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. *Meat Sci*, 64: 265-271.
- Mataragas. M, Metaxopoulos. J, Galiotou. M, et Drosinos. E.H, (2003):** Influence of pH and temperature on bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *L. curvatus* L442. *Meat Sci*, 64 : 265-271.
- Mathot. A.G, Beliard. E et Thuault. D, (1996) :** Propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques. In. Microbiologie alimentaire, aliments et fermentation alimentaire 2^{ème} ed. Bourgeois. C.M ; Laprent. J.P ; technique et documentation Lavoisier, Paris : 432-448.
- Mathot. A.G, Kihal. M, Prenvost. A.I, Diviers. C, (1994):** Sélective énumération of *Leuconostoc* on vancomycine agar média, *Int diary : SCI*, 45-655.
- Matteuzzi. D, Crociani. F, Zani. G et Trovatelli. L.D, (1971) :** *Bifidobacterium suis* n.sp : a new species of the genus *Bifidobacterium* isolated from pig feces. *Zeitschrift für allgemeine Microbiology*, 97 : 459-470.
- Mc Auliffe. O, Hill. C, (2001) :** Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Rev*, 25 : 285-308.

- Messens. W, Verluyten. J, Leroy. F et De Vuyst. L, (2003) :** Modelling growth and bacteriocin production by *L. curvatus* LTH1174 in response to temperature and pH values used for European sausage fermentation processes. *Int. J. Food Microbiol*, 81: 41-52.
- Mills. O.E et Thomas. T.D, (1981):** Nitrogen sources for growth of lactic streptococci in milk New Zealand. *J.Dairy Sci. Technol*, 16: 43-55.
- Monnet. V, Chapot-Chartier. M.P et Gripon. J.C, (1993) :** Les peptidases des lactocoques. *Lait*, P: 97-109.
- Moretro. T, Aasen. I.M, Storro. I et Axelsson. L, (2000):** Production of sakacin P by *L. sakei* in a completely defined medium. *J. Appl. Microbiol*, 88(3) : 536-545.
- Morris. J.G, (1976):** Oxygen and the obligate anaerobe. *J. Appl. Bacteriol*, 40: 229-244.
- Moulay. M, Aggad. H, Benmechernene. Z, Guessas. B, Henni. D.E et Kihal. M, (2006) :** Cultivable Lactic Acid Bacteria Isolated from Algerian Raw Goat's Milk and Their Proteolytic Activity.
- Moulay. M, Aggad. H, Benmechernène. Z, Guessas. B, Henni. D.J et Kihal. M, (2006):** Cultivable Lactic Acid Bacteria Isolated from Algerian Raw Goat's Milk and Their Proteolytic Activity.
- Mowat. A, (2003):** Anatomical basis of the tolerance and immunity to intestinal antigens, *Nature immunol*, 3: 331-341.
- Naghmouchi. K, Kheadr. E, Lacroix. C et Fliss. I, (2007) :** Class I/ Class IIa bacteriocin cross-resistance phenomenon in *L. monocytogenes*. *Food Microbiol*, 24 : 718-727.
- Nel. H.A, Bauer. R, Vandamme. E.J et Dicks. L.M, (2001):** Growth optimization of *Pediococcus damnosus* NCFB1832 and the influence of pH and nutrients on the production of pediocin PD-1. *J. Appl. Microbiol*, 91 : 1131-1138.
- Nes. I.F, Diep. D.B, Havarstein. L.S, Brurberg. M.B, Eijsink. V et Holo. H, (1996):** Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70: 113-28.
- Nilsen. T, Nes. I.F et Holo. H, (2003):** Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG2333. *Appl. Environ. Microbiol*, 69(5) : 2975-2984.
- Novel. G, (1993) :** Les bactéries lactiques. In: *Microbiologie Industrielle, les microorganismes d'intérêt industriel*, Eds. J.Y. Leveau et M. Bouix ; Technique et documentation Lavoisier, Paris. 170-374.
- Ouwehand. A.C, (1998):** Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: Salminen, S. and Von Wright A. (Ed.), *lactic acid bacteria: Microbiology and functional aspects*, 2nd edition (edited by). Marcel Dekker Inc, New York, 139-159.

