REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET

DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE D'ORAN ES-SENIA

FACULTE DES SCIENCES DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Mémoire présenté pour l'obtention du diplôme de

Magister en Microbiologie Fondamentale et Appliquée

Option : Contrôle microbiologique et hygiène

Présenté par : **Mr BELLIL Yahia**

Thème :

Evaluation de l'effet des substances antimicrobiennes produites par *Leuconostoc mesenteroides* du lait cru de chamelle sur *Listeria spp.*

Soutenu le Lundi 22 Avril 2013 à 9h00 à la salle des conférences (Bibliothèque IGMO)

Devant la commission de jury composée de :

Président :	**Mr KIHAL Mebrouk.**	**Professeur à l'Université d'Oran**
Examinateur:	**Mr BABA HAMED Mohamed Bey.**	**Professeur à l'Université d'Oran**
Examinateur:	**Mr HADADJI Miloud.**	**Professeur à l'Université d'Oran**
Encadreur :	**Mlle BENMECHERNENE Zineb.**	**Maître de conférence A à l'Université d'Oran**

Année Universitaire : 2012-2013

Dédicaces

A la Mémoire de Maman El Hadja Kheira.

Pour tout l'amour que vous m'avez tous donné.

Vous restez a jamais dans mon cœur.

Vous m'avez donné les moyens pour m'arriver là !

Mais vous êtes parti avant de récolter le fruit.

Je pleure mais je souhaite le résultat vous plaise.

Vous

Qui m'avez tout appris

Et tant donné

C'est dans vos yeux que je grandissais

Et me sentais fier

Vous ne m'avez pas laissé le temps

De vous dire tous ce que je vous aime

Dieu merci de m'avoir donné une mère comme vous

On devrait toujours dire avant

L'importance que les gens prennent

Tant qu'il est encore temps

Vous ne m'avez pas laissé le temps

Je dédie cette thèse à

Mon père, mes frères, mes sœurs, mess neveux et mes nièces qui m'ont toujours soutenu et encouragés durant mes études.

Ma fiancée et ma cher ***Wassila*** *qui a su m'apporter son réconfort et son Amour pendant tout ce travail.*

Mes proches et mes amis Abdou, Ahmed, Zoheir, Aziz, Faiçal, Karim,Djamel, Abdelhak, Mohamed, Omar, Habib, qui se reconnaîtront à travers ce parcours.

Yahia

Remerciements

Je tiens, tout d'abord à remercier mon directeur de laboratoire de Microbiologie Appliquée, Pr. Kihal Mebrouk, de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer ma thèse dans son laboratoire.

Je souhaite remercier également ma directrice de thèse, Dr. Benmechernene Zineb pour ses judicieux conseils durant la réalisation de ce travail. Je le remercie pour sa grande disponibilité, son encadrement et la confiance qu'elle m'a accordée tout au long de ce travail. C'est un grand honneur pour moi d'avoir effectué ma thèse sous sa direction.

J'aimerais remercier les membres du jury Pr Hadadji Miloud et Pr. Baba Hamed Mohamed Bey d'avoir acceptés d'évaluer et de juger cette thèse.

Je tiens aussi à remercier tous le Personnel du Laboratoire annexe de Saida de contrôle de qualité (CACQE) spécialement le directeur du laboratoire Mr Chaar Mohamed Rachid pour son aide et sa grande compréhension. Ainsi que, mes collègues de paillasse mister Mostefa (mostecoc), Hasni, Brahim, Kaddour et Houari.

Finalement, je tiens à remercier tout le personnel des laboratoires du département de biologie, le personnel administratif ainsi que toutes les personnes qui ont contribué de prés ou de loin à la réalisation de ce travail.

TABLES DES MATIERES

Dédicace I

ملخص II

Résumé III

Abstract IV

Liste des tableaux V

Liste des figures VI

Liste des abréviations VII

Introduction VIII

Chapitre 1

Rappel bibliographique

1.1 Aperçu sur le dromadaire. 1

1.2 Répartition géographique. 1

1.3 Les pâturages de dromadaire. 2

1.4 Le lait de chamelle. 3

1.4.1 Les propriétés du lait de chamelle. 3

1.4.2 Composition du lait de chamelle. 4

1.5 Les bactéries lactiques dans le lait de chamelle. 7

1.5.1 Classification des bactéries lactiques. 8

1.6 Le genre *Leuconostoc.* 9

1.6.1 Historique. 10

1.6.2 Ecologie des *Leuconostocs.* 10

1.6.3 Présence dans les produits fermentés. 11

1.6.4 Présence dans les produits laitiers. 11

1.6.5 Caractérisation et taxonomie. 13

1.6.6 Comparaison des méthodes d'identification. 15

1.6.7 Résistance des *Leuconostoc* au stress. 17

1.6.8 L'antagonisme des bactéries lactiques. 18

1.6.9 Les composés antimicrobiens des bactéries lactiques. 19
1.6.9.1 Les acides organiques. 19
1.6.9.2 Le peroxyde d'hydrogène. 21
1.6.9.3 Le dioxyde de carbone. 21
1.6.9.4 Le diacétyl. 21
1.6.9.5 Les bactériocines. 22
1.6.9.5.1 Définition. 22
1.6.9.5.2 Classification. 24
a) Classe I : Les lantibiotiques. 24
b) Classe II : peptides hydrophobiques thermostables. 24
✓ Sous-classe IIa. 25
✓ Sous-classe IIb. 25
✓ Sous-classe IIc. 25
c) Classe III : Protéines thermolabiles. 26
d) Classe IV : Protéines complexes. 26
1.6.9.6 Les mécanismes d'action des bactériocines. 28
1.6.9.6.1 Les lantibiotiques. 28
1.6.9.6.2 Les bactériocines de classe II. 28
1.6.9.6.3 Les bactériocines de classe III. 29
1.6.9.7 L'application des bactéries productrices de bactériocines. 29
1.6.10 Les bactériocines de *Leuconostoc.* 29
1.6.10.1 Mesenterocin Y105. 30
✓ Mode d'action. 31
1.6.10.2 Leucocin A. 34
✓ Mode d'action. 34
1.6.11 Rôle technologique de *Leuconostoc.* 34
1.7 Le genre *Listeria spp.* 36
1.7.1 Morphologie. 36
1.7.2 Caractères culturaux. 36
1.7.3 Physiologie. 37
1.7.3.1 Température. 37
1.7.3.2 Sels. 37

1.7.3.3 pH. 38
1.7.4 Caractères antigéniques. 38
1.7.5 Ecologie. 38
1.7.6 *Listeria* et le lait cru. 39
1.7.7 Listériose 40
1.7.7.1 Listériose humain 40
1.7.7.2 Listériose animale 40
Chapitre 2
Matériels & Méthodes
2.1 Lieu de travail. 42
2.2 Provenance des échantillons. 42
2.3 Isolement et caractérisation des souches de *Leuconostoc.* 42
2.3.1 Milieux d'isolement. 42
2.3.2 Préparation des échantillons. 43
2.3.3 Isolement et purification des isolats de *Leuconostoc.* 43
2.3.4 Conservation des isolats. 44
2.3.4.1 Conservation de courte durée. 44
2.3.4.2 Conservation de longue durée. 44
2.4 Identification des souches. 44
2.4.1 Caractérisation morphologique, macroscopique et microscopique. 44
2.4.2 Identification physiologique. 45
2.4.2.1 La température. 45
2.4.2.2 Type fermentaire. 45
2.4.2.3 Tolérance à la salinité. 45
2.4.2.4 Tolérance au pH alcalin & acide. 45
2.4.2.5 Production de l'acide lactique. 46
2.4.3 Identification biochimique. 46
2.4.3.1 Profil fermentaire. 46
2.4.3.2 Production de dextrane. 46
2.4.3.3 Hydrolyse de l'arginine. 46
2.4.3.4 Utilisation du citrate en présence de sucre fermentescible. 47
2.4.3.5 Production de composés aromatiques. 47

2.5 Dosage de l'acidité (Guiraud, 1998). **47**
2.6 Mesure de croissance. **48**
2.7 Sélection des souches à activité antagoniste. **48**
2.7.1 Matériels bactériens. **48**
2.7.2 Evaluation de l'activité antimicrobienne. **49**
2.7.2.1 Méthode directe (*Spot Agar Test*). **49**
2.7.2.2 Méthode indirecte (*Well Diffusion Assays*). **50**
2.7.3 Détermination de la nature de l'agent inhibiteur. **50**
2.7.3.1 L'acide lactique. **50**
2.7.3.2 Le peroxyde d'hydrogène. **51**
2.7.3.3 Les phages. **51**
2.7.3.4 Vérification de la nature protéique des substances antimicrobiennes. **52**
2.7.3.5 Sensibilité aux enzymes protéolytiques. **52**
2.7.3.6 Sensibilité à la température. **52**
2.7.3.7 Sensibilité au pH. **53**
2.7.3.8 Résistance aux sels biliaires **54**
2.8 Suivi cinétique d'acidité et de croissance en culture pure et en culture mixte. **55**
Chapitre 3
Résultats
3.1 Collecte des échantillons. **55**
3.2 Identification des souches. **55**
3.2.1 Isolement et caractérisation morphologique, macroscopique et microscopique. **55**
3.2.2 Caractérisation de l'espèce. **56**
3.2.2.1 Identification physiologique. **58**
3.2.2.2 Identification biochimique. **61**
a) Production de dextrane. **61**
b) Hydrolyse de l'arginine et de citrate. **61**
c) Type fermentaire. **63**
d) Profil fermentaire. **63**
e) Production de l'acide lactique. **66**

3.3 Sélection des souches à activité antagoniste. **67**

3.3.1 Méthode directe (*Spot agar test*). **67**

3.3.2 Méthode indirecte (*Wells diffusion assays*). **71**

3.4 Nature de l'agent inhibiteur. **72**

3.4.1 L'acide lactique. **72**

3.4.2 Les bactériophages. **73**

3.4.3 Le peroxyde d'hydrogène. **73**

3.4.4 La nature protéique des substances antimicrobiennes. **75**

3.4.5 Sensibilité aux enzymes protéolytiques. **76**

3.4.6 Sensibilité aux pH. **76**

3.4.7 Effet des solvants organiques. **77**

3.4 Suivi cinétique de l'évolution du pH et d'acidité Dornic. **79**

3.5 Cinétique de croissance des pathogène indicatrices en présence des cultures de *Leuconostoc* retenues. **82**

3.6.1 La culture putative L_{Y44}. **82**

3.6.2 La culture putative L_{Y46}. **84**

Discussions **85**

Conclusion **96**

Références bibliographiques **98**

Annexes **105**

ملخص

إن بكتيريا حامض اللاكتيك لها أهمية اقتصادية كبيرة، بسبب استخدامها الواسع في تخمير الأغذية. عدة أنواع من بكتيريا حامض اللاكتيك مثل *Leuconostoc sp* تنتج مجموعة واسعة من المواد ذات النشاط البكتيري المضاد، و التي يمكن استخدامها لحفظ الأغذية. هذه المواد لها نشاط ضد البكتيريا القريبة من السلالة المنتجة.

في هذه الدراسة 60 عزلة من بكتيريا حامض اللاكتيك المعزولة من حليب الإبل الطازج، بعد التجارب الفيزيولوجية و البيوكيميائية تم تحديد نوع عزلات *Leuconostoc* من بين عزلات حامض اللاكتيك. بعد ذلك تم ترتيب 21 عزلة و تحديد نوعها من خلال النظر في تجارب تخمير السكر، الذي يكشف انتمائها كما يلي : عزلتان ضمن *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides* و 19 عزلة ضمن *Leuconostoc mesenteroides* subsp *dextranicum*. تم فحص النشاط المضاد للعزلات بأسلوبين مختلفين (مباشر "*Spot Agar Test*" و غير مباشر "*Well Diffusion Assay*") ضد السلالات المسببة للأمراض: *Listeria innocua ATCC 33090* من مخبر الميكروبيولوجيا التطبيقية، و *Escherichia coli ATCC 8739,* *Staphylococcus aureus ATCC 6538* من وحدة مراقبة المواد الصيدلانية.

بعد الانتقاء المبدئي تم فحص 17 عزلة لها فعالية تثبيطية اتجاه البكتيريا المسببة للأمراض، أما الثاني سمح باختيار 6 عزلات لها القدرة الآتية : « Bactériocinogènes » و أجري وصف استجابة مسببات الأمراض

L. innocua, St. aureus في وجود رشحات العزلات المختارة. و أخيرا تتبع النمو الحركي لمسببات الأمراض في وجود عزلات *Leuconostoc mesenteroides* الأكثر كفاءة.

الوقاية الحيوية تكون حلا مثاليا لتحسين السلامة الميكروبيلوجية للأغذية في الجزائر.

الكلمات الرئيسية : *Leuconostoc mesenteroides*، حليب الإبل، النشاط البكتيري المضاد، تقييم، بكتريوسين، حامض اللاكتيك.

Résumé

Les bactéries lactiques sont économiquement importantes à cause de leur utilisation étendue dans les fermentations des aliments. Plusieurs espèces de LAB comme *Leuconostoc mesenteroides* produisent une large variété de substances avec une activité antimicrobienne qui peut être utilisée pour la préservation des aliments. Ces substances ont une activité inhibitrice dirigée contre les bactéries proches de la souche productrice. Dans la présente étude 60 isolats de bactéries lactiques isolées à partir du lait cru de chamelle ont été identifiées phénotypiquement suite aux tests physiologiques et biochimiques pour sélectionner les *Leuconostoc* des autres lactiques. A l'issue desquels 21 isolats ont été agencés dans le *Genre Leuconostoc.* Par la suite, une identification au niveau de *l'espèce* a été entreprise en s'intéressant au profil biochimique (fermentation des sucres) qui révèle l'appartenance de nos isolats au *Leuconostoc mesenteroides* avec ces deux sous espèces *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides* et *Leuconostoc mesenteroides* subsp *dextranicum*. Un *screening* d'activité antibactérienne putative en deux méthodes *in vitro* (directe « *Spot Agar Test* », et indirect « *Well Diffusion Assay* ») à été réalisé à l'encontre de 3 souches pathogènes ou altérantes : *Listeria innocua ATCC 33090* du souchier de laboratoire LMA *et E.coli ATCC 8739, Staphylococcus aureus ATCC 6538* de l'unité ouest de LNCP Oran. Le screening initial a permis de sélectionner 17 candidats ayant un potentiel antagoniste envers les pathogènes, le second à permis de retenir 6 *Leuconostoc meseneteroides bactériocinogènes*. Une description de la réponse des pathogènes indicatrices (*Listeria innocua ATCC 33090, Staphylococcus aureus ATCC 6538*) à la présence des isolats les plus performants à été réalisée par un suivie cinétique de la croissance de ces pathogènes.

La technologie des cultures bio-protectrices serait ainsi une solution de choix pour une amélioration exemplaire de la sécurité microbiologique en Algérie.

Mots clés : *Leuconostoc mesenteroides*, lait de chamelle, effet antimicrobien, évaluation, bactériocines, acide lactique.

Adstract

Lactic acid bacteria are economically important because of their extensive use in food fermentations. Several species of LAB as *Leuconostoc mesenteroides* produce a wide variety of substances with antimicrobial activity that can be used for food preservation. These substances have an inhibitory activity against bacteria close to the producing strain. In this study 60 isolates of lactic acid bacteria isolated from raw camel milk were identified phenotypically, in response to physiological and biochemical tests to select *Leuconostoc* genius from other lactic acid bacteria. After which 21 isolates were arranged in *Leuconostoc* genius. Subsequently, identification at the species stage was undertaken by looking at the biochemical profile (sugar fermentation), which reveals that the isolates belonging to *Leuconostoc mesenteroides* with these two subspecies *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides* and *Leuconostoc mesenteroides* subsp *dextranicum*. A screening of antibacterial activity by two putative methods (direct "Spot Test Agar" and indirect "Well Diffusion Assay") was realized against three pathogenic strains: *Listeria innocua ATCC 33090* of LMA laboratory and *E. coli ATCC 8739*, *Staphylococcus aureus ATCC 6538* from the west unity of LNCP Oran. The initial screening was used to select 17 candidates with antagonistic potential towards pathogens, the second allowed to retain 6 bacteriocinogenic *Leuconostoc meseneteroides*. A description of the response of indicator pathogens (*Listeria innocua ATCC 33090, Staphylococcus aureus ATCC 6538*) in the presence of the performed isolates was followed by a kinetic growth of these pathogens.

Technology of bio-protective cultures would be an ideal solution for improving the microbiological food safety in Algeria.

Keywords: *Leuconostoc mesenteroides*, camel's milk, antimicrobial effect, evaluation, bacteriocin, lactic acid.

Liste des tableaux

		Page
Tableau 1.1	Composition moyenne du lait de chamelle comparé avec le lait des animaux d'élevage.	04
Tableau 1.2	Proportion de la majorité des acides gras dans la matière grasse du lait de chamelle.	05
Tableau 1.3	Portions de sels minéraux et vitamines dans le lait de chamelle.	06
Tableau 1.4	Les espèces incluses dans le genre *Leuconostoc.*	16
Tableau 1.5	Exemples des bactériocines isolés à partir des aliments.	26
Tableau 3.1	Paramètres physico-chimiques des échantillons de lait de chamelle.	55
Tableau 3.2	Caractères physiologiques des isolats bactériens.	58
Tableau 3.3	Profil fermentaires des isolats bactériens.	63
Tableau 3.4	Diamètres des zones d'inhibition suite au (Spot agar test) avec MRS, MRS tamponée et BHI + catalase.	71
Tableau 3.5	Diamètres des zones d'inhibition suite à la diffusion sur puits en gélose.	73
Tableau 3.6	Effet de traitement de température, pH, enzymes protéolytiques et des solvants organiques sur les substances antimicrobiennes produites par les souches test.	76

Liste des figures

		Page
Figure 1.1	L'arbre phylogénique des bactéries à Gram positive avec un bas mol% G+C basée sur la comparaison du gène de l'ARN 16S.	14
Figure 1.2	Schéma pour l'identification présomptive de *Leuconostoc spp.*	15
Figure 1.3	Représentation schématique de la paroi de Gram+ et Gram-. LPS.	19
Figure 1.4	Mode d'action de bactériocines de classe IIa.	28
Figure 1.5	La production de bactériocine de classe IIa.	31
Figure 3.1	Aspect macroscopique (à l'œil nu) des cultures bactériennes.	55
Figure 3.2	Aspect microscopique (x100) des cellules bactériennes après fixation (Coloration de *Gram*).	56
Figure 3.3	Croissance dans le bouillon MRS à 3% de NaCl.	59
Figure 3.4	Aspect de souche pure L_{Y46} sur MRS liquide.	59
Figure 3.5	Aspect des colonies de la souche L_{Y09} gélatineuses et gluantes sur milieu MSE.	60
Figure 3.6	Aspect des colonies de *Leuconostoc* ADH positives sur milieu M16 BCP.	61
Figure 3.7	Aspect des colonies de *Leuconostoc* Citrate postives sur milieu KMK.	61
Figure 3.8	Caractère hétérofermentaire des isolats bactériens.	62
Figure 3.9	Fermentation des carbohydrates par la souche $L_{Y44.}$	64
Figure 3.10	Fermentation des carbohydrates par la souche $L_{Y46.}$	64
Figure 3.11	Production d'acide lactique chez les isolats bactériens.	65
Figure 3.12	Résultats du test de l'activité antibactérienne (spot agar test) des candidats bactériens contre *Listeria innocua ATCC 33090.*	67
Figure 3.13	Résultats du test de l'activité antibactérienne (spot	

	agar test) des candidats bactériens contre *Staphylococcus aureus ATCC 6538.*	68
Figure 3.14	Résultats du test de l'activité antibactérienne (spot agar test) des candidats bactériens contre *Escherichia coli ATCC 8739.*	69
Figure 3.15	Résultats du test de l'activité antibactérienne (Diffusion en puits sur gélose) des candidats bactériens.	70
Figure 3.16	Absence des plages de lyse dans le test des phages pour les souches L_{Y07} et L_{Y46}.	72
Figure 3.17	Thermosensibilité des surnageants	75
Figure 3.18	Sensibilité des surnageants aux protéases.	76
Figure 3.19	Résultats de l'effet des solvants organiques sur les surnageants des isolats L_{Y44} et L_{Y46}	77
Figure 3.20	Evolution de pH chez la souche L_{Y44} en culture pure et en culture mixte.	79
Figure 3.21	Evolution de pH chez la souche L_{Y46} en culture pure et en culture mixte.	80
Figure 3.22	Cinétique d'évolution de l'acidité Dornic chez la souche L_{Y44} en culture pure et en culture mixte avec *Listeria innocua* et *Staphylococcus aureus.*	81
Figure 3.23	Cinétique d'évolution de l'acidité Dornic chez la souche L_{Y46} en culture pure et en culture mixte avec *Listeria innocua* et *Staphylococcus aureus.*	82
Figure 3.24	Suivie cinétique de la souche test L_{Y44} en culture pure et en culture mixte.	83
Figure 3.25	Suivie cinétique de la souche test L_{Y46} en culture pure et en culture mixte.	84

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
ATCC	American type cultures collection
C°	Degré Celsius
°D	Degré dornic
h	Heure
L.	*Listeria*
Lb.	*Lactobacillus*
Lc.	*Lactococcus*
Ln.	*Leuconostoc*
LAB	Lactic Acid Bacteria
kDa	kilo Dalton
mg	milligramme
ml	millilitre
µg	microgramme
µl	microlitre
NA	Norme algérienne
N	Normalité
nm	nanomètre
pH	Potentiel d'hydrogène
PM	Poids moléculaire
T°	Température
RMN	Résonance magnétique nucléaire
rpm	Rotation par minute
S.	*Staphylococcus*
SIDA	Syndrome de l'immunodéficience acquise
V	Volume

Chapitre 1

Rappel bibliographique

1.1 Aperçu sur le dromadaire

Le dromadaire appartient à la famille des *Camelidae* et au sous-ordre des *Tylopoda* eux même appartient au ordre des *Cetartiodactyles.* Le nom « dromadaire » dérive du terme grecque « dromados » qui veut dire course. Il est donné à l'espèce de chameau à une seule bosse, appartenant au genre *Camelus* de la famille des *Camelidae* et dont le nom scientifique est *Camelus dromedarius* (**Farah Z., 1993**).

Le dromadaire vit dans les régions chaudes, arides et semi-arides de la planète. Il serait originaire de l'Amérique du Nord où le plus ancien fossile de *Camelidae* a été trouvé et d'où il aurait rejoint l'Asie et l'Afrique, à la suite des glaciations qui sévirent dans pratiquement le quasi totalité de l'hémisphère nord de la planète durant l'ère tertiaire (**Zeuner, 1963**).

1.2 Répartition géographique

L'aire de répartition géographique du dromadaire, se situe, aux niveaux des zones tropicales et subtropicales et s'étend, des régions arides et semi-arides du nord de l'Afrique (Mauritanie) jusqu'au nord-ouest du continent asiatique (Chine).

Selon les statistiques de la FAO (2008), la population cameline mondiale s'élève à environ 20 millions de têtes dont plus de 15 millions sont recensées en Afrique et 3,6 millions en Asie. La grande majorité de cette population (84%) sont des dromadaires (*Camelus dromedarius*) qui vivent dans les régions arides du nord et du nord-est de l'Afrique. Le reste (6%) est des « bactrians » (*Camelus bactrianus*) qui sont des chameaux à deux bosses peuplant les régions froides de l'Asie. Ce nom leur a été donné, par référence à la région de "Baktriane", située au nord de l'Afghanistan, où cette espèce était initialement implantée (**Farah Z., 1993**).

Estimé à 268.560 têtes en 2005, l'effectif camelin algérien est réparti sur 17 wilayates, avec 75% du cheptel dans huit wilayates sahariennes : Ouargla, Ghardaia, El-Oued, Tamanrasset, Illizi, Adrar, Tindouf et Béchar et 25% du cheptel dans neuf wilayates steppiques : Biskra, Tebessa, Khenchela, Batna, Djelfa, El-Bayad, Naâma, Laghouat et M'sila **(Anonyme, 2006)**.

Le dromadaire (appelé à tort chameau) s'est révélé l'animal le mieux adapté à la zone aride, affront et depuis une trentaine d'années à des sécheresses répétées. La production en lait de la chamelle est beaucoup plus abondante que celle de tous les animaux domestiques ; sa sobriété est également inégalable (**Wilson, 1998**).

1.3 Les pâturages de la chamelle

La connaissance des végétations consommées par les animaux dans les milieux difficiles est indispensable pour estimer leur valeur nutritionnelle afin de mettre en place des méthodes d'utilisation rationnelle des ressources fourragères disponibles, peu d'études sont consacrées pour les pâturages sahariens utilisées essentiellement par la chamelle.

Gonzalez, (1949) a classé les pâturages sahariens en 2 catégories: Les pâturages permanents et les pâturages éphémères.

Les premiers sont constitués des plantes vivaces, charnues très résistantes à la sécheresse dont les feuilles sont réduites à l'état d'articles ou d'épines. Cette végétation spéciale forme le fond de la nourriture de dromadaire que les nomades appellent « le bois ». Par contre, le deuxième sont constitués de toutes les petites plantes annuelles et éphémères formées principalement de composées, de crucifères, de graines, de légumineuses, de malvacées, de géraniacées et de résédacées qui germent après les pluies dans les endroits qui paraissent en temps habituel les plus impropres à la végétation.

1.4 Le lait de chamelle

Pendant longtemps, le lait était utilisé seulement pour fournir les composants nutritionnels tels que les acides aminés essentiels (**Hambraeus, 1992**). Au cours des dernières décennies, plusieurs études ont montré que le lait est une importante source nutritionnelle et fonctionnelle et pourrait fournir des bienfaits pour la santé dus à la présence des substances bioactives. Le lait de chamelle frais ou fermenté ont été reconnus depuis longtemps a offrir un traitement potentiel pour une série de maladies telles que l'hydropisie, la jaunisse, la tuberculose, l'asthme et la leishmaniose ou kala-azar (**Abdelgadir *et al*., 1998; Shalash, 1984**).

Chez les touaregs, le lait de chamelle est le plus apprécié. Il a la réputation de ne transmettre aucune maladie, de favoriser la croissance des enfants, de guérir et peut posséder de multiples vertus. Il est inutile d'insister sur la sobriété des chameaux qui consomment aussi bien des pâturages arborés qu'herbacées dont ils broutent aussi bien des vivaces sahariennes que les prairies annuelles sahéliennes. Ils n'ont pas besoin de s'abreuver tous les jours ou tous les deux jours comme c'est le cas pour les autres animaux, mais tous les quatre à cinq jours, même pour les chamelles en période de lactation (**Edmond Bernus, 1992**).

Du faite qu'aucune production animale ou végétale n'est marginale, et que chacune d'elles a un rôle déterminé dans un développement agricole harmonieux.
Dans ces conditions difficiles, les chamelles ont la capacité de produire plus de lait que les autres espèces et pour des périodes plus temps (**Farah *et al*., 2007**), tandis Leur alimentation est exigent (**Wilson, 1998**). Chaque chamelle peut produire entre 1000 et 2000 litres de lait par période de lactation de 8-18 mois (**FAO, 2006**).

1.4.1 Les propriétés du lait de chamelle

Le lait de chamelle, généralement blanc opaque. Il a un goût sucré et piquant parfois salé à cause du type des plantes broutées dans le désert par la chamelle, c'est pour ça que les changements de goût du lait sont causés par les types de fourrages et

la disponibilité d'eau, il est mousseux lorsqu'il est secoué légèrement, il est moins visqueux par rapport au lait de vache.

Le lait est un aliment complet, sa composition a été étudier dans différents régions dans le monde présentant un changement due au plusieurs facteurs : les méthodes analytiques de mesure, l'alimentation de la chamelle, répartition géographique, type de fourrage, disponibilité d'eau et d'autres facteurs.

1.4.2 Composition du lait de chamelle

La composition de lait de chamelle est similaire à celui de vache et de chèvre (tableau 1.1). Le lait de chamelle est généralement blanc opaque et pauvre en carotène. Il a une saveur douce et forte, mais peut parfois aussi être salé. Le type de fourrage et la disponibilité de l'eau peuvent affectés le goût de lait de chamelle. Le pH du lait de chamelle varie de 6,5 à 6,7, l'acidité titrable est de 0,03 après 2 h et 0,149 après 6 h, et la densité varie de 1,025 à 1,032.

Tableau 1.1 : Composition moyenne du lait de chamelle comparé avec le lait des animaux d'élevage **(Encyclopedia of Dairy sciences, 2011)**

Constituants (%)	Chamelle	Vache	Brebis	Chèvre
Humidité	**86.9**	**87.0**	**80.8**	**87.7**
Protéines	**3.4**	**3.5**	**5.5**	**3.3**
Matière grasse	**4.1**	**3.9**	**5.3**	**4.1**
Lactose	**3.7**	**4.9**	**4.5**	**3.9**
Matière sèche dégraissée	**8.9**	**9.1**	**11.8**	**8.2**
Ash (sels minéraux)	**0.7**	**0.7**	**0.9**	**0.8**

Par rapport à la matière graisse de lait de vache, brebis et chèvre, la matière grasse du lait de chamelle contient moins d'acide gras à courte chaîne. Les données sur la Composition des principaux acides gras dans le lait de chamelle sont énumérées dans le tableau 1.2. En général, les acides gras à courte chaîne (C4-C12) dans le lait de chamelle sont présents en très faibles quantités par rapport à celles du lait de vache.

En outre, le lait de chamelle a des concentrations élevées de l'acide linoléique et des acides gras polyinsaturés.

Tableau 1.2 : Proportion de la majorité des acides gras dans la matière grasse du lait de chamelle **(Encyclopedia of Dairy sciences, 2011)**

Acides gras	Par 100g AGT*
L'acide butyrique (C4:0)	0.85
L'acide caproïque (C6:0)	0.37
L'acide caprylique (C8:0)	0.28
L'acide caprique (C10:0)	0.37
L'acide laurique (C12:0)	0.69
L'acide myristique (C14:0)	10.90
L'acide myristoléïque (C14:1)	1.50
Acide pentadécylique (C15:0)	1.14
L'acide palmitique (C16:0)	29.87
L'acide palmitoléïque (C16:1)	9.60
L'acide heptadécanoéïque (C17:0)	0.88
Acide trans-9-octadécènoïque (C17:1)	0.55
L'acide stéarique (C18:0)	12.90
L'acide oléique (C18:1)	23.50
L'acide linoléique (C18:2)	3.10
L'acide α-linoléique (C18:3)	1.40
L'acide arachidique (C20:0)	0.70

(*) AGT : matière grasse totale

Les minéraux et les vitamines contenus dans le lait de chamelle sont indiqués dans le tableau 1.3. Les minéraux sont principalement les chlorures, les phosphates et les citrates de sodium, de calcium et du magnésium. Peu de données sont disponibles sur la teneur en vitamines du lait de chamelle. Il semble que le lait de chamelle contient moins de vitamine A, E, thiamine, riboflavine, acide folique et acide pantothénique que le lait de vache, tandis que le contenu de la vitamine B12 et pyridoxine sont environ le même. Le contenu de la niacine et la vitamine C sont nettement plus élevés que dans le lait de vache.

Tableau 1.3 : Portions de sels minéraux et vitamines dans le lait de chamelle **(Encyclopedia of Dairy sciences, 2011)**

Sels minéraux	Mg/l
Calcium	1060.0-1570.0
Phosphate inorganique	580.0-1040.0
Cuivre	13.0-18.0
Fer	1.3-2.5
Magnésium	75.0-160.0
Manganèse	0.1-0.2
Sodium	360.0-620.0
Zinc	4.0-5.0
Vitamines	
Rétinol (A)	0.10-0.15
Thiamine (B1)	0.33-0.60
Riboflavine (B6)	0.42-0.80
Pyridoxine (B12)	0.52
Cobalamine	0.002
Niacine (B3)	4.6
Acide folique (B9)	0.004
Acide pentothenique (B5)	0.88
Tocophérol (E)	0.53
Acide ascorbique (C)	24-36

1.2 Les bactéries lactiques dans le lait de chamelle

Les bactéries lactiques isolées à partir de lait de vache et de chèvre et des produits laitiers ont été largement étudiées pour leur activité antimicrobienne avec les bactériocines (**Guessas *et al*., 2005 ; Labioui *et al*., 2005 ; Mezaini *et al*., 2009**). De nombreux travaux ont été menées pour l'isolement et la caractérisation des bactéries lactiques du lait de chamelle (**Benkerroum *et al*, 2003 ; Hassaïne *et al*., 2007 ; Khedid *et al*., 2009**) et sur l'activité antimicrobienne (**El Agamy *et al*, 1992 ; Benkerroum *et al*., 2009 ; Khay *et al*., 2011**).

Les bactéries lactiques (LAB) ont été présentes dans l'alimentation humaine et animale pendant des siècles, parce qu'ils ont contribué considérablement à la valeur nutritionnelle des produits. En pour leurs propriétés métaboliques qui jouent un rôle important dans l'industrie alimentaire, Parce qu'ils contribuent de manière significative à la saveur, la texture et la fermentation des produits alimentaires (**McKay et Baldwin, 1990**). L'intérêt des micro-organismes et de leurs métabolites dans la prévention de la détérioration des aliments et la prolongation de la durée de conservation des aliments a été développé au cours de la dernière décennie (**Stiles, 1996**).

Par conséquent, un intérêt majeur existe pour les produits laitiers contenant des espèces bactériennes spécifiques tel que les *Leuconostocs* à fort potentiel antagoniste pour améliorer la qualité des aliments et la santé humaine (**Portier *et al*., 1993**).

A cet égard, des études antérieures ont montrés que certains LAB ont été choisi en mesure de contrôler la croissance de certains micro-organismes pathogènes tels que *Listeria monocytogenes* dans les aliments (**Schöbitz *et al*., 1999 ; Callewaert *et al*., 2000; Tantillo *et al*., 2002; Mataragas *et al*., 2003**). *Listeria innocua*, une espèce non pathogène, peut être utilisé en tant que indicateur biologique de *Listeria monocytogenes* en raison de leur réponse similaire aux traitements physico-chimique et thermique (**Kamat et Nair, 1996**).

1.3 Classification des bactéries lactiques

Orla-Jensen a mis en 1919 une clé de différenciation au stade des genres des bactéries lactique basé surtout sur des tests phénotypiques classiques. Depuis, ces trais de base de différenciation des bactéries lactiques toujours viables sont largement utilisées, la classification au niveau du genre est basés sur la morphologie, le mode de fermentation du glucose, la croissance à différentes températures, la configuration de l'acide lactique produit, la capacité à croître à différentes concentrations de sel et de potentiel d'hydrogène (**Axelsson, 2004 ; Carr *et al.,* 2002**). Toutefois ces caractéristiques phénotypiques sont utiles comme point de départ mais il reste difficile d'utiliser ces tests classiques pour une identification fiable du genre avec la description croissante de nouveaux genres et espèces (**Axelsson, 2004**).

Les bactéries lactiques, bien que composées de divers genres, prennent une des trois formes bactériennes : sphérique, bâtonnet ou intermédiaire. Elles sont toutes *Gram* +, catalase - et ne sporulent pas (**Carr *et al.,* 2002; Schillinger *et al.,* 2003, Axelsson, 2004; Doyle *et al.,* 2006**).

Plusieurs travaux se sont intéressés à l'étude de l'identification de la microflore lactique du lait de chamelle (**Benkerroum *et al.*, 2003 ; Zadi *et al.*, 2006 ; Khedid *et al.*, 2009**), ils ont montrés différents genres colonisant le lait de chamelle représentés par *Enterococcus, Lactococcus, Lactobacillus, Streptococcus, Pediococcus* et *Leuconostoc.* Ces derniers se sont clairement dominés par le genre *Lactobacillus* favorisé par le pH bas du lait de chamelle, ils ont affichés les pourcentages suivants : *Lactobacillus* 37.5%, *Lactococcus* 25.8%, *Leuconostoc* 11.7%, *Enterococcus* 10.8%, *Streptococcus* 9.2% et *Pediococcus* 5% (**Khedid *et al.*, 2009**).

Elles peuvent être subdivisées en deux groupes biochimiques selon la fermentation des hydrates de carbone (une caractéristique importante utilisée dans la différenciation des genres), ainsi, on a les homofermentatives qui possèdent l'aldolase et sont capables de fermenter le glucose directement, ce groupe renferme les genres : *Lactobacillus, Pediococcus, Streptococcus, Lactococcus, Enterococcus*. Tandis que les hétérofermentatives possédant l'enzyme phosphoketolase sont représentés par les genres : *Leuconostoc* et un sous groupe du genre *Lactobacillus* (**Carr *et al.,* 2002 ;**

Axelsson, 2004 ; Doyle *et al.*, 2006). La différence entre ces deux groupes est pratiquement détectable par un test de production de CO2 (**Bourgeois, 1996 ; Axelsson, 2004**). Par ailleurs, Le type d'acide lactique et la quantité d'acide lactique formés pendant la fermentation joue un rôle important dans la classification taxonomique des bactéries lactiques (**Carr *et al.*, 2002**).

En fonction de la température de croissance, tolérance à différentes concentrations de sel et différents potentiel d'hydrogène, les bactéries lactiques peuvent être classées au genre appropriées. La caractérisation du profile biochimique est importante pour une orientation préliminaire au stade de l'espèce, des tests sont utilisés a cette fin à savoir; la fermentation des glucides, l'hydrolyse de l'arginine (**Axelsson, 2004**).

En outre, l'identification phénotypique motionnée en haut incluant principalement des méthodes physiologique et autres biochimiques (configuration de l'acide lactiques, l'hydrolyse de l'arginine, profile de fermentation des sucres), s'ajoute l'application des techniques moléculaire tel que le ratio (C+G en mol %) pour déterminer le degré de parenté et/ou chemotaxonomique y compris le type de l'acide aminé de peptidoglycane, le type de l'acide teichoïque/ menaquinones ainsi que leur présence. Tous ceci a entraîné des changements importants dans la classification taxonomique des bactéries lactiques (**Stiles *et al.*, 1997; Axelsson, 2004 ; Tahiri, 2004**).

1.4 Le genre *Leuconostoc*

Le *Leuconostoc* joue un rôle important dans la technologie des produits laitiers, en particulier par la production des composés d'arôme et du gaz. Le rôle de *Ln. mesenteroides* subsp *cremoris* dans la production des arômes a été bien décrit (**Vedamuthu, 1994**). Le *Leuconostoc* peut crée des ouvertures suite a la production du CO_2 dans l'industrie fromagère surtout dans le Roquefort. Il joue un rôle primordial de nombreuses fermentations de produits laitiers, choucroutes, cornichons et des viandes (**Hemme *et al.*, 2004**). De ce fait, il a pris un intérêt économique potentiel et des tentatives de classification sont apparues dés les années 30.

1.4.1 Historique

Le genre *Leuconostoc* a été définit Selon Van Tieghem 1878. Le mot « Leu.co.nos.Toc». leucus clair, lumière, Nostoc nom générique d'un algue; les *Leuconostocs* sont apparu à l'origine (rappelons à cet époque, l'examen microscopique c'est-à-dire la morphologie était un critère prédominant de l'identification), sous forme de chaînes d'aspect mucilagineux, non pigmentés. Les premières souches étaient isolées à partir d'accident apparues dans des sucreries. Or les *Leuconostocs* responsables de ces accidents produisent des dextranes et en milieu saccharosé, les chaînes de cocci sont entourées d'une gaine bien distincte à l'examen microscopique : gaine qui rappelle celle des Nostoc. Ce n'est qu'en 1912 que Beijerinck isola du beurre et d'autres produits laitiers des microorganismes identiques aux *Leuconostocs* antérieurement décrits, ces microorganismes produisaient de la gomme à partir du saccharose, il les appela *Lactococcus dextranicus* **(Lacroix *et al*., 2011)**.

En 1919, Orla-Jensen, dans son étude sur la classification des bactéries lactiques sépara le genre *Betacoccus* du genre *Streptococcus.* Il choisit de donner le nom de *Leuconostoc* en technologie laitière (*Betacoccus*) à ces bactéries produisant de l'acide lactique D(-) par ce que ces bactéries se trouvaient sur les betteraves (*Beta communis*) et autres produits végétaux. Les résultats d'Orla-Jensen monteraient pour la première fois qu'il existait une relation possible entre les *Leuconostocs* produisant des dextranes (*Betacoccus*) et certains streptocoques producteurs d'acide lactique, streptocoques trouvés dans les produits laitiers et les végétaux fermentés. Orla-Jensen divisait le genre *Betacoccus* en deux espèces *B. arabinosaceus* et *B. bovis* d'après leur capacité à fermenter l'arabinose **(Lacroix *et al*., 2011)**.

En ce qui concerne le caractère hétérofermentaire des *Leuconostocs*, c'est-à-dire leur capacité à produire du CO2 à partir du glucose a été mis en évidence en 1918 par Evans, il fut confirmer par Hucker en 1928. Contrairement aux *Betabacteria* **(Carr *et al*., 2002)**.

1.4.2 Ecologie des *Leuconostoc*

Les *Leuconostocs* sont très répondues dans la nature, elles colonisent des écosystèmes très variés tel que les végétaux et les animaux. Les *Leuconostocs* se paraissent dans divers écosystèmes, elles colonisent les végétaux qui constituent leur

biotope écologique naturel **(Sanchez *et al*., 2005),** bien que leur population soit réduite comparée à celle des levures et bactéries aérobies. A partir de cet habitat d'origine, ils peuvent facilement propager diverses niches comprenant les végétaux tels que les légumes et les ensilages **(Ennahar *et al*., 2003)** et les produits fermentés (**Bendimerad *et al*., 2012**). Leur présence dans le lait et donc dans les produits laitiers est due à la contamination durant la traite et ou la fabrication renforcé par leur singularité de croitre longtemps sur les surfaces en bois **(Devoyod & Poullain, 1988)**.

Les bactéries du genre *Leuconostoc* ne sont pas généralement parmi la flore humaine. Bien que des souches sont isolées à partir des matières fécales humaines et des échantillons de lait **(Brashears *et al*., 2003)**, de poissons **(Ringo & Gatsoupe, 1998)**.

Le genre *Leuconostoc* a causé de sérieux problèmes dans l'industrie de canne à sucre par la formation d'un exopolysaccharide « le dextrane » **(Carr *et al*., 2005)**. Elles ont été également associées à des détériorations des poissons **(Lyhs, 2002)** et des produits carnés **(Bjorkroth *et al*., 2000).**

1.4.3 Présence dans les produits fermentés

Les *Leuconostocs* jouent un rôle notable dans la fermentation de nombreux produits alimentaires. La source de la flore microbienne peut être soit comme pour la production du lait cru, fromage, choucroutes ou des cultures starters référenciées.

Pendant la fermentation, les produits finaux du métabolisme d'hydrates de carbone contribuent non seulement à l'acidification mais également à la saveur et la texture du produit. La fermentation peut aussi augmenter la qualité du produit en augmentant sa digestibilité **(Gueguen *et al*., 1997)**.

1.4.4 Présence dans les produits laitiers

Hucker et Pederson, (1930) confirment que les *Leuconostocs* trouvés dans les produits laitiers ne sont pas dans leur habitat naturel, par conséquent, les caractéristiques de ces souches inactives reflètent leur incapacité à une croissance infini dans le lait **(Vedamuthu, 1994)**.

Les *Leuconostocs* évoluent seulement en association dans le lait, une relation entre les *Leuconostocs* et les *Lactococcus* productrices d'acide qui a été reconnu dés 1919. Foster *et al*, (1957) révèlent que les cultures mixtes de *Lactococcus* et *Leuconostoc*

montrent une association, la fonction de *Lactococcus* est de produire de l'acide à partir du glucose, et le rôle de *Leuconostoc* était de fermenter l'acide citrique du lait à des composés aromatiques. Plus loin l'ensemble de ces bactéries exécutent une fonction qui ne se réaliser pas seule. C'est l'exemple parfait d'une synergie et une relation de symbiose entre ces deux bactéries.

La présence de *Leuconostoc* dans de nombreuses variétés de fromage fabriquées sans l'addition des ferments starters de *Leuconostoc* est régulière. Les souches de *Leuconostoc mesenteroides* subsp *cremoris* ou de *Leuconostoc lactis* sont classiquement utilisées pour la fabrication du beurre, de crème et de quelques produits laitiers fermentés **(Vedamuthu, 1994)**.

Cogan *et al*, (1997) ont montrés que dans 4379 isolats à partir de 35 produits laitiers européens comprenant 24 fromages artisanaux, on à 10% des souches sont des *Leuconostocs.* Ces résultats confirment les données précédentes indiquant la présence des *Leuconostocs* dans la majorité des fromages de lait cru **(Devoyod & Poullain, 1998).**

De nombreuses études sont encore consacrées à l'écologie des fromages artisanaux, et l'évolution des principaux groupes microbiens pendant la fabrication. Les études éditées ces dernières années se sont fondées sur de nouvelles méthodes de biologie moléculaires **(Mas *et al*., 2002 ; Tavaria & Malcata, 2003)**.