- Oyetayo. V.O, Adetuyi. F.C et Akinyosoye. F.A, (2003):** Safety and protective effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* used as probiotic agent *in vivo*. *Afr. J. Biotech*, 2: 448-452.
- Parente. E, Ricciardi. A et (1994):** Influence of pH on growth and bacteriocin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 140NWC during batch fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 41: 388-394.
- Papagianni. M, (2003):** Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function and applications. *Biotechnol. Adv*, 21(6) : 465-499.
- Parente. E, Ricciardi. A, (1999):** Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52 : 628-638.
- Patrick. T, (2001):** Les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y a près de 3 milliards d'années, Mini revue, France, 1-2.
- Patrick. T, (2001):** Les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y a près de 3 milliards d'années, Mini revue, France. 1-2.
- Patton. G.C et Van Der- Donk. W.A, (2005):** New developments in lantibiotic biosynthesis and mode of action. *Curr. Opin. Microbiol*, 8 : 543-551.
- Pedone. C.A, Arnaud. C.C, Postaire. E.R et Coll, (2000):** Multicentric study of the effect of milk fermented by *Lactobacillus casei* on the incidence of diarrhoea. *Int J Q in Iract*, 54(9): 568-71.
- Penna. F.J et Coll, (2000) :** Up to date clinical and experimental basis for the use of probiotics . *J. pediatr*, 76 (suppl), 209-217.
- Piard. J.C et Desmazeaud. M, (1991):** Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria:1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait*, 71: 525-541.
- Piard. J.C et Desmazeaud. M, (1992):** Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria: 2. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait*, 71: 525-541.
- Piard. J.C, Muriana. P.M, Desmazeand. M.J, (1992):** Purification and partial characterization of laction 48, à la lanthionine-contaminating bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* ssp.*lactis* CNRZ 481. *Appl.Environ.Microbiol*, 58: 279-284.
- Pit, (2008) :** Pole d'innovation Technologique du CE PROC, n° 22.4P.
- Podolak. P.K, Zayas. J.F, Kastner. C.L et Fung. D.Y.C, (1996):** Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7 on beef by application of organic acids. *J. Food Prot*, 59: 370-373.
- Pongtharangkul. T et Demirci. A, (2006) :** Evaluation of culture medium for nisin production in a repeated-batch biofilm reactor. *Biotechnol. Prog*, 22 : 217-224.

- Priault. G, (2003) :** Effet des probiotiques sur l'induction et le maintien de la tolérance orale à la B-lactoglobuline chez la souris et étude de leurs mécanismes d'action. Thèse Ph.D. Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation. Université Laval, Québec, PQ, Canada.
- Pruitt. K.M, Tenovuo. J, Mansson-Rahemtulla. B, Harrington. P et Baldone. D.C, (1986):** Is thiocyanate peroxidation at equilibrium in vivo? *Biochim. Biophys. Acta*, 870: 385-391.
- Queinnec. H, (2000) :** Soyons moins lait, Terre vivante, ISBN 2904082832.
- Raccach. M, Mc Grath. R et Daftarian. H, (1989):** Antibiosis of some lactic acid bacteria including *Lactobacillus acidophilus* toward *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol*, 9: 25-32.
- Rao. D.R, Reddy. A.V, Pulusani. S.R et Cornwell. P.E, (1984):** Biosynthesis and utilisation of folic acid and vitamin B₁₂ by lactic cultures in skim milk. *J.Dairy Sci*, 67:1169-1174.
- Reiter. B et Oram. J.D, (1962) :** Nutrition studies on cheese starters: I-Vitamine and amino acids, requirement of single strain starters. *Journal. of dairy. research*, 29: pp 63-77.
- Reiter. B et Hårnolv. B.G, (1984):** Lactoperoxidase antibacterial systems: natural occurrence, biological functions and practical applications. *J. Food Prot*, 47: 724-732.
- Renouf. V, (2006) :** Description et caractérisation de la diversité microbienne durant l'élaboration du vin (interactions et équilibre), thèse de doctorat en génie des procédés et de l'environnement. Ecole doctorale : Sciences des procédés.
- Rice. E.W, (1999):** *Escherichia coli*. Dans: American Water Works Association Manual of water supply practices: waterborne pathogens. AWWA. M, 48, pp:75-78.
- Rodgers. S, (2001) :** Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures: a review. *Trends Food Sci. Technol*, 12 : 276-284.
- Rodgers. S, (2003):** Potential applications of protective cultures in cook-chill catering. *Food Control*, 14(1) : 35-42.
- Rodgers. S, (2004):** Novel approaches in controlling safety of cook-chill meals. *Trends Food. Sci. Technol*, 15 : 366-372.
- Rodriguez. E, Calzada. J, Arqués. J.L, Rodriguez. J.M, Nunez. M et Medina. M, (2005) :** Antimicrobial activity of Pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157: H7 in cheese. *Int. J. Dairy*, 15: 51-57.