D'autres travaux se sont déjà intéressés à l'étude de la microflore lactique dans le lait cru ; Kihal *et al*, (2005) ont révélé la présence de 26.28% de *Leuconostoc* dans le lait de chèvre de la flore lactique totale ; ajoutant les travaux de Khedid *et al*, (2009) et Zadi *et al*, (2006) qui ont révélés la présence de 12.3% – 11.7% du genre *Leuconostoc* dans le lait de chamelle, avec une distribution comme suite : 4.2% de *Leuconostoc lactis*, 3.3% *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides*, 2.5% de *Leuconostoc mesenteroides* subsp *cremoris* et 1.7% de *Leuconostoc mesenteroides* subsp *dextranicum.*

Les *Leuconostocs* sont présents dans une grande variété de lait fermenté notamment le lait de chamelle fermenté **(Rahman *et al*., 2009 ; Hashim *et* al., 2009 ; Jans *et al*., 2012 ; Bakr Shori A., 2012 ; Bendimerad *et al*., 2012)**.

1.4.5 Caractérisation et taxonomie

La connaissance de l'écologie microbienne dans diverse places et des processus de fermentations pourrait également s'améliorer par l'apparition de l'identification moléculaire, quoique les caractères biochimiques demeurent d'intérêt principal pour des applications technologiques. Il a été basé depuis longtemps sur des caractères phénotypiques pour isoler et caractériser les bactéries lactiques y compris les *Leuconostocs*, ainsi pour différencier entre l'espèce et la sous-espèce (Tableau 1.4). On peut citer la tolérance à l'oxygène, la résistance à la salinité, l'aptitude à produire du gaz et des composés aromatiques, le profil fermentaire et la production des exopolysaccharides (**Devoyod *et al*., 1998**).

L'emploi de ces méthodes classiques à l'inconvénient de ne refléter qu'une quantité réduite d'information sur l'espèce et la sous-espèce, de plus le choix de critères considérés comme des critères de base se diffère d'un auteur à un autre, ce qui est une source potentiel d'instabilité. Dans les dernières décennies, les nouveaux outils moléculaires, en particuliers les techniques basées sur les progrès réalisé dans la connaissance de l'ADN, ont contribué largement à clarifier la phylogénie du *Leuconostoc* et identifié de nouvelles espèces et ont donnée une identification fiable et cohérente. Ces techniques sont employées seules ou combinées pour estimer la diversité moléculaires ou pour identifier les *Leuconostocs* au niveau de l'espèce et de la sous-espèce **(Gurtler et Mayall, 2001).**

Les méthodes basées sur l'ADN sont extensivement employés pour la différenciation des *Leuconostocs* **(Reeson *et al*., 2003).** La séparation de l'ADN 16S ribosomal par l'électrophorèse de gel de gradient de température temporelle (TTGE) est d'intérêt particulier par ce qu'elle permet une identification rapide de la plupart des espèces bactériennes qui colonisent les produits laitiers, y compris les *Leuconostocs* (Figure 1.1)**(Ogier *et al*., 2002).** La distinction entre les sous-espèces de *Ln. mesenteroides* : *dextranicum* et *cremoris* a été confirmée en utilisant des modèles du profils protéiques ou ribotypage **(Perez *et al*., 2002 ; Gazi *et al*., 2006)** tandis que Cibik *et al*, (2000) ont proposés que ses sous-espèces puissent être des *Biovars,* en utilisant d'autres méthodes moléculaires.

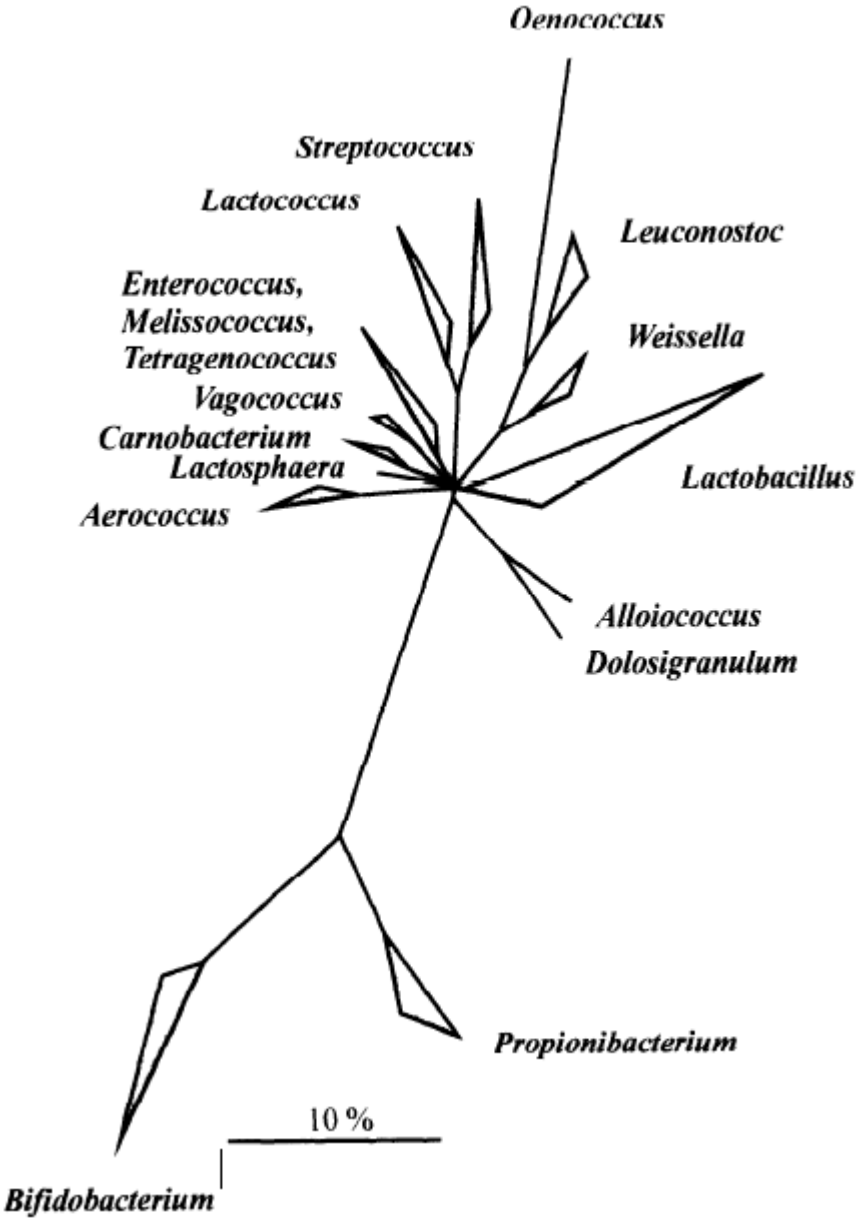


Figure 1.1: L'arbre phylogénique des bactéries à Gram positive avec un bas mol% G+C basée sur la comparaison du gène de l'ARN 16S **(Holzapfel *et al*., 2001).**

1.4.6 Evolution récente de la taxonomie

Seulement quatre espèces de *Leuconostoc* ont été incluses dans « *the bargey's manual of systematic bacteriology* » **(Garvie, 1986)**, les espèces de *Ln. mesenteroides* comportant trois sous-espèces ; *Ln. mesenteroides* subsp *mesenteroides, Ln. mesenteroides* subsp dextranicum, *Ln. mesenteroides* subsp cremoris (Tableau 1.4). Les deux faits principaux au sujet de *Leuconostoc* sont la découverte de *Weissella* qui comporte *W. paramesenteroides* (précédemment *Ln. paramesenteroides*) et *Ln. oenos* comme nouveau genre, *Oenococcus oeni* **(Dicks *et* al., 1995)**. Onze nouvelles espèces ont été décrites (Tableau 1.4) : *Ln. gelidium* et *Ln. carnosum* isoler dans des produits à base de viande, *Ln. citreum* et *Ln. pseudomesenteroides* à partir des isolats cliniques, *Ln. fallax* de la choucroute, *Ln. argentinum* du lait cru de l'Argentine, *Ln. gasicomitatum* lié à la détérioration de viande, *Ln. kimchii* et *Ln. inhae* provenant du kimchi, *Ln. ficulneum* des figues mûres et *Ln. fructosum* (précédemment *Lb. fructosus*) (Figure 1.2). Les souches trouvées dans la microflore de la *Vespula germanica* présentent une homologie de 90% avec les espèces de *Leuconostoc* et peuvent constituent un nouveau taxon **(Reeson *et al*., 2003)**.

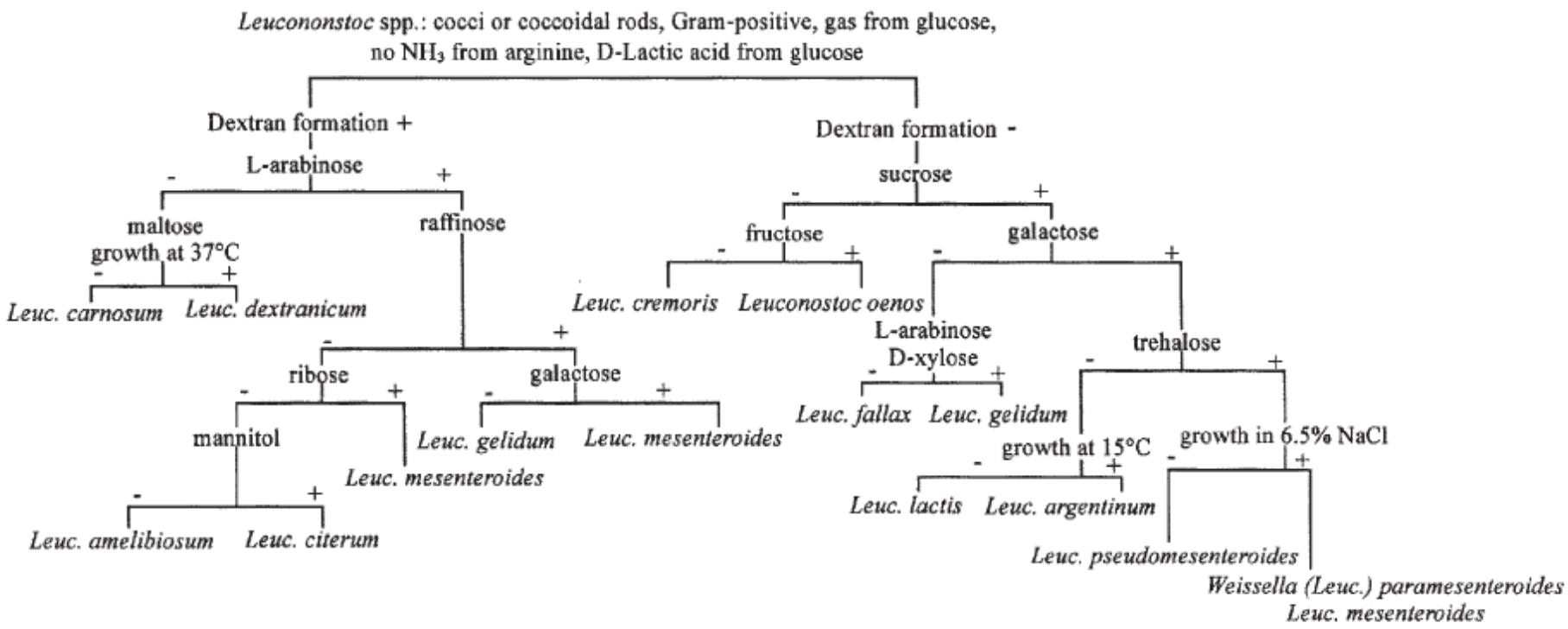


Figure 1.2: Schéma pour l'identification présomptive de *Leuconostoc spp* **(Mathot *et al*., 1994 ; Kihal *et al*., 1996)**

Tableau 1.4 : Les espèces incluent dans le genre *Leuconostoc* **(Hemme *et al.*, 2004)**

Les espèces récentes de *Leuconostoc*	L'ancienne nomenclature	Références
Ln. mesenteroides		Garvie, (1986)
subsp mesenteroides		
subsp dextranicum		
subsp cremoris		
Ln. lactis		Garvie, (1986)
Ln. pseudomesenteroides		Farraow *et al.*, (1989)
Ln. carnosum		Shaw et Harding, (1989)
Ln. gelidium		Shaw et Harding, (1989)
Ln. fallax		Martinez M. *et al.*, (1991)
Ln. citreum	*Ln. amelibiosum*	Takahashi *et al.*, (1992)
Ln. argentinum		Dicks *et al.*, (1993)
Ln. gasicomitatum		Bjorkroth *et al.*, (2000)
Ln. kimchii		Kim Chun et Han, (2000)
Ln. ficulneum		Antunes *et al.*, (2002)
Ln. fructosum	*Lactobacillus fructosus*	Antunes *et al.*, (2002)
Ln. inhae		Kim *et al.*, (2003)

1.4.7 Résistance des *Leuconostoc* au stress

Les espèces de *Leuconostoc* peuvent survivre à de longues durées dans des environnements défavorables aussi divers que le sucre, le pétrole ou les industries laitières. Elles sont restées viables pendant plusieurs années sur la surface (de gerle en bois), les moules en métal ou en plastique **(Devoyod *et al.*, 1998).**

L'environnement hostile favorise les phénomènes d'interaction à travers la formation des colonies visqueuses en présence de saccharose et des traces de minéraux, sous forme d'un biofilm qui protège les cellules contre les agents nuisibles **(Kim *et al.*, 2000).** Le lait caillé du fromage muri permet probablement la survie de

Leuconostoc qui a été détecté à un niveau cellulaire très élevé **(Mor-Mur *et al*., 1994 ; Devoyod *et al*., 1998).**

L'homéostasie du pH interne est essentielle pour la croissance de tout les microorganismes y compris les *Leuconostocs* mais la croissance bactérienne est un processus d'auto-inhibition par l'acidification du milieu externe et l'accumulation d'acide **(Cogan *et al*., 1994).** Par exemple, quand le pH du milieu externe diminue, le pH interne de la cellule de *Ln. mesenteroides* diminue aussi contrairement à *Lc. Lactis.* La croissance s'arrête quand les valeurs du pH interne atteintes 5.4, 5.7. En revanche, le pH cellulaire externe est considérablement influencé par le pH du milieu, la concentration et la nature des acides organiques **(Konings, 2002)**.

1.5 L'antagonisme des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques ont une action antagoniste envers d'autre microorganismes pathogènes et ou altérantes, celle-ci est le résultat de leurs propriétés inhibitrices soit par compétition pour les nutriments, soit par changement des paramètres physicochimiques du milieu, tels qu'une acidification et une production de métabolites antimicrobiens (**Tahiri, 2007**).

Les méthodes *in vitro* sont généralement appliquées pour mesurer l'action antagoniste des bactéries lactiques contre les bactéries pathogènes. Ces méthodes dépendent de l'antagonisme bactérie-bactérie qui régule la prolifération cellulaire et l'association d'une bactérie par les produits métaboliques de l'autre (**Jin *et al*., 1999**). Différents composés inhibiteurs produits par les bactéries lactiques présentent des effets différents sur les micro-organismes sensibles. L'effet bactéricide de bactériocines est dirigé vers les espèces à Gram positif étroitement liés à la bactérie productrice (**Jack *et al*., 1995**). Toutefois, d'autres substances antagonistes tels que l'acide lactique et de peroxyde d'hydrogène peut inhiber divers types de micro-organismes y compris les produits alimentaires issus des pathogènes (**Ito *et al*., 2003**).

L'action inhibitrice de bactéries lactiques (LAB) est principalement due à l'accumulation des principaux métabolites primaires comme les acides lactiques et acétiques, l'éthanol et de dioxyde de carbone. En outre, les LAB sont capables de produire également des composés antimicrobiens tels que l'acide benzoïque, le

peroxyde d'hydrogène, le diacétyle, l'acétoïne et les bactériocines. Les niveaux de production et les proportions de ces composés dépendent de la souche, des paramètres physiques du milieu **(Tannock *et al*., 2004).** Jack et *al*, (1995) ont montrés cette activité inhibitrice envers des germes à Gram positif des bactéries étroitement apparentées et la plupart du temps en raison de l'effet bactéricide de bactériocines. En outre, les LAB étaient encore en mesure de contrôler la croissance des germes à Gram négatifs, y compris les agents pathogènes alimentaires par la production d'acides organiques et le peroxyde d'hydrogène (**Lu et Walker, 2001; Ito *et al*., 2003**).

1.6 Les composés antimicrobiens des bactéries lactiques

L'antibiose est définie comme une interaction entre deux organismes dans laquelle un métabolite, généralement de faible poids moléculaire produit par l'un d'eux a un effet nocif sur l'autre, à faibles concentrations. Globalement, cette substance est généralement un produit de métabolisme secondaire **(Allemany agulló, 2001)**.

L'effet antimicrobien primaire des LAB se manifeste par la production de l'acide lactique et la diminution du pH (**Daeschel, 1989**). Par ailleurs, les bactéries lactiques produisent des substances antimicrobiennes différentes, qui peuvent être classés comme étant à faible poids moléculaire tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le dioxyde de carbone (CO_2), le diacétyle (2,3-butanedione), ou des composés non caractérisées et de haut poids moléculaire composés tels que les bactériocines (**Jay, 1982; Klaenhammer, 1988; Piard et Desmazeaud, 1991, 1992**). Dans l'ensemble, ils pouvant antagoniser la croissance des germes pathogènes et ou d'altération dans les aliments.

1.6.1 Les acides organiques

Les types et les seuils de production des acides organique durant la fermentation du lait généralement dépendant des souches des bactéries lactiques, composition du milieu et condition de croissance (**Lindgren & Dobrogosz, 1990**). L'effet antimicrobien des acides organiques c'est dans la réduction du pH (**Podolak *et al*., 1996**). Il a été proposé que le faible pH externe provoque une acidification du

cytoplasme de la cellule, tandis que l'acide non dissocié, étant lipophile, peut diffuser passivement à travers la membrane. L'acide non dissocié agit par l'effondrement du gradient électrochimique de protons, ou en modifiant la perméabilité de la membrane de la cellule qui se traduit par des perturbations de systèmes de transport de substrats (**Snijders *et al*., 1985**).

De ce contexte, L'acide lactique a un effet inhibiteur colossal contre les bactéries à Gram négative (**Fooks & Gibson, 2002a, 2002b**). Les carcasses de bovins ont été traités avec succès contre *E. coli* avec de l'acide lactique a 2% (**Gill & Badoni, 2004**), et il a un effet inhibiteur fort contre les bactéries à Gram positive (**Markas & Vuyst, 2006**). L'activité antimicrobienne de l'acide lactique pourrait résulter avec son infiltration a travers la paroi des cellules microbiennes (Figure 1.3), provoquant un stress intracellulaire sur l'homéostasie, la rupture des membranes, et l'accumulation de anions toxiques (**Ibrahim *et al*., 2008**).

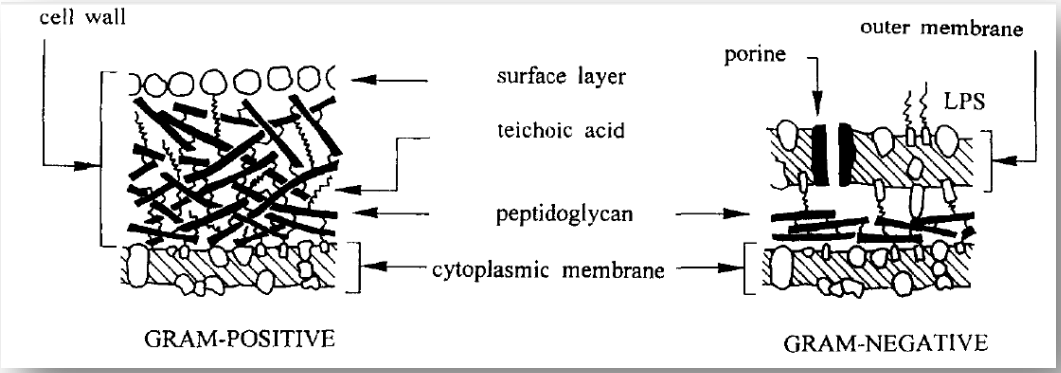


Figure 1.3 : Représentation schématique de la paroi de Gram+ et Gram-. LPS : Lipoplysaccaharide.

1.6.2 Le peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène est produit par les bactéries lactiques en présence d'oxygène à la suite de l'action de la flavoprotéine oxydases ou du nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) peroxydase. L'effet antimicrobien de H_2O_2 peut entraîner à partir de l'oxydation de groupes sulfhydryle provoquant la dénaturation d'un certain nombre d'enzymes, et de la peroxydation des lipides membranaires augmentant ainsi la perméabilité de la membrane (**Kong & Davison, 1980**). L'H_2O_2 peut également soit en tant que précurseur pour la production de radicaux libres bactéricide tels que le superoxyde (O_2) et hydroxyle (OH) radicaux qui peuvent endommager l'ADN (**Byczkowski & Gessner, 1988**).

1.6.3 Le dioxyde de carbone

Le dioxyde de carbone est produit principalement par les LAB hétérofermentaires. Le mécanisme précis de ses propriétés antimicrobiennes est encore inconnu. Cependant, le CO_2 peut jouer un rôle en créant un environnement anaérobie qui inhibe la décarboxylations enzymatiques, et l'accumulation de CO_2 dans la bicouche lipidique de la membrane peuvent provoquer un dysfonctionnement de la perméabilité (**Ammor *et al*., 2006**). Le CO_2 peut effectivement inhiber la croissance de micro-organismes colonisant de nombreux produits alimentaires, notamment des bactéries psychrotrophes Gram-négatives (**Farber, 1991**). Le degré d'inhibition par le CO_2 varie considérablement entre les organismes. CO_2 à 10% (v / v) pourrait faire baisser les chiffres totaux de bactéries de 50% (v / v), et à 20-50%, il a eu un une forte activité antifongique (**Ammor *et al*., 2006a**).

1.6.4 Le diacétyl

Le diacétyle est un composant de l'arôme, il est produit par presque tous les genres de LAB par fermentation du citrate. En effet, Harvey et Collins (1962) ont expliqués l'exigence d'un environnement acide pour sa biosynthèse. Il inhibe la croissance des bactéries à Gram négatives on réagissant avec l'utilisation d'arginine. Les bactéries à Gram négatif étaient plus sensibles au diacétyle de bactéries Gram-positives, anciennement, ils ont été inhibées par le diacétyle à 200 µg / ml (**Jay, 1986**).

Récemment, il est démontrer que le diacétyle à 344 µg / ml inhibe les souches de *Listeria, Salmonella, Yersinia, E. coli* et *Aeromonas* (**Ammor *et al*., 2006b**).

1.6.5 Les bactériocines des bactéries lactiques

Les bactériocines sont habituellement reconnues comme sûres, sont sensibles aux protéases digestives et ne sont pas toxiques pour les cellules eucaryotes **(Dortu *et al*., 2009)**. 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 peuvent être appliquées sous une forme purifiée, semi-purifiée ou sous la forme d'un concentré obtenu après fermentation d'un substrat alimentaire. Les bactéries productrices peuvent également être appliquées dans les produits alimentaires.

1.6.5.1 Définition

Le terme bactériocine à été réservé à des substances d'origine bactérienne répondant à des critères énumérés par Tagg *et al, (*1976)**,** essentiellement selon la présence d'un élément protéique biologiquement actif, un mode d'action qui est bactéricide, et un spectre d'inhibition étroit. Cette description est la première a être proposée **(Benabbou, 2009),** toutefois elle s'est avérée être limitante (**Stiles, 1994**), c'est pourquoi elle à subi des modifications au cours du temps pour arriver a les qualifiées comme « *des protéines ou des complexes de protéines avec une activité bactéricide contre les espèces généralement étroitement liées à la bactérie productrice* » **(Klaenhammer, 1988)** « *ou confinées dans la même niche écologique* » (**Klaenhammer, 1993)**, cette définition reste la plus largement acceptée (**Dortu *et al*., 2009**), sinon d'autres plus récentes existent, définissent les *bactériocines*, comme « *des produits extracellulaires de la synthèse des ribosomes bactériens, primaires ou modifiés, ayant un spectre d'activité bactéricide relativement étroit* » **(Bromberg , 2004),** ou bien les décrivait comme étant « *toute molécule de nature protéique, synthétisée par voie ribosomique et douée d'une activité bactéricide ou bactériostatique contre certaines bactéries Gram + proches de la souche productrice sur le plan phylogénétique* »

(Benabbou, 2009). Cette activité dirigée envers les bactéries *Gram* +, peut être expliqué par la couche supplémentaire des bactéries à *Gram* - composé de phospholipides, protéines et principalement par les lipopolysaccharides « *LPS* », cette couche est ainsi la barrière de protection des Gram négatif **(Abee *et al.,* 1995 ; Bromberg *et al.,* 2004 ; Dortu *et al.,* 2009).** Dans la plus part des cas les bactéries productrices exhibent une immunité spécifique contre leurs propre bactériocines **(Jeevaratnam *et al.,* 2005).**

Les bactériocines forment un groupe hétérogène de protéines antibactériennes distinctes selon : le spectre d'activité, le mode d'action, le poids moléculaire, l'origine génétique ainsi que leurs propriétés biochimiques **(Klaenhammer, 1988 ; Abee *et al.,* 1995 ; Dortu *et al.,* 2009),** dont la plupart sont cationiques, hydrophobes ou amphiphiles composées de 20 à 60 résidus d'acides aminés **(Naidu, 2006)**. Ainsi grâce aux caractérisations biochimiques et génétiques, quatre majeur classes existent répertoriées pour la première fois par **Klaenhammer (1993)** : (I) les lantibiotiques, (II) des peptides, thermostables, (III) d'autre thermolabile, (IV) en quatrième rang des protéines complexes dont l'activité nécessite l'association de fragments de glucides ou des lipides. La majorité des bactériocines produites par les bactéries lactiques associées avec de denrées alimentaires appartiennent aux classes I et II **(Jeevaratnam *et al.,* 2005)**.

Par ailleurs, les bactériocines qui éveillent plus d'intérêt demeurent les bactériocines de la classe I et ceux de la classe II. Les premières exercent généralement un large spectre d'action antimicrobienne si comparées aux secondes dont la spécificité est étroite. En revanche, ceux appartenant à la classe IIa montrent une activité anti-*Listeria* plus intéressante que les bactériocines de la classe I comme leucocin A, mesenterocin Y105 en plus de cette activité présentent un large spectre d'action dirigé contre les espèces de *Listeria, Enterococcus*, certains *Lactobacillus* ; par ailleurs, les bactériocines à savoir, sakacin G, pediocin PA-1 en plus de cette activité présentent un large spectre d'action dirigé contre d'autres microorganismes à *Gram* + moins étroitement liées : *Staphylococcus aureus, Brochotrix spp.*

1.6.5.2 Classification

La classification des bactériocines produites par les bactéries lactiques est proposée premièrement par Klaenhammer (1993) et modifiée par Nes *et al*, (1996) ; elles peuvent être classées selon leurs caractères biochimiques et génétiques en quatre classes :

a) Classe I : Les lantibiotiques

Lantibiotiques, une abréviation désigne toute « *lanthionine contenant des peptides antibiotiques* » **(Asaduzzaman *et al.,* 2009).** Issue de synthèses ribosomale et rendu bioactif par modification poste traductionnelle, ils constituent un groupe hétérogène de poids moléculaire inferieure à 5 kDa, ce sont thermostables agissant sur la structure de la membrane, ils sont largement modifiées après translation. Résultats de la formation des acides aminés soufrés inhabituels, lanthionine et β methyl-lanthionine. En effet, deux étapes cruciales sont nécessaires pour leur synthèse : Premièrement, la sérine et la thréonine sont soumises à une déshydratation enzymatique pour donner lieu à la déshydroalanine, respectivement (**Parada *et al.*, 2007**). L'exemple le plus connu de ce groupe c'est la nisin (**Braodbent *et al.*, 1989**).

Les lantibiotiques sont primitivement divisés en deux sous-classes basées sur les similarités structurelles : *Sous-classe « Ia »* relativement allongées, flexibles et chargées positivement. Généralement, elles agissent par la formation des pores dans la membrane cytoplasmique des espèces cibles sensibles. La nisin c'est le prototype de ce groupe. Et la *Sous-classe « Ib »* elles sont globulaires, plus rigide dans leur structure, chargées négativement. Elles intervenir par l'interférence avec des réactions enzymatiques de la bactérie sensible (**Deegan *et al.*, 2006**).

b) Classe II : peptides hydrophobiques thermostables

Des peptides de synthèse ribosomale bioactif après une modification poste traductionnelle par clivage de la séquence peptidique N terminale **(Jeevaratnam *et al.,* 2005 ; Naidu, 2006**). Ils sont de poids moléculaire inferieure à 10 kDa (faible taille), thermostable jusqu'au 121 °C, ayant une structure β-feuille, non-lanthionine. Elles ne contiennent pas d'acides aminés modifiés, leur point isoélectrique varie entre 8 et 10.

Suivant leur action *anti-listeria* et la diversité en structure, une classification plus exhaustive dont plusieurs sous-classes a été suggérée, les uns typique (a, b, c, d), et un autre atypique (f). Toutefois il est pertinent de noter qu'uniquement deux sous classes sont communément utilisées : IIa et IIb **(Naidu, 2006 ; Tahiri, 2007).**

- ✓ **Sous-classe IIa :**

Ce sont des « cystibiotique » contenant quatre résidus cystéine **(Naidu, 2006)**. ils contiennent de 27 à 48 acides aminés et ont tous une partie N-terminal hydrophobe contenant la séquence consensus -Tyr-Gly-Asn-Gly-Val- ainsi qu'un pont disulfure et une partie C-terminal moins conservée, hydrophobe ou amphiphile qui détermine la spécificité d'action (**Richard *et al*., 2006**). Elles ont toutes une activité contre *Listeria monocytogenes.* Certaines bactériocines des cette sous-classe contiennent également un deuxième pont disulfure dans leur domaine C-terminal qui semble être important dans la stabilisation de la structure tertiaire. Il paraître par ailleurs qu'il leur conférerait une meilleure activité antimicrobienne (**Dortu Carine & Thonart philippe, 2009**). Cette sous-classe contient les bactériocines leucocin A, mesenterocin Y105, pediocin PA-1 et curvacin A (Tableau 1.5) **(Klaenhammer, 1993 ; Ennahar *et al*., 1999 ; Naidu, 2006).**

- ✓ **Sous-classe IIb :**

Forme la plus grande sous classe. Ce sont des cystibiotiques contenant un pont S-S dans la moitié N-terminale. Elles comprennent les bactériocines ayant besoin de deux peptides pour être actives, il y a deux types de bactériocines qui peuvent être distingués : le type E (*Enhancing*) ou la fonction d'un des deux peptides est d'augmenter l'activité de l'autre et le type S (*Synergy*) ou les deux peptides sont complémentaires **(Dortu *et al*., 2009)**. Dans ce groupe il ya lactococcin G et plantaricins EF et JK **(Parada *et al*., 2007)**.

- ✓ **Sous-classe IIc :**

Ce sont cystibiotiques dépourvues de la séquence consensus -Tyr-Gly-Asn-Gly-Val- (celle de classe IIa et IIb), et ayant un pont S-S qui s'entent sur la section N et C-terminale **(Naidu, 2006).** Elles sont de petits peptides thermostables qui sont transportés par des peptides-leader. On trouve les bactériocines divergicin A et acidocin B (Tableau 1.5) **(Parada *et al*., 2007)**.

c) Classe III : Protéines thermolabiles

Elles amassent les protéines de taille supérieure à 30 kDa thermolabiles, la structure et le mode d'action est complètement différent des autres bactériocines produites par les LAB. Cette classe ne contient que quatres bactériocines : helveticin J produite par *Lactobacillus helveticus* A, helveticin V, enterolysin A produite par *Enterococcus faesium, zoocin* produite par *Spreptococcus zooepidemicus* et la millericin B produites par *Streptococcus milleri*, on peut ajoute acidofilicin A, lactacin A et B (Tableau 1.5) **(Papagianni, 2003 ; Dortu *et al*., 2007 ; Parada *et al*., 2007).**

d) Classe IV : Protéines complexes

Des peptides nécessitant un groupement carbohydraté (glycoprotéines) ou lipidique (lipoprotéines) afin d'être active. Elle regroupe la plantaricin S, leuconocin S, lactocin 27, pediocin SJ-1 **(Naidu, 2006 ; Klaenhammer, 1993)**. Néanmoins, aucune bactériocine n'a été purifié pour cette classe ; ceci est due probablement aux propriétés cationiques et hydrophobes leurs permettant la formation de complexes avec d'autres molécules présentent dans l'extrait brut, un phénomène déjà observé avec la plantaricin S **(Cleveland *et al.,* 2001 ; Dortu *et al.,* 2009).**

Tableau 1.5 : Exemples des bactériocines isolés à partir produits alimentaires frais ou fermentés **(Cleveland *et al*., 2001).**

Source	Souches	Active contre	Références
Les produits probiotiques	*Streptococcus* sp. CNCM I 841	*Clostridium* sp., *L. monocytogenes*	Gomez *et al*., 1997.
Fromage Bulgarien jaune	*Lb. delbrueckii* sp.	*L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Ent. faecalis*, *E. coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*	Miteva *et al*., 1998.
Végétaux	*Enterococcus mundtii*	*L. monocytogenes*, *C. botulinum*	Bennik *et al*., 1998.
Radis	*Lc. lactis* supsp. *cremoris*	*Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Leuconostoc* spp.	Yildirim and Johnson, 1998.
Saucisson sec	*Lb. plantarum* UG1	*L. monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *C. perfringens*, *C. sporogenes*	Enan *et al*., 1996.
Fromage français à pate molle affiné à la moisissure	*Carnobacterium piscicola* CP5	*Carnobacterium*, *Listeria* et *Enterococcus* spp.	Herbin *et al*., 1997.
Munster fromage	*Lb. plantarum* WHE92 (PedAcH)	*L. monocytogenes*	Ennahar *et al*., 1996.
Viande	*Leuconostoc carnosum* Ta11A (LeuA).	*L. monocytogenes*	Felix *et al*., 1994.
Lait de chèvre	*Leu. mesenteroides* Y105	*L. monocytogenes*	Héchard *et al*., 1992.
Choucroute	*Lc. lactis* subsp. lactis (Nis)	*L. monocytogenes*	Héchard *et al*., 1992.

1.6.5.3 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 Gram négatif. 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 qui est 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 composants de la force proton motrice, à la cessation rapide des activités cellulaires et à la mort de la cellule **(Bauer *et al*., 2005 ; Dortu *et al*., 2009)**.

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 (Figure 1.4) **(Héchard *et al*., 2001 ; Bauer *et al*., 2005).**

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 **(Oppegard *et* al., 2007)**. Castellano *et al*, (2007) ont récemment montré que les deux peptides composant la lactocine 705 ont des activités bien spécifiques. La lactocine 705a interagit avec la surface de la membrane cellulaire et la déshydrate, ce qui permet à la lactocine 705b de former des pores.

c) Les bactériocines de classe III

Le mode d'action de ces bactériocines diffère complètement des bactériocines des autres classes. Par exemples : L'entérolysine A, la zoocine A et la milléricine B agissent par l'hydrolyse des liens peptidiques des peptidoglycanes des cellules sensibles. La zoocine A a un spectre d'action étroit alors que l'entérolysine A et la milléricine B ont un spectre d'action large, L'helvéticine J a un mode d'action bactéricide **(Nilsen *et al*., 2003).**

1.6.5.4 L'application des bactéries productrices de bactériocines

L'utilisation des bactéries productrices de bactériocines peut être intéressante au niveau économique. Les bactéries productrices de bactériocines peuvent être ajoutées comme starter dans des produits fermentés ou comme culture protectrice.

Les LAB bactériocinogénique ont été utilisés avec succès pour le contrôle des bactéries pathogènes et ou altérantes, notamment dans les fermentations des olives vertes espagnoles avec *Lactobacillus plantarum* produisant plantaricin S et T **(Ruiz-Barba *et al*., 1994)**, dans les fermentations des saucissons avec *Lactobacillus curvatus* produisant curvacin A **(Vogel *et al*., 1993),** dans le contrôle de la détérioration du viande de bœuf avec *Leuconostoc gelidium* UAL187 productrice de leucocine A **(Leisner *et al*., 1996).** Et le contrôle de *Listeria innocua* dans les bouillons de viande par *Lactobacillus casei* CRL705 bactériocinogénique **(Castellano *et al*., 2004).**

Lacroix *et al,* (2011) ont étudiés l'application des bactéries lactiques et ou leurs bactériocines produites pour la prévention et la réduction du niveau de colonisation microbienne (contamination) dans un produit alimentaire soit par contact direct des souches lactiques ayant un potentiel antimicrobien ou l'addition d'une quantité adéquate de leurs bactériocines dans l'aliment. Ils ont aussi démontré leur efficacité probiotique.

1.6.6 Les bactériocines de *Leuconostoc*

La production de bactériocine par *Leuconostoc spp*. a été observée dans les années 1950, mais ce n'est qu'au 1984 où l'activité antagoniste de *Leuconostoc spp*. a été signalé, puis des études amples sur les bactériocines produites par *Leuconostoc spp*. ont été menées, y compris mésentéricine Y105 produite par *Leuconostoc*

mesenteroides subsp *mesenteroides,* leucocine A-VAL 187 produite par *Leuconostoc gelidum,* carnosin 44A produite par *Leuconostoc camosum*, et leuconocin S, produit par *Leuconostoc paramesenteroides*. Les bactériocines produites par les *Leuconostoc* ne peuvent pas être actifs contre tous les bactéries lactiques, mais tous comprennent *Listeria* dans leur spectre d'activité. La mésentéricine Y105 est rapporté à être exclusivement active contre *Listeria spp* **(Stiles, 1994)**.

1.6.6.1 Mesenterocin Y105

Mésentéricine Y105 (Mes-Y105) est une bactériocine de classe « IIa » **(Ennahar *et al*., 2000)** à partir de *Leuconostoc mesenteroides*. Mes-Y105 est constitué par 37 résidus et est réticulé par un pont disulfure entre les résidus C9 et C14. Il a la séquence suivante: KYYGNGVHCTKSGCSVNW18GEAASAGIHRLANGGNGFW37 **(Héchard *et al*., 1995)**. Mes-Y105 est un peptide antibactérien efficace très sélectif agit en particulier sur *Listeria monocytogenes*. Il est capable de diminuer le potentiel de membrane des cellules cibles, mais il modifie également de nombreux systèmes de transport (**Héchard *et al*., 1992 ; Maftah *et al*., 1993**). La première relation structure-fonctions de Mes-Y105 a été proposée après purification **(Fleury *et al*., 1996)**. En effet, d'autres peptides lytiques non spécifiques, où de nombreux modifications et suppressions de séquence peut encore maintenir l'activité biologique, la longueur totale de peptide et de l'intégrité de pont disulfure sont obligatoires pour l'activité de Mes-Y105.

Fleury *et al*, (1996) ont rapportés que la Mes-Y105 dans une solution tampon et la comparaison avec d'autres peptides antimicrobiens, une structure a été proposé avec une N-terminal capable d'être impliquée dans l'interaction avec un récepteur putatif pendant la caractérisation, l'hélice amphipathique des résidus -17-31 permettrait aux lipides de se lier à la membrane (Figure 1.5). Plusieurs toxines étroitement liés à Mes-Y105 ont été étudiées par fluorescence pour caractériser leur interactions avec les phospholipides **(Chen *et al*., 1997 ; Chen *et al*., 1998)** et par RMN on proposent des structures pour A et B2, leucocine, carnobacteriocin dans une solution tampon, et dans les micelles de détergents **(Fregeau-Gallacher *et al*., 1997)**. Actuellement, plusieurs modèles de membrane dans les interactions compatibles et la cytotoxicité sont proposées, alors qu'il ya encore des contradictions des changements structurels et des

mécanismes différents pour la toxine induit la perméabilisation des membranes **(Castano *et al*., 2005)**.

- ✓ **Mode d'action.**

La mésentéricine Y105 a été montré pour empêcher le transport à la fois de la leucine et de glutamate par la dissipation du potentiel de membrane et d'induire l'efflux des acides aminés pré accumulés dans les cellules sensibles de *Listeria monocytogenes* **(Maftah *et al*., 1993)**.

En outre, un mannose PTS perméase (IIE t^{Man}) a été proposé comme une cible moléculaire pour mésentéricine Y105 (Figure 1.4) **(Dalet *et al*., 2001; Héchard *et al*., 2001)** et leucocine A **(Ramnath *et al*., 2000).**

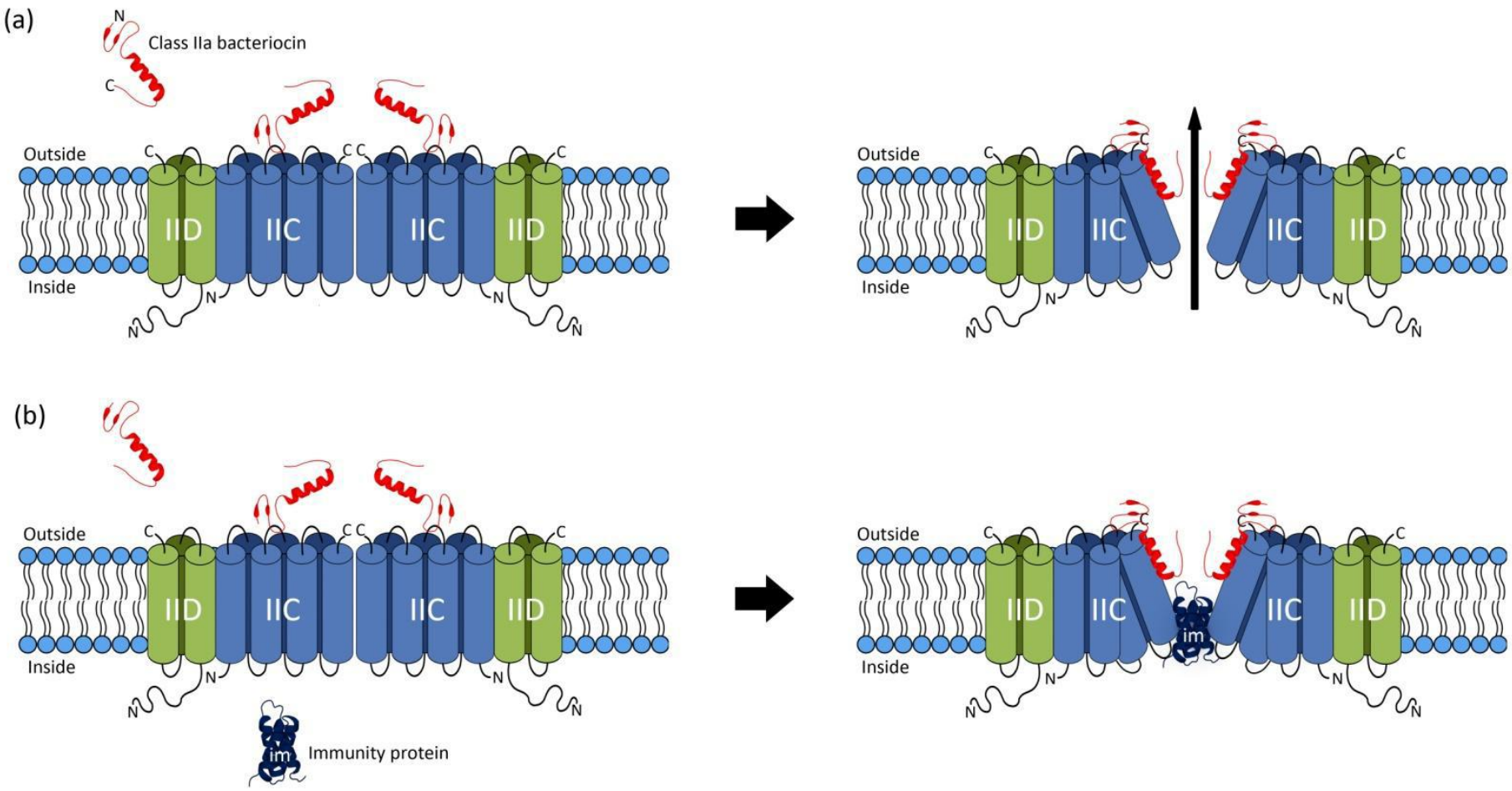


Figure 1.4 : Mode d'action de bactériocines de classe IIa (a) et de l'immunité (b). Le N-terminal β-feuille de la bactériocine (rouge) se lie à une boucle extracellulaire (a) du domaine EIIt^{Man} IIC (à gauche). Ensuite, l'hélice C-terminale interagit avec hélices transmembranaires de la SII et / ou protéines IID (à droite) en provoquant des modifications de conformation, ce qui conduit à la formation de pores et éventuellement la mort cellulaire. Dans les cellules immunitaires (b), sert d'intermédiaire bactériocine les changements conformationnels mêmes, mais le pore est bloqué par une protéine d'immunité spécifique (bleu foncé) qui se lie étroitement au complexe EIIt^{Man}-bactériocine **(Wan, 2012) adapté de Kjos *et al.* (2011).**