- Rousseau. V, (2004) :** Evaluation d'oligosaccharides à effet prébiotique vis-à-vis de la microflore vaginale. Thèse de Doctorat en Sciences écologiques, vétérinaires, agronomiques et bioingénieries. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.
- Ryan. M.P, Rea. M.C, Hill. C, Ross. R.P. (1996):** An application in cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147. *Appl. Environ. Microbiol*, 62: 612-9.
- Sahl. H.G, Jack. R.W et Bierbaum. G, (1995):** Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique posttranslational modifications. *Eur J Biochem*, 230: 827-53.
- Saidi, N, Guessas. B, Bensalah. F, Badis. A, Hadadji. M, Henni. D.E, Prevost. H, et Kihal. M, (2002):** Caractérisation des bactéries isolées du lait de chèvre des régions arides. *J. Alg. Arides*, 1 : 1-11.
- Sambrook. J, Fritsh. E.F et Maniatis. T, (1986):** Molecular cloning : a laboratory manual. Cold spring harbor laboratory press, 2nd edition, New York, P.96.
- Samelis. J, Maurogenakis. F et Metaxoponlos. J, (1994):** Caractérisation of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented greek dry salami, *International of food Microbiology*, 23 (1994): 176-196.
- Sanders. M.E, (2000):** Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. *J Nut.*, 130: 384S-390S.
- Sanz. B, Selgas. D, Parejo. I et Ordonez. J.A, (1988) :** Characteristics of *Lactobacillus* isolated from dry fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol*, 6: 199-205.
- Savijoki. K, Ingmer. H, et Varmanen. P, (2006):** Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 71 : 394-406.
- Scanell. A.G.M, Hill. C, Buckley. D.J, Arendt. E.K, (1997):** Determination of the influence of organic acids and nisin on shelf-life and microbiological safety aspects of fresh pork, *J Appl Microbiol*, 83: 407-12.
- Scannell. A.G.M, Hill. C, Buckley. D.J et Arendt. E.K, (1997) :** Determination of the influence of organic acids and nisin on shelf-life and microbiological safety aspects of fresh pork. *J Appl Microbiol*, 83 : 407-12.
- Scardovi. V, (1984):** Genus *bifidobacterium* Oral-Jensen, 1924, 472, p. 1418-1434. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Krieg N.R. and Holt J.G. (eds), Vol. 1 Williams and Wilkins, Baltimore, Md.USA.
- Schleifer. K.H et Ludwig. W, (1995):** Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. *System Appl Microbiol* , 18: 461-467.