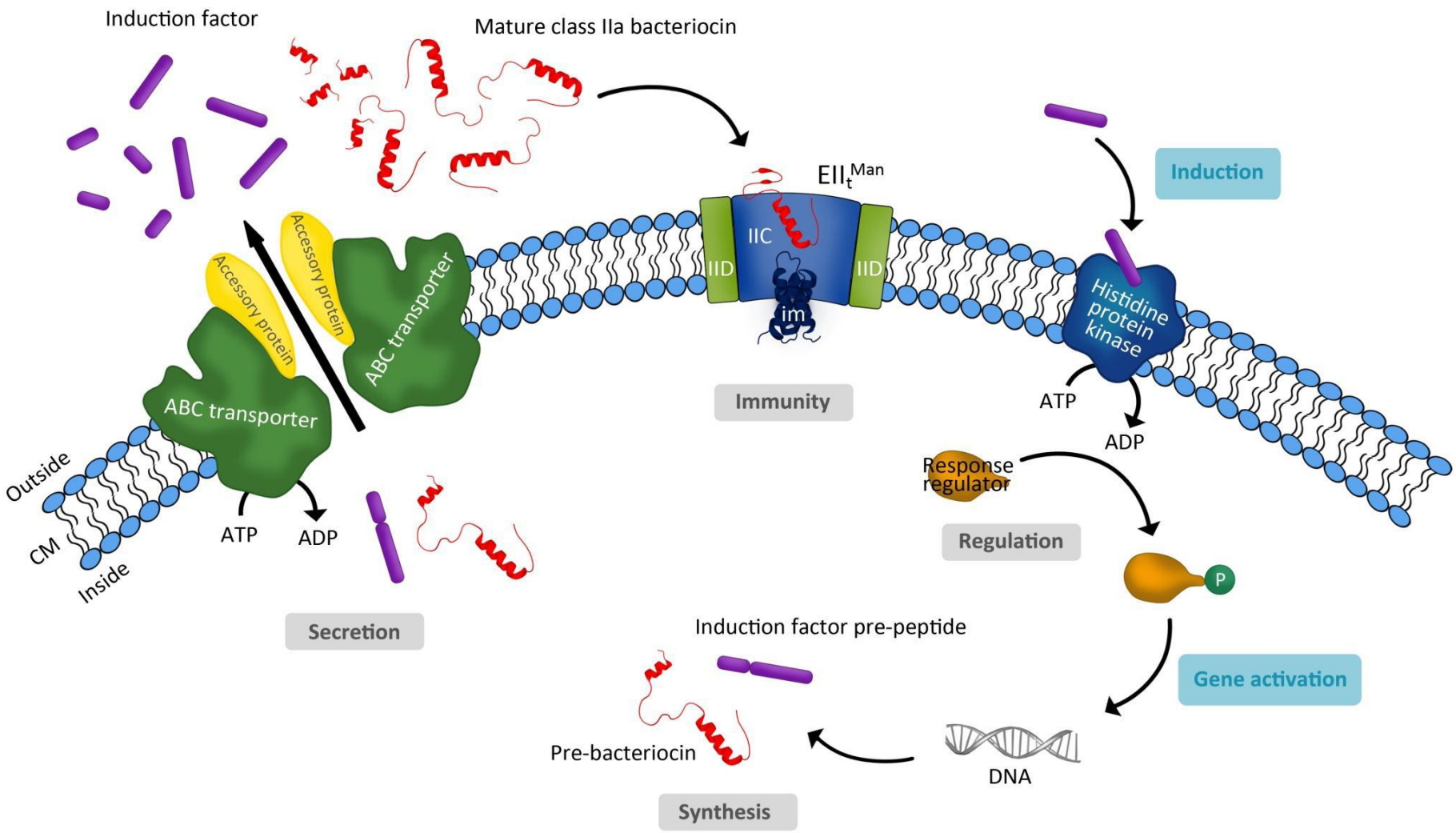


Figure 1.5 : La production de bactériocine de classe IIa: trois composants du système de régulation, la biosynthèse, la sécrétion et l'immunité. CM, la membrane cellulaire. Im, protéine d'immunité. EIItMan, le mannose PTS perméase, bactériocine de classe IIa récepteur. IIC et IID sont les deux domaines EIIt^{Man} qui interagissent avec les bactériocines de classe IIa **(Wan, 2012)** adapté du **Ennahar *et al*. (2000)**.

1.6.6.2 Leucocin A

Ces bactériocines partagent plusieurs propriétés. Leur spectre d'inhibition est généralement limitée à *Leuconostoc*, les entérocoques, *L. monocytogenes* et certains lactobacilles, leur poids moléculaire est dans la gamme de 2,0 à 6,0 kDa et ils sont généralement produites à des températures de réfrigération **(Lewus *et al*., 1992; Yang et Ray, 1994)**. Leuconocin S **(Lewus *et al*., 1992)** et carnocin 54 **(Keppler *et al*., 1994)** ont été trouvés à être des glycoprotéines. La remarquable similitude des bactériocines produites par les *Leuconostoc* est confirmée par le fait que leucocine A-UAL187, produit par *Ln. gelidum* UAL 187 et « leucocine B-Tal la » produit par *Ln. carnosum* Tal la, qui ont été caractérisés au niveau moléculaire **(Hastings *et al*., 1991; Felix *et al*., 1994)** ont été jugés identiques et de ne diffèrent que par deux résidus d'acides aminés à partir de mésentéricine Y105, produite par *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* **(Felix *et al*., 1994)**.

- ✓ **Mode d'action**

Une étude récente souligne fortement que le leucocine nécessite effectivement une interaction avec un récepteur chiral à la surface de la cellule cible pour être actif **(Yan *et al*., 2000)**. L'énantiomère D de leucocine A n'est pas actif contre 10 souches différentes, alors que tous sont sensibles à leucocine A naturel. Ces résultats indiquent fortement que l'IIE t^{Man} pourrait être le récepteur chiral nécessaire pour l'interaction bactériocine à la surface des cellules cibles (Figure 1.7). En conséquence, l'IIE t^{Man} est proposé d'être une molécule cible pour tous les classe « IIa » bactériocines de *Listeria monocytogenes, Enterococcus faecalis* et probablement dans d'autres bactéries sensibles **(Héchard et Sahl, 2002)**.

1.6.11 Rôle technologique de *Leuconostoc*

Le *Leuconostoc* joue un rôle important dans la technologie des produits laitiers, en particulier par la production de composés de l'arôme et du gaz. Le rôle de *Ln. mesenteroides* subsp *cremoris* dans la production des arômes a été bien décrit (**Vedamuthu, 1994**). Le *Leuconostoc* peut cré des ouvertures suite a la production du CO_2 dans l'industrie fromagère surtout dans le Roquefort.

Dans la production de fromage de Roquefort, le *Leuconostoc* représente environ 5% à 10% de la concentration par rapport au *Lactococcus*, c'est à dire $5x10^7$ cellule/ml de lait. Des résultats optimals sont obtenus avec des souches sélectionnées de la sous-espèce *Ln. mesenteroides* subsp *mesenteroides* utilisées comme cellules concentrées (**Devoyod & Poullain, 1988**). Dans quelques cas, la population de *Leuconostoc* initialement présents dans le lait et provenant de l'environnement et peuvent crée les ouvertures désirées. Le composé majeur lié à l'utilisation de *Leuconostoc* dans les produits laitiers est le diacétyle, l'acétate et l'éthanol dans la formation d'arôme (**Vedamuthu, 1994**).

- Le potentiel probiotique des *Leuconostoc* : Étant donné que certains micro-organismes actuellement proposé aux consommateurs, le *Leuconostoc* ne colonise pas les voies de l'intestin, et leur effet sur l'hôte par action microbienne devrait donc être faible, sauf en cas d'ingestion à des concentrations cellulaires élevées. Récemment, des études sur la faisabilité de la lutte contre la diarrhée chez les enfants par l'alimentation du lait fermenté a révélés que le produit laitier traditionnel dite « Dahi » contenant 10^8 /g de *Lc. lactis* et *Ln. mesenteroides* peut réduit la durée moyenne de la diarrhée de 0,3 jour (**Agarwal & Bhasin, 2002**).

- **Production des exopolysaccharides :** *Ln. mesenteroides* produit des exopolysaccharides (EPS), qui sont homopolysaccharide composé de α-D-glucane tels que les dextranes principalement composé d'un résidus a liaison α-(1 ,6) à ouverture variable (souche spécifique) et degrés de ramification et d'alternances composé de α-(1, 3) et α-(1, 6). Le processus de biosynthèse est externe et nécessite le saccharose (**De Vuyst *et al*., 1999**).

- Production des vitamines : Les souches de *Ln. mesenteroides* productrices de quantités significatives de ménaquinones ont été caractérisées et serait utile comme ferments lactiques des produits laitiers (et autre), fermentations alimentaires ou des suppléments aux régimes pour prévenir les maladies de carence en vitamine K (**Morishita *et al*., 1999**). Récemment, la production de l'acide folique (vitamine B9) a été rapportée dans *Ln. lactis* et *Ln. paramesenteroides* (**Sybesma *et al*., 2003**).

1.7 Le genre *Listeria spp*

Le genre *Listeria* appartient à la branche phylogénétique des *Clostridium*, voisin des genres *Brochothrix, Staphylococcus, Bacillus, Lactobacillus* et *Streptococcus* **(Avril *et al.*, 2000)**. Depuis la première description de *Listeria* en 1926, la littérature a mentionné huit espèces: *L. monocytogenes* en 1926, *L. denitrificans* en 1948, *L. grayi* en 1966, *L. murrayi* en 1971, *L. innocua* en 1981, *L. welshimeri* et *L. seeligeri* en 1983, *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* en 1985 et *L. ivanovii* subsp. *londonienesis* en 1992. Deux sont pathogènes : *Listeria ivanovii* et *Listeria monocytogenes* **(Rocourt *et al.*, 2003 ; Larpent, 2004 ; Le Mennier et Leclercq, 2009)**.

1.7.1 Morphologie

Listeria spp. est un petit bacille à Gram positif, régulier, non sporulant, de 0,4 à 0,5 mm de diamètre sur 0,5 à 2 mm de longueur, a des extrémités arrondies, quelques cellules peuvent être incurvées. Les cellules sont isolées ou regroupées en courtes chaînes, elles font parfois des angles V entre elles, non acido- alcoolo résistantes, non capsulées, aérobies anaérobies facultatifs.

Peu ou immobiles à 37° C, *Listeria* est toujours mobile à 22- 25° C. Cette particularité est un caractère important dans le diagnostique bactériologique. La ciliature est de type péritriche, avec un nombre de flagelles compris entre 1-5 et la mobilité est caractéristique car la bactérie semble tourner sur elle-même.

Cette mobilité à 22° C permet également de différencier *Listeria* des bactéries immobiles comme la plupart des *Corynebacterium* **(Rocourt, 2000; Larpent, 2004)**.

1.7.2 Caractères culturaux

Les *Listeria* se développent bien sur les milieux usuels. Leur croissance est favorisée par l'addition de glucose à la concentration 0,5 % ou l'utilisation de milieux à base de tryptose **(Rocourt, 2002; Larpent, 2004)**.

Sur gélose nutritive, les colonies de 24-48h à 37°C ont un diamètre de 0,5 à 1,5 mm, sont arrondies, lisses à bords régulières et transparentes. Elles apparaissent gris bleuté par illumination normale. La colonie, parfois gluante, s'émulsifie facilement et peut laisser une trace sur la gélose.

Sur gélose au sang, quelques espèces sont ßéta- hémolytiques. La mise en évidence de ce caractère est importante car elle permet de faire la différence entre les espèces et de faire la distinction entre les souches non hémolytiques, donc non virulentes. Dans le cas équivoque, nous aurons recours au test de Camp, qui permet de confirmer ou d'infirmer l'hémolyse **(Rocourt, 2002)**.

En bouillon glucosé, un trouble intense et homogène apparaît en 18 heures. Dans Les vielles cultures, les colonies s'élargissent et s'opacifier, les colonies de forme « rough » sont plus larges.

1.7.3 Physiologie

Relativement, les *Listeria spp.* ne sont pas exigeantes au point de vue nutritionnel et requièrent généralement la biotine, la riboflavine, la thiamine et les acides aminés (cystéine, glutamine, isoleucine, leucine et valine) pour leur croissance optimale.

1.7.3.1 Température

Listeria se développe à des températures allant de 1 à 45°C. C'est un germe psychrotrophe, il a la faculté de se développer à une température égale ou inférieure à 7°C. La température optimale de la croissance est de 30 à 37°C **(kim *et al.*, 2008 ; Vanegas *et al*., 2009)**.

La croissance à 4°C est une particularité exceptionnelle de *Listeria.* Cette caractéristique est utilisée comme méthode d'enrichissement pour les produits contaminés ou pluri-microbiens **(Berche *et al*., 2000 ; Linton *et al*., 2008 ; Le Mennier et Leclercq, 2009)**.

Listeria n'est pas considérée comme un germe thermorésistant. Elle est rapidement détruite à 60°C. Cependant, un traitement thermique tend à affaiblir la bactérie qui devienne plus sensible aux autres facteurs agressifs.

1.7.3.2 Sels

Listeria peut se développer sur des milieux contenant jusqu'à 10% de chlorure de sodium. Sa croissance n'est pas inhibée par le thiocyanate de potassium. Elle peut croitre sur gélose Mac Conkey en présence de 0,25% d'acétate de thallium, de 3,75% de

thiocyanate de potassium, de 0,04% de tellurite de potassium, de 0,01% de chlorure **(Kim et *al*., 2008)**.

1.7.3.3 pH

Listeria spp. peut se développer dans des pH variant de 5,6 à 9,6. Son pH optimal est voisin de 7 avec une tendance plutôt alcalin. Des études ont néanmoins montrées que *Listeria monocytogenes* se développe à des pH inférieurs à 5, mais la tolérance à ces pH est plus faible qu'aux pH basiques **(Larpent, 2004)**. Ainsi, le minimum de pH exigé pour la croissance des *Listeria* se situe bien au-dessous de 5,6. Cette réaction dépend cependant de la température d'incubation : à 4°C et pH 5,0, les populations diminuent, après 67 jours de stockage, à 13° C au même pH, la population atteint 1. 10^8 UFC/ ml.

1.7.4 Caractères antigéniques

Dans le genre *Listeria* on distingue plusieurs types de marqueurs de surface tels que les antigènes somatiques (O) et les antigènes flagellaires (H). Ils permettent l'identification immunologique et le sérotypage par l'emploi d'anticorps mono ou polyclonaux correspondants aux 15 antigènes somatiques O (notés de I à XV) et 05 antigènes flagellaires H (notés de A à E). L'assemblage de ces différents facteurs dans une même bactérie permet de reconnaître actuellement 17 sérovars **(Larpent, 2004)**. Un même sérotype peut se retrouver chez deux espèces différentes à l'exception des souches de sérotype 5 qui appartiennent toutes à l'espèce *Listeria ivanovii.*

Actuellement, il est bien connu que le sérovar 4b de *Listeria monocytogene* est le plus impliqué dans le cas de listériose animale et humaine **(Rocourt, 2002 ; Larpent, 2004)**.

1.7.5 Ecologie

Listeria est une bactérie mésophile, ubiquitaire, Elle est présente dans le sol, plantes, terre, végétation, ensilage et eaux **(Larpent, 2004)**.

La fréquence élevée avec laquelle on isole ce germe du sol et des plantes, la capacité des *Listeria* à se multiplier à basse température, la possibilité de survivre pendant de longues périodes dans le sol, implique une existence saprophytique certaine **(Baylon, 1987)**.

1.7.6 *Listeria* et le lait cru

Le lait cru est un excellent milieu de culture pour *Listeria* car il ne subi aucun traitement thermique et sa valeur nutritionnelle est favorable pour son développement, **(Kim *et al*., 2008 ; Linton *et al*., 2008)**.

La survie de *Listeria monocytogenes* dans le lait cru résulte d'une série complexe d'interactions Influencées par l'adaptation de cette bactérie par rapport à la composition de l'aliment, à sa microflore originelle et aux conditions du processus technologique et de stockage **(Wagner, 2008)**. La contamination du lait cru par *Listeria monocyrogenes* est fonction de la situation géographique.

- **Origine de la contamination du lait cru**

Dans le cas d'une contamination interne ou directe, la bactérie peut traverser le tractus intestinal de l'animal, passer dans la circulation sanguine et contaminer le lait au moment de son excrétion. Alors que la contamination externe et indirecte viendra de l'environnement contaminer par *Listeria*. Cette voie est la principale source de contamination du lait cru **(Bemrah *et al*., 1998 ; Linton *et al*., 2008)**.

Des études effectuées aux USA sur 650 échantillons de lait cru et au Canada sur 315 échantillons de lait cru, ont montrées que respectivement 1,3 et 5,4% des tanks à lait étaient contaminés par *Listeria monocytogenes* **(Lebres, 2006)**. Cette fréquence de contamination varie également avec la saison : un plus grand nombre de laits crus sont contaminés par *Listeria monocytogenes* au printemps et en été **(Marth, 1986)**. Ces contaminations peuvent être à l'origine d'épidémies de listérioses. En effet l'augmentation importante de l'incidence des listérioses est liée à plusieurs facteurs : L'augmentation importante de la fabrication et de commercialisation des produits alimentaires, la généralisation de la conservation par le froid qui peut favoriser l'émergence de *Listeria monocytogenes*, l'augmentation des populations sensibles aux *Listeria monocytogenes* qui sont représentées par les personnes âgées (>65 ans), les sujet immunodéprimés (victimes du cancer, personne greffées ou en hémodialyse, malades du SIDA) (**Wagner *et al*., 2008**).

1.7.7 Listériose

1.7.7.1 Listériose humaine

Avant 1926, un cas d'infection du liquide cérebrospinal (Paris 1919) était, par erreur, attribué au bacille diphtérique (*Corynebacterium diphteriae*) ; chose corrigée plus tard car il s'agissait bien de *L. monocytogenes*. En 1929, au Danemark, *L. monocytogenes* est isolée de cultures de sang à partir de patients atteints d'une monocytose infectieuse. En 1936, aux Etats Unis, on établit que la listériose est la cause de septicémie chez les nouveaux nés et de la méningite chez l'adulte. Au-delà des années 1980, la listériose demeura une maladie relativement obscure n'attirant pas beaucoup d'attention. Au-delà, il devînt apparent que *L. monocytogenes* cause des maladies extrêmement sérieuses d'origine invasive et surtout alimentaire menaçante vue l'extension économique de l'industrie agroalimentaire. Concernant les épidémies de listériose, celles-ci peuvent regrouper un nombre important de cas. Le taux moyen de mortalité de listériose humaine est 30% (**Wagner, 2008**). Il est plus élevé que celui des autres pathogènes contaminants (**Mead, 1999 ; Mead, 2006**) tels que *Salmonella enteritidis* (0,38%), *Campylobacter spp.* (0,02-01%) et *Vibrio spp.* (0,005-0,01%). En Algérie, les résultats portés par Mossadek *et al*, (2007) ont confirmés la présence de *L. monocytogenes* au taux de 2.61% qui prouve qu'on n'est pas à l'abri d'une éventuelle épidémie.

1.7.7.2 Listériose animale

La listériose affecte différentes espèces animales, elle peut évaluer sous des formes cliniques de façon sporadique ou endémique. Elle peut être également retrouvée en portage asymptomatique. Chez les bovins, la listériose se présente habituellement et essentiellement sous deux formes cliniques: l'avortement, l'encéphalite ou méningo-encéphalite (**Sanaa, 1994**). Cependant, on peut aussi observer des formes septicémiques chez le jeune veau ou des mammites à Listeria chez la vache, mais celles-ci sont proportionnellement plus rares. Les cas de listériose recensés sont plus fréquents en hiver et au printemps et sont corrélés positivement à une ingestion plus importante d'ensilage (**Watkins et Sleath, 1981**). Selon le rapport de

l'AFSSA, les résultats des investigations sur le portage et l'excrétion mammaire de *Listeria monocytogenes* sont d'une grande variabilité. Le portage peut aller de 0,01% jusqu'à 5 voire 18 à 20 % lors de contrôles successifs et systématiques sur des laits de vaches, de brebis ou de chèvres apparemment saines (**AFSSA, 2000**).

Introduction

De nouvelles sources alimentaires devrait être d'avantage exploitées pour faire variée l'alimentation humaine et aussi de bénéficier de nouveaux ingrédients fonctionnels et des composants alimentaires naturels. L'Algérie est parmi les pays africains et arabes, où les conditions d'élevage des vaches sont difficiles, pour sortir de cette situation en développant un système d'élevage pour les animaux locaux comme le dromadaire (**Anonyme, 2006**). La microflore bénéfique du lait de chamelle représentée par les bactéries lactique est une source potentielle de matériel biologique utilisé dans les technologies agroalimentaires **(Yagil, 1982 ; Lhoste, 2004)**.

Les bactéries lactiques (LAB) sont largement utilisées par l'industrie alimentaire dans la production de produits fermentés et comme outils pour la sécurité alimentaire (**Mezaini *et al*., 2009**). Ces micro-organismes produisent plusieurs substances ayant un potentiel antimicrobien, tels que des acides organiques, CO_2 et le peroxyde d'hydrogène (**Ito *et al*., 2003**). Certaines souches de LAB sont capables de bactériocines producteurs (**Jack *et al*., 1995**), des polypeptides présentant une activité antimicrobienne spécifique contre un groupe de bactéries de la même espèce ou différents (**Mataragas *et al*., 2003 ; Moraes *et al*., 2010** ; **Koo *et al*., 2012**).

Avec l'augmentation de la demande des consommateurs pour des produits qui sont moins transformés et exempts de conservateurs (**Álvarez *et al*., 2006**), LAB antagonistes ou leur bactériocines ont été de plus en plus utilisé pour contrôler les agents pathogènes dans certains aliments (**Holzapfel *et al*., 1995 ; Nakamura *et al*., 2011**). Plus précisément, bactériocines représentent une solution intéressante pour la sécurité alimentaire, ils ne causent pas d'altération du goût ou de l'odeur des produits finaux (**Cleveland *et al*., 2001**). Certaines bactériocines ont déjà caractérisés une activité antimicrobienne contre de plusieurs pathogènes et micro-organismes d'altération (**Castellano *et al*., 2004 ; Guessas *et al*., 2005 ; Dortu *et al*., 2009**).

L'utilisation de ces outils de sécurité microbiologique des aliments a augmenté l'isolement des cultures nouvelles qui LAB comme le *Leuconostoc* qui sont capables de produire des bactériocines ou des substances analogues. De nombreux travaux ont été focalisés sur l'étude de l'application de *Leuconostoc* pour contrôler et maîtriser les

germes pathogènes comme *Listeria* (**Hastings *et al*., 1991 ; Héchard *et al*., 1992 ; Felix *et al*., 1994 ; Osmanagaoglu, 2003 ; Nakamura *et al*., 2011**)

Une préoccupation majeure pour l'industrie alimentaire est les micro-organismes pathogène psychrotrophes, omniprésent dans la nature, la bactérie *Listeria innocua*. Sa capacité à survivre dans diverses conditions environnementales, telles que la réfrigération (**Kamat *et al*., 1996**), à des pH aussi bas que 3,6 dans les aliments (**Larpent *et al*., 2004**), à des concentrations de sel allant jusqu'à 10% (**Marth *et al*., 1986**), contribue de manière significative à son statut danger. La capacité des *Leuconostocs* pour produire des bactériocines à activité anti-Listeria a gagné beaucoup d'intérêt dans l'amélioration de la sécurité des différents aliments.

L'objectif principal de ce présent travail est focalisé sur l'isolement et la caractérisation de *Leuconostoc* autochtones, productrices de substances antimicrobiennes actives contre des germes pathogènes et ou d'altération. Le but consistait donc à les utiliser autant que cellules ou des métabolites, pour maîtriser les microorganismes pathogènes, visant à la fois d'améliorer la sécurité du produit, par inactivation des pathogènes, et de sa stabilité par extension de sa durée de vie, en inhibant les germes responsables d'altération, et d'autre part, une meilleure exploitation des sources alimentaires pour faire varier l'alimentation humaine et aussi de bénéficier de nouveaux ingrédients fonctionnels.

Pour le réaliser, notre travail s'articule sur trois axes :

- ➔ **Axe 1 :** l'objectif spécifique été d'isoler, et d'identifier phénotypiquement basant sur les tests physiologiques et biochimiques les espèces de *Leuconostoc* ainsi isolées à partir du même milieu « le lait cru de chamelle ».
- ➔ **Axe 2 :** la sélection *in vitro* reposant sur des méthodes dite directes et d'autres indirectes en faisant un *screening* pour la sélection des souches de *Leuconostoc* à activité antagonistes.
- ➔ **Axe 3 :** un suivi cinétique en fonction du temps dans un milieu lait écrémé à 0.3% d'extrait de levure des souches pathogènes en culture pure et en culture mixtes.

Chapitre 2

Matériels & méthodes

2.1 Lieu de travail

Ce travail a été effectué au niveau du laboratoire de Microbiologie Appliquée affilié au niveau du département de biologie de la faculté des sciences, Université d'Oran en collaboration avec le laboratoire annexe de contrôle de la qualité et de la répression des fraudes (Saida) du Centre Algérien du Contrôle de la Qualité et de l'Emballage (CACQE).

2.2 Provenance des échantillons

Les échantillons de lait cru de chamelle prélevés de la région sud ouest de l'Algérie (Abadllah wilaya de Béchar). Les échantillons du lait sont prélevés dans des conditions d'aseptiques dans des flacons de 250 ml stériles. Les échantillons sont recueillis de la mamelle de l'animal après avoir lavé le pis par l'eau javellisée (3 à 4 gouttes par litre d'eau) et éliminé les deux ou trois premiers jets. Ces derniers sont transportés au laboratoire pour analyse. Les échantillons sont conservés à 4 °C lors de leur transport au laboratoire, le temps de transport ne doit pas dépasser 24h.

2.3 Isolement et caractérisation des souches de *Leuconostoc*

2.3.1 Milieux d'isolement

Pour l'isolement des *Leuconostoc*, nous avons utilisés deux milieux sélectifs pour éliminer et/ou ralentir la croissance des autres lactiques.

- Le milieu MRSv (De Man *et al.*, 1960) pour les LAB mésophiles additionné de 30µg/ml de Vancomycine comme agent sélectif qui inhibe la croissance de la plupart des lactiques sensibles a cet antibiotique.
- Le milieu MSE (Mayeux *et al.*, 1962) pour les LAB productrice de dextrane.

2.3.2 Préparation des échantillons

Un millilitre de l'échantillon a été pipeté aseptiquement dans 10 ml d'eau peptonée et des dilutions décimales ont été réalisées (10^{-1} à 10^{-8}). Les dilutions ainsi préparées, un millilitre de la dilution appropriée a été ensemencée en profondeur dans les deux milieux MRSv solide et MSE solide. Toutes les boites ont été incubées à 30°C pendant 24 à 72 heures. **(Mathot *et al.*, 1994 ; Khedid *et al.*, 2006)**.

2.3.3 Isolement et purification des isolats de *Leuconostoc*

Après incubation dans le MRSv et MSE, huit à dix colonies isolées ont été prélevées aléatoirement de chaque boite de Petri, ensuite elles ont été incubées dans MRSv ou MSE **(Badis *et al.*, 2004)**. Les colonies présentant des aspects morphologiques qui se rapprochant de ceux mentionnées pour les *Leuconostoc* dans le *Bergey's Manual of Bacteriology,* Vol 2, (1986) ; l'élévation, le pourtour, l'aspect, la pigmentation, le diamètre et l'opacité de la colonie.

Chaque colonie prélevée a été ensuite repiquée en bouillon MRS, puis a été incubée à la température 30°C pendant 24 à 48h, l'observation de l'aspect des cultures en milieu liquide (gaz, croissance à différentes températures et à différentes pH) a été notée.

A ce stade, les isolats bactériens ont été purifiées par isolement par la méthode de stries **(Mathot *et al.*, 1994 ; Kihal *et al.*, 1996)**. L'opération de purification a été renouvelée à deux reprises en prenant chaque fois une colonie bien isolée dans les géloses MRSv et MSE. Ceci nous a conduits à obtenir une culture dont la pureté a été estimée par observation macroscopique et microscopique. Après purification, des répliques de ces isolats ont été conservées.

2.3.4 Conservation des isolats

2.3.4.1 Conservation de courte durée

Le maintien des isolats pures à court terme pour un usage journalier ou hebdomadaire a été effectué sur gélose MRS inclinée à une température de +4 C° après elles ont été incubées à 30 °C pendant 16 h. Des cultures ainsi conservées ont été repiquées toutes les deux semaines (**Saidi *et al.*, 2002**).

2.3.4.2 Conservation de longue durée

A partir des cultures jeunes (16-18 h) sur milieu liquide qui ont été centrifugées à 8000 rpm pendant 10 minutes. Une fois le surnageant éliminé, le milieu de culture de conservation a été ajouté (le lait écrémé, 0,2% d'extrait de levure additionnée de 30% de glycérol stérile) au culot. Les cultures ont été conservées en suspension dense et en tubes eppendorfs à -20 °C. Accolas *et al*, (1977) indiquent que des suspensions plus concentrées résistent mieux à la congélation. En cas de besoin, les cultures ont été repiquées dans du lait écrémé à 0,5% d'extrait de levure, avant utilisation.

2.4 Identification des isolats

2.4.1 Caractérisation morphologique (macroscopique et microscopique)

Après purification, dix colonies typiques de bactéries lactiques ont été examinées suivant l'aspect macroscopique ; à partir des boites contenant entre 25 et 250 colonies des deux milieux MRSv et MSE, ont été ensuite repiquées dans le bouillon MRS et incubées à 30 °C. Après incubation, les colonies ont été réensemencées dans du MRS solide. Les souches ont été examinées pour leur coloration de Gram, le test de la catalase et leur capacité de dégrader l'arginine. Les bactéries gram positives, catalase négatives, ADH négatives et capable de produire du dioxyde de carbone ont été présumés des *Leuconostocs* et ont été conservées dans le milieu lait écrémé et l'extrait de viande additionnée de 30% glycérol et conservées à -20 °C. L'étude de l'examen

microscopique a été examinée par la coloration de *Gram* des isolats lactiques, qui à été réalisé selon la procédure conventionnelle (**Chaskes, 2009**).

2.4.2Identification physiologique

A fin de pouvoir identifier correctement les bactéries lactiques, deux types d'identification sont à suivre, une identification selon le genre et une autre selon l'espèce.

Selon Carr *et al*., (2002), on doit se procurés aux test suivants :

2.4.2.1 La température

L'habilité des isolats à croitre à des températures d'incubation variables a été réalisée sur milieu MRS à 4 °C, 10 °C, 30 °C, 45 °C pendant 72 h.

2.4.2.2 Type fermentaire

Le bouillon MRS contenant les cloches du Durham a été utilisé pour mettre en évidence la production de CO_2 par l'incubation des cultures jeunes de 18h à 30°C pendant 24 à 48h. Nous à permettre de savoir le type fermentaire de nos souches (homo ou hétérofermentaire).

2.4.2.3 Tolérance à la salinité

L'habilité de nos souches à croitre à différentes concentration en NaCl 3 %, 6.5 %. Après ensemencement à partir d'une culture jeune de 18 h, ont été incubées à 30 °C pendant 5 jours (**Kihal *et al.,* 2006**).

2.4.2.4 Tolérance au pH alcalin & acide

La croissance à différentes valeurs de pH a été testée sur milieu MRS liquide ajusté aux ; 3.9, 4.4, et à 9.6. Après ensemencement à partir d'une culture jeune de 18 h les tubes ont été incubés à 30 °C pendant 2 à 3 jours (**Carr *et al.,* 2002**).

2.4.2.5 Production de l'acide lactique

Le dosage de l'acide lactique a été déterminé par la norme NA 10-96-01 retenue par le CACQE pour la quantification de cet acide, dont le principe est le titrage de l'acidité par la soude à 0.1 N en présence de la phénolphtaléine comme indicateur de couleur. L'acidité est exprimée en gramme d'acide lactique par 1000 ml.

Pour cela, on a ajoutés 5 goutes de phénolphtaléine à 1% au 10ml du lait et on dose avec de la soude 0.1N à l'aide d'une burette jusqu'à l'obtention d'une couleur rose pale, le volume de la soude ajouté a été noté.

Acidité °D = 10 V de la soude = 01 g/l d'acide lactique.

2.4.3Identification biochimique

2.4.3.1 Profil fermentaire

La fermentation des carbohydrates a été menée sur milieu MRS sans extrait de viande additionnée au pourpre de bromocrésol (BCP) comme indicateur coloré de pH (MRSBCP) la source de carbone est représentée par l'un des sucres suivant : arabinose, D (+) glucose, D (+) maltose, D (+) galactose, saccharose, D mannitol, L rhamnose, D (+) lactose, esculine, D fructose, raffinose, D xylose, sorbitol, D cellubiose, ducitol. Les solutions sucres sont autoclavées à 118 °C pendant 10 min. À part la solution du cellubiose est portée au bain marie à 100 C° pendant 3 min.

2.4.3.2 Production de dextrane

La production de dextrane à partir du saccharose a été mis en évidence sur milieu solide MSE (**Mayeux *et al*., 1962**). Les souches productrices de dextrane ont été caractérisées par la formation de colonies larges, visqueuses et gluantes. Ce test est aussi considéré comme clé d'identification permettant ainsi de différencier entre les *Leuconostocs* productrices et non productrice de dextrane.

2.4.3.3 Hydrolyse de l'arginine

La recherche de l'arginine dihydrolase (ADH) a été recherchée sur milieu M16 BCP (**Thomas, 1973**). Ce milieu contient du lactose (2 mg / ml) et de l'arginine (4 mg / ml) et un indicateur coloré pourpre de bromocrésol (0,05 mg / ml). Les bactéries lactiques utilisent le lactose en acidifiant le milieu, les colonies donnant ainsi une coloration jaunâtre. D'autres bactéries lactiques ont la capacité à utiliser l'arginine et réalcalinisent le milieu, leurs colonies apparaissent blanchâtres. La couleur de l'indicateur coloré demeure inchangée.

2.4.3.4 Utilisation du citrate en présence de sucre fermentescible

L'utilisation du citrate a été étudiée sur milieu kempler et Mc kay (1980). Ce milieu contient une solution de ferrocyanure de potassium et une solution de citrate ferrique. La présence du citrate dans le milieu inhibe la réaction entre l'ion ferrique et le potassium ferrocyanide. Les colonies qui ont fermentées le citrate ont lancées la réaction entre ces ions, il en résulte la formation de colonies bleues ou ayant un centre bleu (après 18 h – 72 h d'incubation). Les colonies incapables a fermentées le citrate restent blanches.

2.4.3.5 Production de composés aromatiques

La production de l'acétoïne a été testée sur milieu Clark et Lubs **(Fil, 1996)**. Les souches ont été cultivées sur ce milieu ; après 24 h d'incubation, le test a été effectué par la réaction de Vogues–Proskauer dite réaction de VP. Dans un tube à hémolyse, 2 ml de la culture ont été transvasés, 0,5 ml d'une solution de réactif a- naphtol à 6 % dans l'alcool absolu (VP1) et 0,5 ml de soude (NaOH) à 16 % dans l'eau distillée (VP2). Les tubes ont été soigneusement agités et ont été laissés au repos 5 à 10 min à température ambiante. La production d'acétoïne se traduit par l'apparition d'un anneau rose à la surface du milieu.

2.5 Mesure de croissance

On utilise la méthode de numérotation sur milieu solide qui prend en compte que les cellules vivantes et aptes à se développer sur milieu sélectif.

Les souches ont été inoculées dans 10ml de lait écrémé. Une série de dilution dans 9ml d'eau physiologique a été réalisée, ensuite les souches ont été ensemencées en profondeur dans milieu MRS solide et on incube à 30°C pendant 24h, uniquement les boites contenant entre 30 et 300 colonies ont été dénombrées (**Guiraud, 1998**).

2.6 Sélection des souches à activité antagoniste

2.6.1 Matériels bactériens

Un matériel bactérien de 3 souches de référence indicatrices mentionnées I1, I2 et I3 ont été utilisé dans la présente étude pour détecter une activité antagoniste putative des isolats obtenus, ces cultures indicatrices représentent les germes pathogènes et / ou d'altération. Ces derniers sont issus de l'unité ouest (ORAN) du Laboratoire National de Contrôle des Produits Pharmaceutiques «LNCPP», parmi les quelles on compte des *Gram* + et des *Gram* - :

- *Listeria innocua ATCC 33090* (I1) ;
- *Staphylococcus aureus ATCC 6538* (I2) ;
- *E .coli ATCC 8739* (I3) ;

La souche (I1) a été régénérée dans un bouillon BHI à 37 °C pendant 24 h, et repiquée sur gélose BHI à la même température, et maintenue dans le gélose BHI incliné, tandis que les souches (I2) et (I3) ont été régénérées avec du TSB à 37 C° pendant 24 h, repiquées sur boites contenant de la gélose nutritive à la même température et maintenues sur gélose nutritive inclinée à une température de +4 C° pour un usage à court terme. Néanmoins, ces souches ont été mises à l'épreuve de la coloration de *Gram* et du test catalase (Annexe B).

2.6.2 Evaluation de l'activité antimicrobienne

Les inhibitions entre bactéries peuvent avoir de diverses causes (présence de phages lysogènes, carence nutritive, production d'agent inhibiteur, …) **(Jay *et al.*, 1982 ; Ito *et al.*, 2003 ; Guessas *et al.*, 2005 ; Ibrahim *et al.*, 2008 ; Mezaini *et al.*, 2009)**. Nous avons recherché ces causes en vue de comprendre les cas d'inhibitions que nous avons mis en évidence.

Les bactéries lactiques isolées ont été testées pour leur activité antagoniste selon deux méthodes.

2.6.2.1 Méthode directe (*Spot Agar Test*)

L'activité antimicrobienne des isolats a été évaluée sur milieu solide selon la méthode de Barefoot et Klaenhammer (1983). Toutes les cultures LAB isolées à partir de MRS ont été soumis à un screening primaire pour vérifier la présence d'une activité antagoniste en utilisant la technique *spot agar test* (adapté de Fleming *et al*., 1975) en utilisant le milieu MRS (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, Angleterre) et le milieu BHI agar (Fluka). Une aliquote de 2 µl de chaque culture LAB préalablement amplifié dans un bouillon MRS (incubation à 30° C pendant 18 h), ensuite a été repiquer sur MRS solide et a été incubé à 37° C pendant 24 h. Après incubation, la gélose a été recouvert avec 8 ml de BHI gélose semi-solide (0,8 g /100 ml d'agar bactériologique, Fluka), ensemencé avec les cultures *Listeria innocua ATCC 33090, Staphylococcus aureus ATCC 6538* et *Escherichia coli ATCC 8739* (utilisées comme indicatrices), les cultures ont été ajustées au préalable à une longueur d'onde 600 nm se trouvant dans l'intervalle 0.08-0.1 correspondant à une concentration cellulaire de 1 à 2×10^{8} UFC (**Domínguez, 2001**). Les boites ont ensuite été incubées à 35° C pendant 24 h. La présence d'une zone d'inhibition de 0.5mm été considéré comme un effet positif antagonistes.

2.6.2.2 Méthode indirecte (*Well Diffusion Assays*)

Cette méthode permet de mettre en contact le surnageant des isolats lactiques producteurs de substances antimicrobiennes avec les souches indicatrices. Les souches ont été cultivées dans du MRS liquide et ont été incubées pendant 6 a 8 heures (**Lacroix *et al.*, 2011**), après incubation, le milieu a été centrifugé (6000

rpm pendant 30 min) et le surnageant a été conservé a 4 °C. Les surnageants ainsi obtenus font l'objet d'un traitement thermique de 10 mn à 80°C dans un bain marie (**Harris, 1989**) pour éliminer les formes végétatives. Suivi par une neutralisation du pH a 6,8 par l'addition du 5 mol / l de NaOH, par la suite, les surnageants ont été filtrés par les filtres millipores 0,22 µm. Une boite de Pétri 9mm contenant du BHI solide a été ensemencée par nos souches indicatrices et a été laissée reposer pendant 30 min a température ambiante, des puits de 5 mm de diamètre ont été réalisés avec un emporte pièce et celée par 10 µl du BHI solide. Les puits recevront 40 µl du surnageants de nos souches et les boites ont été incubées à 37 °C pendant 24 heures. Ensuite, les boites ont été examinées pour la formation de zones d'inhibition au tour des puits, les souches présentant des zones d'inhibition de diamètre supérieur ou égal à 0,5 ont été considérés positives.

2.6.3 Détermination de la nature de l'agent inhibiteur

Afin de déterminer la nature de la substance inhibitrice produite par les isolats lactiques, il est impératif de réaliser une série de test.

2.6.3.1 L'acide lactique

Ce test a pour but d'étudier l'effet de l'abaissement du pH sur le développement des souches indicatrices. Il a été réalisé dans le milieu MRS tamponné à pH 7 (tampon phosphate) avec comme témoin l'utilisation de milieu MRS non tamponné. Sachant que le milieu tamponné est préparé par le mélange de deux solutions à 0,2 M (39 ml 27,8g de phosphate mono sodique et 6 ml de phosphate disodique) utilisé pour préparée 200 ml de milieu de culture.

Ce test ainsi réalisé a pour but de limiter les inhibitions dues à la production d'acide lactique dans le cas du milieu tamponné en comparaison avec ceux obtenus en milieu non tamponné, la lecture des résultats a été réalisée par mesure des dimensions des halos d'inhibition.

La lecture des résultats est réalisée par mesure des halos clairs autour des isolats lactiques qui sont ensemencées en touches (**Fleming *et al.*, 1975**).

2.6.3.2 Le peroxyde d'hydrogène

Pour écarter l'effet du peroxyde d'hydrogène dans l'inhibition des pathogènes cibles *(Listeria innocua ATCC 33090* et *Staphylococcus aureus ATCC 6538)*, les surnagents des cultures des bactéries lactiques ont été traités par 1 mg/ml de catalase puis incubée à 37°C pendant 1 heure. Le surnageant est stérilisé par filtration et testé par la méthode des puits sur les pathogènes.

Ce test a été réalisé seulement sur les isolats lactiques ayant le pouvoir inhibiteur le plus remarquable. Les surnageants non traités par la catalase ont été utilisées comme témoins (**Guessas *et al*., 2005**).

2.6.3.3 Les phages

Ce test a été réalisé à l'issue du test de la mise en évidence des inhibitions en milieu solide et seulement pour les souches les plus performantes. La méthode qui a été utilisée est celle de **Hardy, (1987).**

Le but de ce test est de déceler les inhibitions dues à la production de phages. Pour cela, la méthode dite de la double couche a été utilisée : Des fragments de gélose ont été prélevées à partir des halos clairs, ensuite ils ont été mettre dans des tubes à essais contenant 1 ml de milieu liquide (MRS), et 20 µl de chloroforme (pour éliminer d'éventuelles bactéries vivantes et existant dans la gélose prélevée), puis le mélange a été agité bien et a été laissé décanter. Soigneusement, 0,5 ml du milieu a été prélevé pour une centrifugation à 6000 rpm pendant 10 min (pour éliminer les débris cellulaires ou de gélose). Par la suite, 300 µl de surnageant ont été prélevés et ont été ajoutés à 7 ml de gélose molle en surfusion contenant la souche indicatrice. Ensuite, le mélange a été coulé sur une boîte de Pétri contenant une couche de milieu solide. Enfin, l'ensemble a été incubé à 30°C pendant 48 h. La lecture des résultats consiste à observer s'il y a présence ou pas de plages de lyse. Les plages de lyse traduisent la présence de phages.

2.6.3.4 Vérification de la nature protéique des substances antimicrobiennes

La nature protéique des substances antimicrobiennes a été confirmée par l'étude de la sensibilité aux enzymes protéolytiques, la résistance à la température et au détergents, la stabilité au pH **(Lacroix *et al*., 2011).**

2.6.3.5 Sensibilité aux enzymes protéolytiques

La sensibilité des substances antimicrobiennes aux protéases a été testé par l'incubation du surnageant neutralisé en présence de 1% de (α-chymotrypsine, trypsine) pendant 2H a 37 °C, puis l'effet des enzymes a été désactivé par un chauffage à 80°C pendant 10 min puis réincubation des ces derniers à 37 °C.