- Schnûrer. J et Magnusson. J, (2005):** Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Food. Sci. Technol*, 16: 70-78.
- Schöbitz. R, Suazo. V, Costa. M et Ciampi. L, (2003):** Effects of a bacteriocin-like inhibitory substance from *Carnobacterium piscicola* against human and salmon isolates of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol*, 84 : 237-244.
- Sholeva. Z, Stefanova. S et Chipeva. V, (1998):** Screening of antimicrobial activities among Bulgarian *Lactobacillus* strains. *J. Culture. Collections*, 2: 15-20.
- Siegmund. H.N, Rechinger. K.B et Jakobsen. M, (2000):** Dynamic changes of intracellular pH in individual lactic acid bacterium cells in response to a rapid drop in extracellular pH. *Appl Environ Microbiol*, 66: 2330-2335.
- Slutsker. L.J, Guarner et Griffin. P (1998) :** *Escherichia coli* O157 :H7. Dans :Nelson, AM et CR Horsburg, éditeurs, *pathology of emerging infections 2*. American Society for Microbiology, pp :259-273.
- Slutsker. L.J, Guarner et Griffin. P, (1998):** *Escherichia coli* O157: H7. Dans: Nelson, AM et CR Horsburg, éditeurs, *Pathology of emerging infections 2*. American Society for Microbiology, pp: 259-273.
- Smith. J.L et Palumbo. S.A, (1983) :** Use of starter cultures in meats. *J. Food Prot*, 46: 11, 997-1006.
- Smulders. F.J.M, Barendsen. P, Van Logtestijn. J.G, Mossel. D.A.A et Van Der Marel. G.M, (1986):** Review: Lactic acid: considerations in favor of its acceptance as a meat decontaminant. *J.Food Technol*, 21: 419-436.
- Sneath. P, Mairr. N.S, Sharpe. M.E, Holt. J.G, (1986):** Bergey's of manual of systematic bacteriology. Vol 2, Williams et Wilkins.
- Sneath. P.H.A, (1986):** In Bergey's Mannuel of systematic Bacteriology, Vol .2, P.H.A, Sneath, N.S.Mair, M.E Sharpe and J.G.Holt (eds), Williams, Wilkins, Baltimore.
- Stiles. M.E, (1996):** Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Leeuwenhoek*. 70: 331-345.
- Stiles. M.E et Holzapfel. W, (1997):** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol*, 36(1) : 1-29.
- Tagg. J.R et Mc Given. A.R, (1971):** Assay system for bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol*, 21 : 934.
- Talarico. T.L, Casas. I.A, Chung. T.C et Dobrogosz. W.J, (1988):** Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reutri*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 32: 1854-1858.

- Talarico. T.L, et Dobrogosz. W.J, (1989):** Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri* Antimicrob. Agents Chemother, 33: 674-679.
- Thierry. T, Jean-lauil et Aline. L.F, (2001):** Catabolisme de l'Arginine par *Oenococcus oeni* : aspects énergétique et génétiques laboratoire de Biotechnologie et de Microbiologie Appliquée, Faculté d'œnologie, laits 81140, 8(5) : 498-507.
- Thomas. T.D, (1973):** Agar medium for differentiation of *Streptococcus cremoris* from the other bacteria. *N.Z.J. Dairy. Sci. Tech*, 8:70-71.
- Thompson. J et Gentry-Week. C.H, (1994):** Métabolisme des sucres par des bactéries lactiques. In Derroissart. H. Luquet. F.M.Ed. bactéries lactiques aspect fondamentaux et technologique. Uriage. Loriga, 239-290.
- Todorov. S.D et Dicks. L.M, (2004):** Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ST34BR, a strain isolated from barley beer. *J. Basic Microbiol*, 44 : 305-316.
- Twomey. D, Ryan. M, Meaney. B et Hill. C, (2002):** Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82 : 165-185.
- US EPA, (2000):** Membrane filter method for the simultaneous detection of total coliforms and *Escherichia coli* in drinking water. United States Environmental Protection Agency (document EPA 600-R-00-013).Accessible à: <http://www.epa.gov/nerlcwww/>.
- Vadyvaloo. V, Snoep. J.L, Hasting. J.W et Rautenbach. M, (2004):** Physiological implications of class IIa bacteriocin resistance in *L. monocytogenes* strains. *Microbiology*, 150 : 335-340.
- Valérie. C, Ségolène. D, Marion. B, Micheline. G et Jean Paul. N, (2003) :** Isolation charactenzation and identification of lactobacilli focusing , mainlyon cheeses and other dairy products, *Lait* 83 (2003), Review article, DOI : 10.1051. *Lait* : 2003019. 269.
- Vandamme. P, Pot. B, Gillis. M.N, De Vos. P, Kerslers. K.S, Wings. J, (1996) :** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics, *Microbiol. Rev*, 60: 407-438.
- Venture. M, Vansinderen. D, F.T, Zgerald. G.F et Zink. R, (2004):** Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antonio van Leeu wenhoek*, 86: 205-223.
- Verluyten. J, Leroy. F et De Vuyst. L, (2004):** Influence of complex nutrient source on growth of and curvacin A production by sausage isolated *L. curvatus* LTH 1174. *Appl. Environ. Microbiol*, 70 : 5081-5088.

- Vermeiren. L, Devlieghere. F et Debevere. J, (2004):** Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. *Int. J. Food Microbiol.*, 96(2) : 149-164.
- Wagner. M.K et Moberg. L.J, (1989):** Present and future use of traditional antimicrobials. *Food Technol*, 1: 143-147.
- Wehrmüller. K et Ryffel. S, (2007) :** ALP actuel, Produits au lait de chèvre et alimentation, Fiche technique destinée à la pratique. N°28.
- Werber. G, (2004):** Protecting your health with Probiotics. Global Health Society.
- Wijaya. A, Neudeker. C, Holzapfel. W et Franz. C, (2006):** Influence of bacteriocin-producing *Enterococcus faecalis* BFE 1071 on *Lactobacillus* spp. in the rat gastrointestinal tract. In: *Proceedings of Food Micro, August 2006, University of Bologna, Bologna, Italy*, 124.
- Yu. W, Gillies. K, Kondo. J.K, Broadbent. J.R et Mc Kay. L.L, (1996):** Loss of plasmid-mediated oligopeptide transport system in Lactococci : another reason for slow milk coagulation. *Plasmid*, 35: 145-155.
- Zhennai. Y, (2000):** Antimicrobial compounds and Extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: structures and properties. Academic Dissertation. Department of Food Technology, University of Helsinki, 61p.

Annexe

Annexe

- **Milieu MRS** (De Man Rogosa et Sharp, 1960), Pour l'isolement des bactéries lactiques :

Extrait de levure	5g
Extrait de viande	10g
Peptone	10g
Acétate de sodium	5g
Citrate de sodium	2g
Glucose	20g
KH ₂ PO ₄	2g
Mgso ₄	0,25g
Mnso ₄	0,05g
Agar	15g
Cystéine-HCL	0,5g
Eau distillée q.s.p	1000ml
PH =6,8	

Autoclavage:120°C pendant 20 minutes.

- **Milieu MRS-BCP** (Kihal, 1996) : Utilisé pour l'étude du profil fermentaire, composition en g/l.

Protéose peptone	10g
Extrait de levure	5g
Tween 80	1ml
Citrate de sodium	2g
Acétate de sodium	1g
Sulfate de manganèse	0,05g
Phosphate potassique	2g
Eau distillée	1000 ml
Bromocrésol pourpre	0,05 g/l

- **Milieu MRS tamponé** (De Man Rogosa et Sharp, 1960): pour le test des interactions bactérienne :

Extrait de levure	5g
Extrait de viande	10g
Peptone	10g
Acétate de sodium	5g
Citrate de sodium	2g
Glucose	20g
KH ₂ PO ₄	13,697g
Mgso ₄	0,25g
Mnso ₄	0,05g
NA ₂ HPO ₄	17,814g
Agar	15g
Eau distillée q.s.p	1000 ml
PH=7	

Autoclave : 120°C pendant 20 minutes.

- **Bouillon nutritif** : Pour les cultures jeunes des bactéries pathogènes :

Extrait de viande	1g
Extrait de levure	2g
Peptone	5g
Chlorure de sodium	5g
Eau distillé q.s.p	1000ml
pH=7.4	

Autoclavage : 120°C pendant 20 minutes.

- **Lait écrémé :**

Lait écrémé	10g
Extrait de levure	0,5g
Eau distillée q.s.p	1000ml
pH=7	
Autoclavage : 110 °C pendant 10 mn.	

- **Eau physiologique :** Pour les dilutions :

Chlorure de sodium	8,5g
Peptone	0,5g
Eau distillée q.s.p	1000ml
pH=7	
Autoclavage : 120°C pendant 20 minutes	

- **Milieu Muller Hinton** (Muller et Hinton, 1941) : Pour les tests des interactions et des phages

Infusion de viande de bœuf	300ml
Peptone de caséine	17,5g
Amidon de maïs	1,5g
Agar-agar	17g
pH=7.4	
Autoclavage : 120°C pendant 20 minutes.	

- **Milieu M16 BCP** (Thomas *et al.*, 1973) : Pour le test de l'ADH

Extrait de levure	2,5g
Extrait de viande	5g
Lactose	2g
Biopolytone	5g
Peptone papaïnique de soja	5g
Acide ascorbique	0,5g
Acétate de sodium	1,8g
L-Arginine	4g
Pourpre de bromocrésol	0,05
Agar	10g
Eau distillée qsp	1000ml
pH 6,5,	
Autoclavage 120°C	

- **Tampon phosphate :**

KH ₂ PO ₄	13,697g
Na ₂ HPO ₄	17,814g
Eau distillé q.s.p	1000ml