2.6.3.6 Sensibilité à la température

La thermostabilité de l'activité antimicrobienne des substances antimicrobiennes a été déterminée par l'incubation de ces derniers à différentes température : 60°C pendant 30 min, 70°C pendant 15 min, 80°C pendant 20min, 100°C pendant 15min, 121°C pendant 15min.

2.6.3.7 Sensibilité au pH

L'effet du pH sur l'activité antimicrobienne des surnageants a été observé par l'ajustement du pH de 2 à 10 puis incubation pendant 2 heures, après neutralisation du pH des surnageants et tester de nouveaux leur activité antimicrobienne.

2.6.3.8 Sensibilité aux détergents

La sensibilité des substances antimicrobiennes aux détergents a été déterminée par l'incubation des surnageants de nos isolats test en présence de 1% de Tween-80 et l'urée respectivement, pendant 2H à 37 °C, puis ont été réincubées à 37 °C pendant 24 à 72 heures.

2.6.3.9 La résistance aux sels biliaires

Pour vérifier l'effet des sels biliaires sur les isolats et leurs substances antimicrobiennes nous suggérons de tester la résistance de ces isolats aux sels biliaires, par l'incubation de ces derniers sur MRS solide contenant différents

concentrations en sels biliaires variée de 0 à 20% et à 30°C pendant 72 heures **(Lacroix *et al.*, 2011)**.

2.7 Suivi cinétique d'acidité et de croissance en culture pure et en culture mixte

La production de l'acide lactique par les *Leuconostoc* indique leur croissance et provoque la coagulation du lait et diminution du pH.

Pour effectuer cette étude deux isolats L_{Y44} et L_{Y46} ont été ensemencées par strie sur milieu MRS solide et ont été incubées à 30°C pendant 18h, après leur croissance une colonie a été ensemencée dans MRS liquide et a été incubée à 30°C pendant 18h, 100µl de la culture jeune de 18h a été inoculée dans 10ml du lait écrémé à 0.3% d'extrait de levure et a été incubée à 30°C pendant 18h.

La mesure de la population bactérienne des isolats test avec les souches indicatrices en culture pures et mixtes a été réalisée selon la méthode de dénombrement en profondeur sur milieu Gélose nutritive (sur ce milieu on a remarqué une différence entre les colonies de *Leuconostoc* et de *Listeria sp*, la deuxième apparaître plus grande), tandis que le milieu Baird Parker a été utilisé pour le *Staphylococcus aureus* et du MRSv solide pour les *Leuconostocs.*

Les deux isolats les plus performants et producteurs de substance antimicrobiennes : L_{Y44}, $L_{Y46,}$ ainsi, les deux souches indicatrices *Listeria innocua* et *Staphylococcus aureus* ont été repiquées de façon routinière dans 10ml de lait écrémé à 0.3% d'extrait de levure, avec une concentration initiale de $8.6x10^5$ UFC/ml pour *Listeria innocua ATCC 33090* et $9x10^5$ UFC/ml pour *Staphylococcus aureus ATCC 6538*, les deux souches ont été inoculées dans des flacons de 100ml de lait écrémé pour le suivi des cultures pures ; tandis que, celle des cultures mixtes a été préparée par le mélange d'une culture des souches indicatrices avec une concentration cellulaire initiale de $8.5x10^5$ UFC pour *Listeria innocua ATCC 33090* et $9x10^5$ UFC pour *Staphylococcus aureus ATCC 6538* qui ont été mélangées avec la souche test L_{Y44} à une concentration de $2x10^6$ UFC d'une part, et avec la souche test L_{Y46} à une concentration de $6.6x10^5$ UFC d'autre

part. L'ensemble a été incubé à 30°C pendant 24h, la lecture du pH, de l'acidité et le dénombrement ont été réalisés tous les 3 heures avec un triple essais (**Guessas *et al.*, 2005**).

2.8 Analyses statistiques

Plusieurs modèles statistiques ont été proposées pour estimer les paramètres de croissance à partir des courbes obtenues selon la technique de dénombrement sur boîtes. Un ANOVA et une gamme de test ont été utilisées pour évaluer la différence entre les moyennes de pH, d'acidité titrable et charge bactérienne représenté par LogN et µmax. La significativité de la variation des résultats de l'activité antimicrobienne a été évalués par deux coefficients : de répétabilité et de reproductibilité (**Baranyi *et al.*, 1993 ; Dalgaard *et al.*, 1994**).

The production of bacteriocins or bacteriocin-like substances was confirmed using proteolytic enzymes in 2 different protocols: spot-on-the-lawn (Fleming et al., 1975; Harris, Daeschel, Stiles, & Klaenhammer, 1989) and well-diffusion assay, which uses the neutralized supernatant of LAB cultures (Harris et al., 1989; Tagg & McGiven, 1971). In both protocols, L. monocytogenes ATCC 7644 was used as indicator, along with the following proteolytic enzymes (all from Sigma, at 20 mg/ml): a-chymotrypsin (C4129), proteinase K (P8044), and trypsin TPCK (T1426). Lb. sakei 2a was used as a positive control due its bacteriocin production (de Martinis & Franco, 1998). For proteolytic enzymes, MilliQ water was used as a negative control.

Using the spot-on-the-lawn protocol, each LAB culture identified as antagonisticwas recovered in MRS broth (25 _C for 24 h) and an aliquot of 2 mlwas spotted onto plates containing 10 ml of mMRS agar and incubated at 25 _C for 24 h under anaerobiosis. After incubation, wells with a 3 mm diameter were cut adjacent to the colony and inoculated with 20 ml of each enzyme. After absorption at room temperature (10e15 min), the agar was covered with an overlayer of semi-solid BHI (8 ml) inoculated with 10^5 CFU/ml of the indicator and incubated at 35 _C for 24 h. The absence of an inhibition zone in the proximity of the well indicates sensitivity to this specific protease, thus confirming the proteinaceous nature of the antagonistic substance. For this step, 9 cm diameter plates were used and 2 LAB cultures were tested per plate, spotted in equal distances. For each culture, 4 spots were inoculated (3 proteolytic enzymes and the negative control). In the center of each plate the bacteriocin producer was inoculated in 2 spots (1 for proteinase K and 1 for the negative control).

Using the well-diffusion-assay protocol, LAB cultures identified as antagonists were recovered in 50 ml of mMRS broth (25 _C for 24 h) and centrifuged at 6800_ g for 20 min at 4 _C. The supernatants obtained from this process were neutralized with NaOH at 1 mol equi/l (to eliminate the inhibitory effect due to acid production) and sterilized by filtration (Millex SLGP033RS, 0.22 mm, Millipore, Bedford, MA, USA). Plates containing 20 ml of semi-solid BHI (0.8 g/100 ml of bacteriologic agar) previously inoculated with 10^5 CFU/ml of the indicator were prepared. Adjacent wells with a diameter of 5 and 3 mmwere cut on these plates, and 40 ml of the supernatant and 20 ml of each enzyme, respectively, were deposited. After absorption (4 _C for 2 h), the plates were incubated at 35 _C for 24 h. For this step, 9 cm diameter plates were used and 2 LAB cultures inoculated in equidistance cut wells were tested per plate. For each culture, 4 wells of 5 mm were cut (3 proteolytic enzymes and the negative control). In the center of each plate 2 wells of 5 mm were cut for the bacteriocin producer supernatant inoculation (1 for proteinase K and 1 for the negative control).

A schematic flowchart of the conducted laboratorial procedures is presented on Fig. 1.

La production de bactériocines ou bactériocine-like substances a été confirmée en utilisant des enzymes protéolytiques dans 2 protocoles différents: Place sur le gazon (Fleming et al, 1975;. Harris, Daeschel, Stiles, et Test Klaenhammer, 1989) et le bien-diffusion, qui utilise le neutralisé surnageant des cultures LAB (Harris et al, 1989;. Tagg & McGiven, 1971). Dans les deux protocoles, L. innocua ATCC 33090 et S. aureus ATCC 6538 ont été utilisés comme souches pathogènes indicatrices, ainsi que les enzymes protéolytiques suivants (tous de Sigma, à 20 mg / ml): a-chymotrypsine (C4129), la protéinase K (P8044), et la trypsine TPCK (T1426).

En utilisant le protocole spot-on-the-pelouse, chaque culture LAB identifié comme antagonisticwas récupéré dans un bouillon MRS (25 _C pendant 24 h) et une aliquote de 2 mlwas déposés sur des plaques contenant 10 ml de TMM agar-agar et incubées à 25 _C pendant 24 h en anaérobiose. Après incubation, les puits avec un diamètre de 3 mm ont été découpés à côté de la colonie et inoculé avec 20 ml de chaque enzyme. Après absorption à la température ambiante (10e15 min), la gélose a été recouvert d'un surcouche de semi-solide BHI (8 ml) inoculés avec 105 UFC / ml de l'indicateur et incubées à 35 _C pendant 24 h. L'absence d'un zone d'inhibition à proximité du puits indique la sensibilité à cette protéase spécifique, confirmant ainsi la nature protéique de la substance antagoniste. Pour cette étape, plaques 9 cm de diamètre ont été utilisé et 2 cultures LAB ont été testés par plaque, repéré dans l'égalité distances. Pour chaque culture, 4 spots ont été inoculées (3 protéolytique enzymes et le contrôle négatif). Dans le centre de chaque plaque de l' producteur bactériocine a été inoculé en 2 points (1 pour la protéinase K et 1 pour le contrôle négatif).

En utilisant le protocole de diffusion bien-dosage, cultures LAB identifié comme antagonistes ont été retrouvées dans 50 ml de bouillon de TMM (25 _C pour 24 h) et centrifugé à 6800_ g pendant 20 min à 4 _C. Les surnageants obtenu par ce procédé ont été neutralisées avec NaOH à 1 mole equi / l (pour éliminer l'effet inhibiteur en raison de la production d'acide) et stérilisé par filtration (Millex SLGP033RS, 0,22 mm, Millipore, Bedford, MA, USA). Les plaques contenant 20 ml de BHI semi-solide (0,8 g/100 ml d'agar bactériologique) préalablement ensemencé avec 105 CFU / ml de l'indicateur ont été préparés. Puits adjacents par un diamètre de 5 et 3 mmwere coupe sur ces plaques, et 40 ml de la ml de surnageant et 20 de chaque enzyme, respectivement, ont été déposés. Après absorption (4 _C pendant 2 h), les plaques ont été incubées à 35 _C pendant 24 h. Pour cette étape, plaques 9 cm de diamètre ont été utilisés et 2 LAB cultures inoculées dans équidistance coupe puits ont été testés par

plaque. Pour chaque culture, 4 puits de 5 mm ont été coupées (3 protéolytique enzymes et le contrôle négatif). Dans le centre de chaque plaque 2 puits de 5 mm ont été coupées pour le surnageant producteur bactériocine inoculation (1 pour la protéinase K et 1 pour le contrôle négatif).

Chapitre 3

Résultats

3.1 Collecte des échantillons

Dans ce travail nous avons examiné 4 échantillons de lait cru de chamelle, provenant de 4 chamelles de la région de Béchar, âgées entre 4 et 9 ans et de couleur gris ou marron, elles appartiennent a la race « *Camelus dromedarius* », elles utilisent généralement des pâturages dites permanents ou éphémères **(Gonzalez, 1949),** les principaux fourrages appétés sont de la famille des Fabacées tel que *Acacia radiana* (talh), de la famille des Tamariacacées : *Tamarix articulata* (fersikh) et la famille des Chenopodiacées : *Atriplex halimus* (guettaf), ces dernières sont très répondues dans cette région (Tableau 3.1).

3.2 Identification des souches

3.2.1 Isolement et caractérisation morphologique

Les différentes échantillons sont diluées à 10^{-8} et ensemencer en profondeur avec du MRS solide additionnée de vancomycine qui le rendre sélectif par l'élimination et ou le retardement de croissance des lactiques sensibles à cet agent sélectif, et MSE solide puis incubées à 30°C pendant 24h à 48h.

Après incubation, les boites de Petri ont été examinées. Ainsi, 8 à 10 colonies ont été prélevées aléatoirement selon leur apparence macroscopique.

Tableau 3.1 : Paramètres physico-chimiques des échantillons de lait de chamelle.

Echantillon	Densité	Acidité (gr/l)	Matière grasse (gr/l)	Matière sèche (gr/l)	Protéines (gr/l)	T°	pH	Production journalière (litre)
Ech 01	1.032	1.62 ± 0.07	32	120.5 ± 0.1	32.1 ± 0.3	34.1 ± 0.22	6.23± 0.3	4 – 9
Ech 02	1.032	1.68 ± 0.1	28	102 ± 0.5	28 .7 ± 0.5	32.7 ± 0.15	6.55± 0.1	5 – 7
Ech 03	1.032	1.7 ± 0.05	54	132.8 ± 0.2	49.2 ± 0.4	35.3 ± 0.17	6.35± 0.25	4 – 8
Ech 04	1.032	1.73 ± 0.02	34	124 ± 0.1	34.3 ± 0.1	36.2 ± 0.28	6.06± 0.09	4 – 8

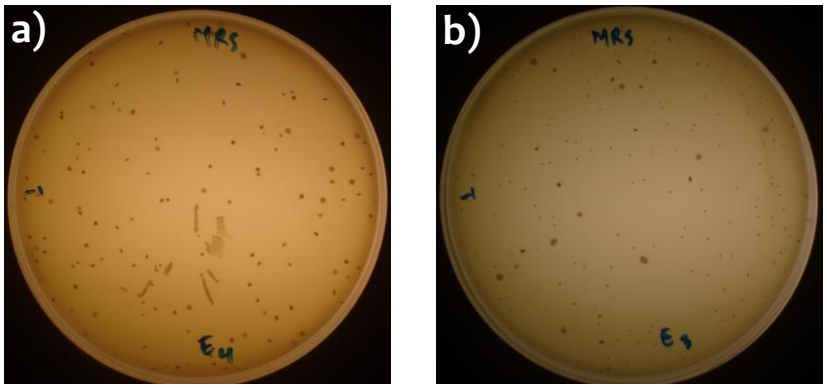


Figure 3.1 : Aspect macroscopique (à l'œil nu) des cultures bactériennes ; (a) L_{Y09}, (b) L_{Y46}

L'aspect macroscopique des 21 souches lactiques isolées à partir de 04 échantillons de lait de chamelle cru conduisant à les différenciées sur milieu MRS additionnée de la vancomycine des petites colonies petites (0.5 - 1.5mm), rondes, blanches et lenticulaires (Figure 3.1). Par contre, sur milieu MSE apparaissent transparentes, gluantes et gélatineuses (Figure 3.5). L'observation microscopique montre que les cellules sont Gram positive, catalase négative avec une forme ovoïde associées en pairs ou en courtes chainettes (Figure 3.2).

3.2.2 Caractérisation de l'espèce

Pour caractériser les différentes espèces qu'elles appartiennent les isolats, les caractères physiologiques et biochimiques ont été examinés.

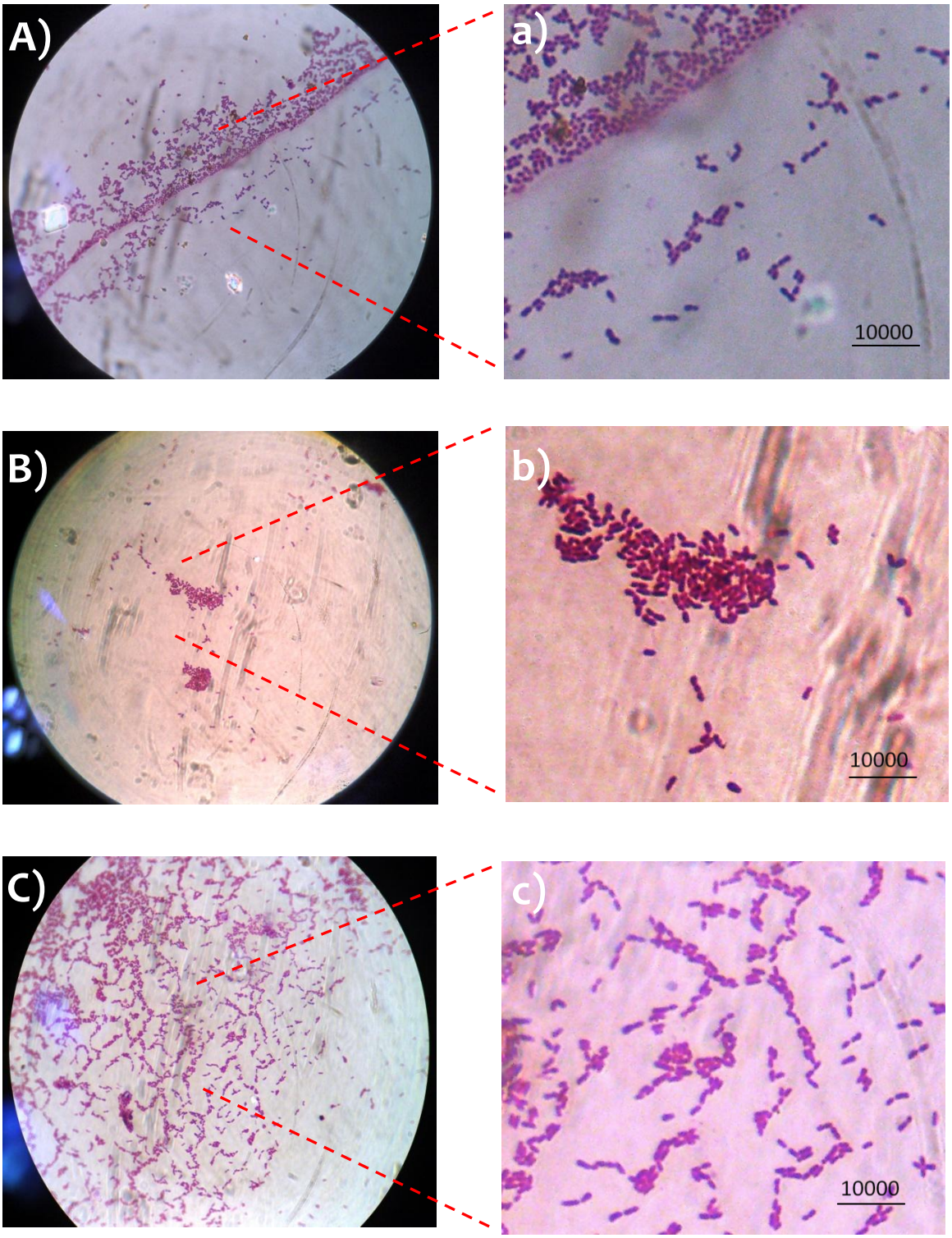


Figure 3.2: Aspect microscopique (x10000) des cellules bactériennes après fixation (Coloration de *Gram*). (A, a) L_{Y09}, (B, b) L_{Y35}, (C, c) L_{Y44}, Les lettre en majuscule indique une vue d'ensemble, les lettres en minuscule désignent une vue rapprochée.

3.2.2.1 Identification physiologique

Pour déterminer l'appartenance des isolats bactériens au genre *Leuconostoc* les critères suivants sont examinés : Coloration de Gram, test catalase, production de CO_2, croissance à différentes T°, croissance en présence de NaCl, croissance à différentes pH et le test de thermo-résistance. Les résultats sont présents dans le tableau 3.2.

L'isolement de plus de 60 isolats bactériens a permet de caractériser 21 souches Gram positif (Figure 3.2), catalase négatif, producteurs du gaz carbonique CO2, capables de croitre à 15°C, 30°C, 37°C, capables de croitre à pH 6.8 **(Garo, 1998)**, elles peuvent croissent en présence de 3% de NaCl (Figure 3.3), par contre, aucun isolat na résister à 63°C pendant 15 min, ces caractères phénotypiques nous orientes vers l'appartenance probable des isolats aux groupes de bactéries lactiques, la résistance à la vancomycine et le caractère hétérofermentaire permet une pré-identification au genre *Leuconostoc*.

Tableau 3.2 : Caractères physiologiques des isolats bactériens.

	Gram	Catalase	Croissance à différents T°					Croissance en présence de Nacl		Croissance à différents pH			Thermorésistance à 63°C
			T°4	T°15	T°30	T°37	T°45	Nacl 3%	Nacl 6.5%	pH4.8	pH6.8	pH9.6	
L_{Y01}	+	–	–	+	+	+	–	+	–	–	+	–	–
L_{Y02}	+	–	–	+	+	+	–	+	–	–	+	–	–
L_{Y03}	+	–	–	+	+	+	–	+	–	–	+	–	–
L_{Y04}	+	–	–	+	+	+	–	+	–	–	+	–	–
L_{Y05}	+	–	–	+	+	+	–	+	–	–	+	–	–
L_{Y06}	+	–	–	+	+	+	–	+	–	–	+	–	–
L_{Y07}	+	–	–	+	+	+	–	+	–	–	+	–	–
L_{Y08}	+	–	–	+	+	+	–	+	–	–	+	–	–
L_{Y09}	+	–	–	+	+	+	–	+	–	–	+	–	–
L_{Y35}	+	–	–	+	+	+	–	+	–	–	+	–	–
L_{Y37}	+	–	–	+	+	+	–	+	–	–	+	–	–
L_{Y38}	+	–	–	+	+	+	–	+	–	–	+	–	–
L_{Y39}	+	–	–	+	+	+	–	+	–	–	+	–	–
L_{Y40}	+	–	–	+	+	+	–	+	–	–	+	–	–
L_{Y41}	+	–	–	+	+	+	–	+	–	–	+	–	–
L_{Y44}	+	–	–	+	+	+	–	+	–	–	+	–	–
L_{Y46}	+	–	–	+	+	+	–	+	–	–	+	–	–
L_{Y47}	+	–	–	+	+	+	–	+	–	–	+	–	–
L_{Y48}	+	–	–	+	+	+	–	+	–	–	+	–	–
L_{Y49}	+	–	–	+	+	+	–	+	–	–	+	–	–
L_{Y50}	+	–	–	+	+	+	–	+	–	–	+	–	–

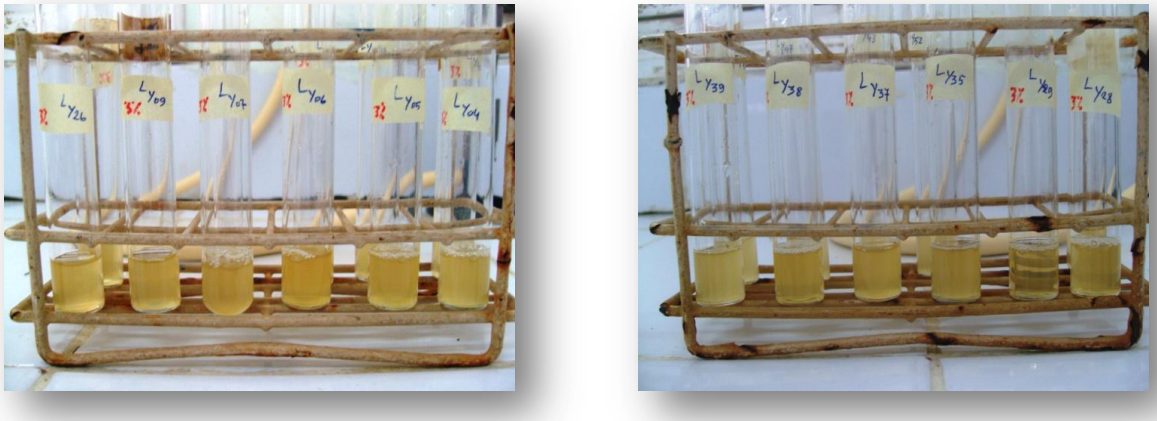


Figure 3.3 : Croissance dans le bouillon MRS à 3% de NaCl.

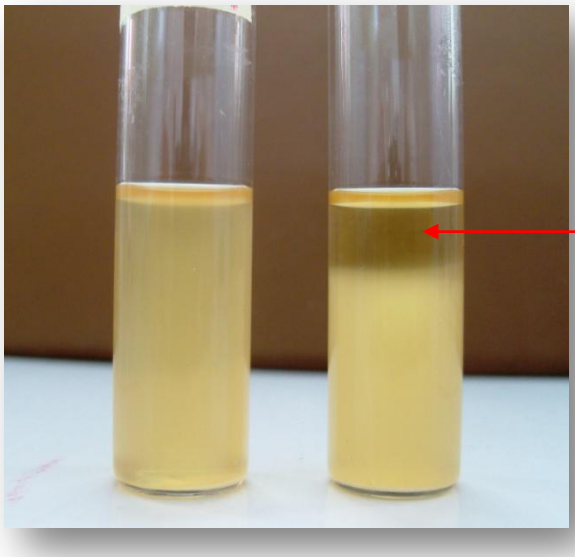


Figure 3.4 : Aspect de souche pure L_{Y46} sur MRS liquide.

3.2.2.2 Identification biochimique

a) Production de dextrane

La croissance des isolats sur milieu MSE contenant du saccharose à 10% montre des colonies visqueuses, gluantes et grandes suite a la production d'un exoploysaccharide (le dextrane) (Figure 3.5), ce caractère important a permet de différencier entre les espèces de *Leuconostoc* et de supposer leur appartenance à l'une des deux espèces productrices de dextrane : *Leuconostoc mesentroides* subsp *mesenteroides* ou *Leuconostoc mesenteroides* subsp *dextranicum* (**Car *et al.*, 2002**).

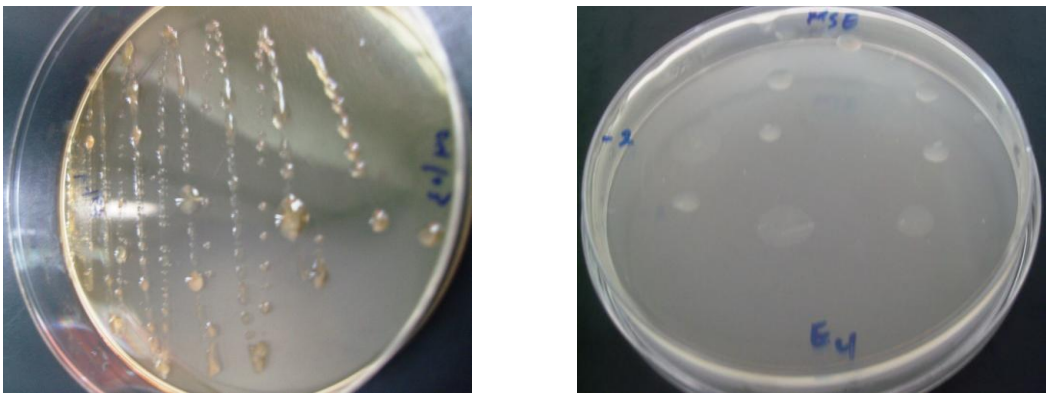


Figure 3.5 : Aspect des colonies de la souche L_{Y09} gélatineuses et gluantes sur milieu MSE.

b) Hydrolyse de l'arginine et de citrate.

Suite à l'incubation des isolats dans le milieu M16BCP contenant l'arginine à 5%, a montré une absence en enzyme arginine dihydrolase, à cause de la dégradation du lactose, le milieu a été acidifier et sa couleur a été viré au jaune, ce test est considérer comme le test clé pour l'identification probable de *Leuconostoc* (Figure 3.6), tandis que 90% des isolats contient de la citratase, ils ont dégradés le citrate et apparaissent comme des colonies bleu verdâtre sur milieu KMK (Kempler et Mac kay) (Figure 3.7).

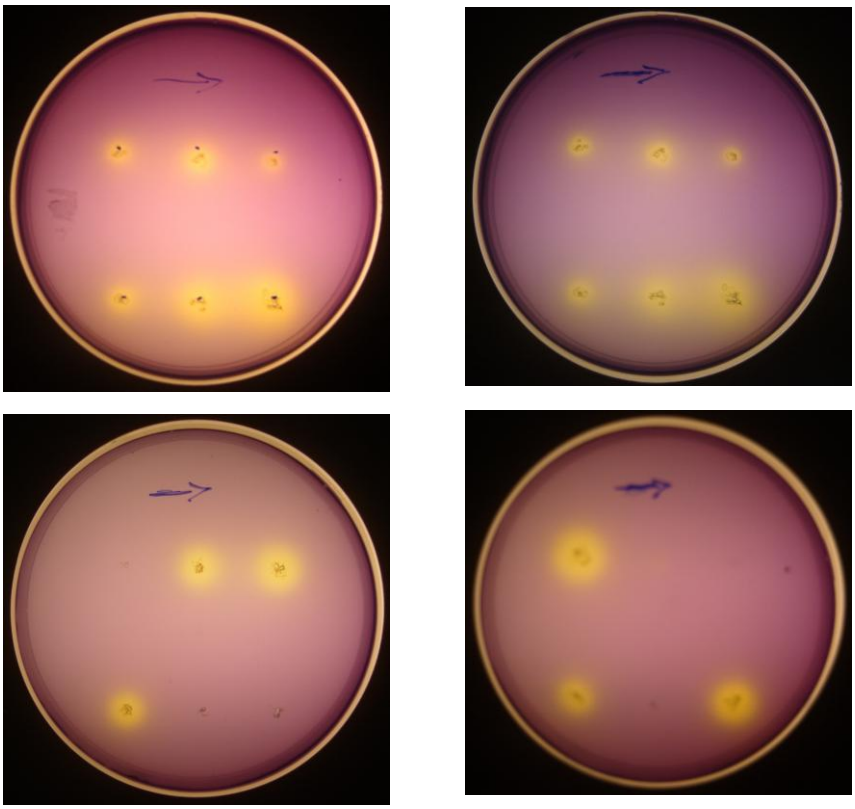


Figure 3.6 : Aspect des colonies de *Leuconostoc* ADH positives sur milieu M16 BCP.

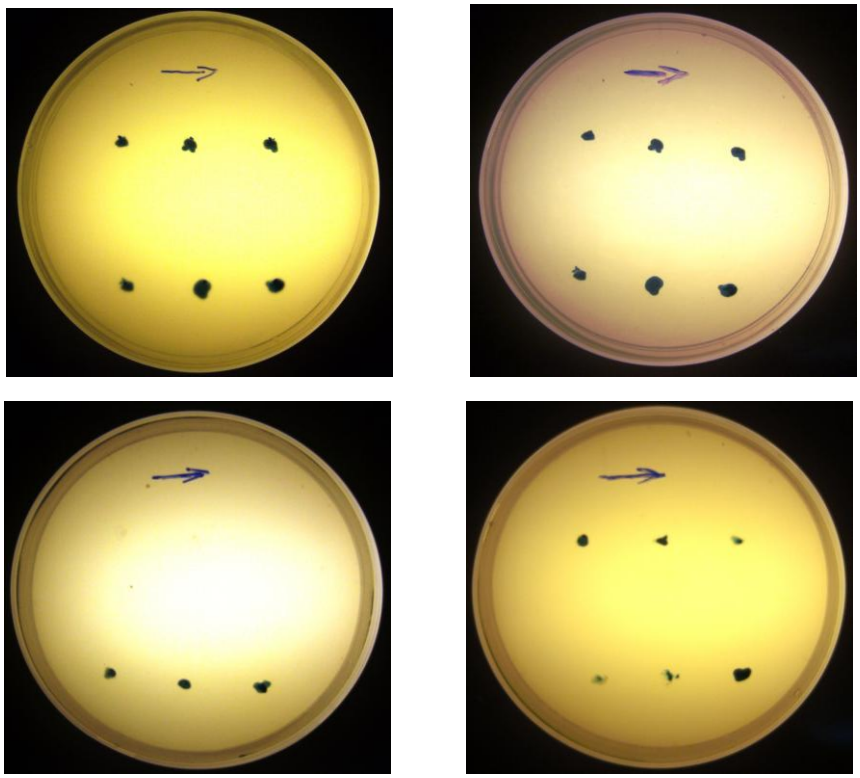
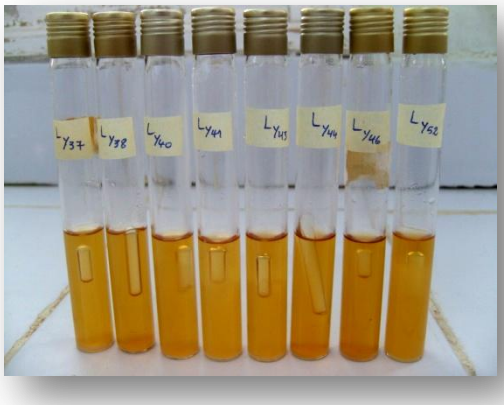


Figure 3.7 : Aspect des colonies de *Leuconostoc* Citrate postives sur milieu KMK.

c) Type fermentaire

Les isolats en bouillon MRS ont produit du gaz carbonique montré par le flottement des cloches de Durham (Figure 3.8), la production du gaz CO_2 lors de la fermentation du glucose caractérise le caractère hétérofermentaire des *Leuconostocs.* Cette probabilité a été confirmer par le test ADH négatif chez les *Leuconostocs* ce qui les différencier des lactobacilles (**Mathot *et al.*, 1994 ; Badis *et al.*, 2005**).



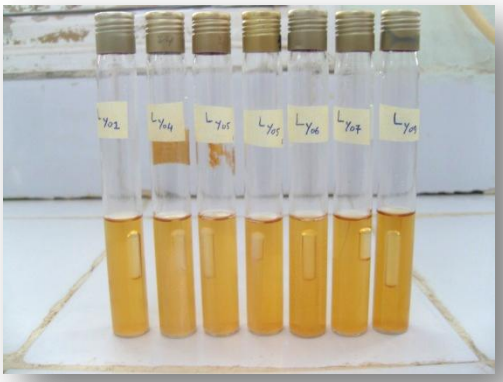


Figure 3.8 : Caractère hétérofermentaire des isolats bactériens.

d) Profil fermentaire

Pour la caractérisation des isolats lactiques du genre *Leuconostoc* au niveau de l'espèce par la fermentation de quatorze sucres en présence de pourpre de bromocrésol comme indicateur de pH.

Au cours de notre étude nous avons pu collecter sur la base des critères phénotypiques apportées par différents auteurs (**Car *et al.*, 2002 ; Badis *et al.*, 2005 ; Hammes et Hertel, 2006 ; Khedid *et al.*, 2006**) 21 souches de *Leuconostoc* dont 19 appartiennent à *Leuconostoc mesenteroides* subsp *dextranicum* et deux (02) à *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides* et qui se différencier par un seul sucre clé l'arabinose (Tableau 3.3 et figures 3.9, 3.10).

Tableau 3.3 : Profil fermentaires des isolats bactériens.

	Glu	Sac	Fru	Ara	Gal	Lac	Rha	Raf	Mal	Xyl	Cel	Manl	Sorl	Dul	Esc
L_{Y01}	+	+	+	+	+	+	−	−	+	±	±	−	−	−	−
L_{Y02}	+	+	+	−	+	+	−	−	+	±	−	−	−	−	±
L_{Y03}	+	+	+	−	+	+	−	−	+	±	−	−	−	−	−
L_{Y04}	+	+	+	−	+	+	−	−	+	±	−	−	−	−	−
L_{Y05}	+	+	+	−	+	+	−	−	+	±	−	−	−	−	±
L_{Y06}	+	+	+	−	+	+	−	−	+	±	−	−	−	−	±
L_{Y07}	+	+	+	−	+	+	−	−	+	±	−	−	−	−	±
L_{Y08}	+	+	+	−	+	+	−	−	+	±	−	−	−	−	±
L_{Y09}	+	+	+	−	+	+	−	−	+	±	−	−	−	−	±
L_{Y35}	+	+	+	−	+	+	−	−	+	±	−	−	−	−	±
L_{Y37}	+	+	+	−	+	+	−	−	+	±	−	−	−	−	±
L_{Y38}	+	+	+	−	+	+	−	−	+	±	−	−	−	−	±
L_{Y39}	+	+	+	−	+	+	−	−	+	±	−	−	−	−	±
L_{Y40}	+	+	+	−	+	+	−	−	+	±	−	−	−	−	±
L_{Y41}	+	+	+	−	+	+	−	−	+	±	−	−	−	−	±
L_{Y44}	+	+	+	+	+	+	−	−	+	±	±	−	−	−	−
L_{Y46}	+	+	+	−	+	+	−	−	+	±	−	−	−	−	±
L_{Y47}	+	+	+	−	+	+	−	−	+	±	−	−	−	−	±
L_{Y48}	+	+	+	−	+	+	−	−	+	±	−	−	−	−	±
L_{Y49}	+	+	+	−	+	+	−	−	+	±	−	−	−	−	±
L_{Y50}	+	+	+	−	+	+	−	−	+	±	−	−	−	−	±

Figure 3.9 : Fermentation des carbohydrates par la souche L_{Y44} (*Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides*)

Figure 3.10 : Fermentation des carbohydrates par la souche L_{Y46} (*Leuconostoc mesenteroides* subsp *dextranicum*)

1- Dulcitol 2-Sorbitol 3-Mannitol 4-Cellobiose 5-Xylose 6-Maltose 7-Raffinose 8-Rhamnose 9-Lactose 10-Galactose 11-Arabinose 12-Fructose 13-Saccharose 14-Glucose 15-Témoin.

e) Production de l'acide lactique

Les isolats bactériens affichent des productions des taux d'acide lactiques différents. La valeur la plus élevée a été observée chez l'isolat L_{Y46} est de 1.455 ± 0.021 mg/100ml. La plus basse étant observée chez l'isolat L_{Y04} de 0.645 ± 0.06 mg/100ml (Figure 3.11).

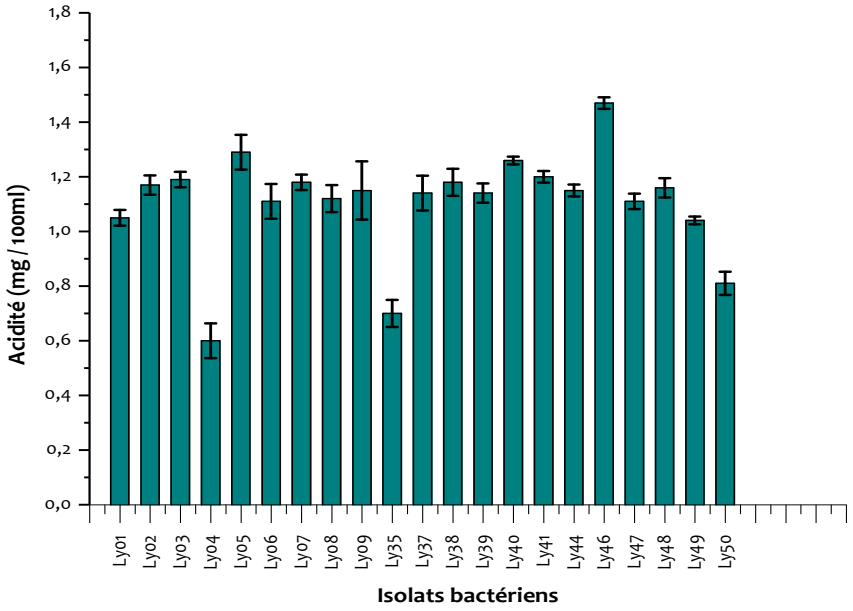


Figure 3.11 : Production d'acide lactique chez les isolats bactériens.

Les isolats L_{Y01}, L_{Y05}, L_{Y09}, L_{Y44}, L_{Y46} et L_{Y50} affichent des valeurs de 1.07 ± 0.028, 1.245 ± 0.063, 1.075 ± 0.106, 1.135 ± 0.021, 1.455 ± 0.021, 0.84 ± 0.042 respectivement. (Moyenne ± écart type)

3.3 Sélection des souches à activité antagoniste

3.3.1 Méthode directe (*Spot agar test*)

Ce test vise à mettre en évidence le potentiel antibactérien des 21 isolats de *Leuconostoc* et à déterminer le spectre d'activité de ces isolats envers 3 souches pathogènes et/ ou d'altération à *Gram* - et d'autres à *Gram*+. Il a révélé ainsi la présence d'isolats à activité d'inhibition assez remarquable, d'autres, dont la capacité à inhiber se trouve être médiocre. Ainsi, 06 isolats lactiques dotés d'activité antagoniste assez remarquable parmi les isolats testés envers une ou plusieurs souches indicatrices principalement les *Gram*+ (I1, I2, I5) (Tableau 3.5 et figures 3.12, 3.13, 3.14). Ces six isolats ont été retenus pour la détection de l'activité des bactériocines.

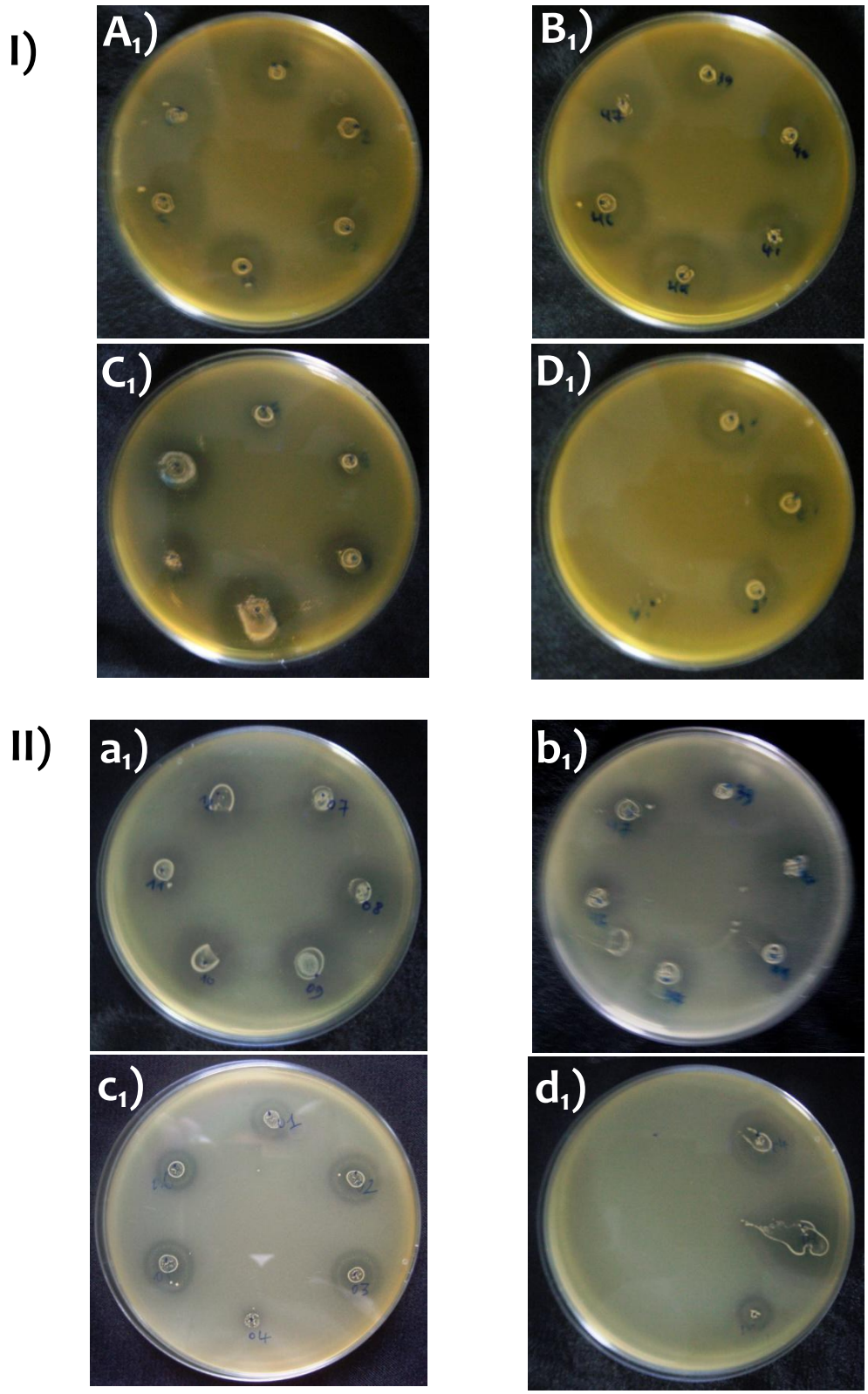


Figure 3.12 : Résultats du test de l'activité antibactérienne (*Spot agar test*) des candidats bactériens contre *Listeria innocua ATCC 33090 ;* I) sur MRS non tamponné, II) sur MRS tamponné.
A1) LY01, LY02, LY03, LY04, LY05, LY06; **B1)** LY07, LY08, LY09, LY35, LY37, LY38; **C1)** LY39, LY40, LY41, LY44, LY46, LY47; **D1)** LY48, LY49, LY50

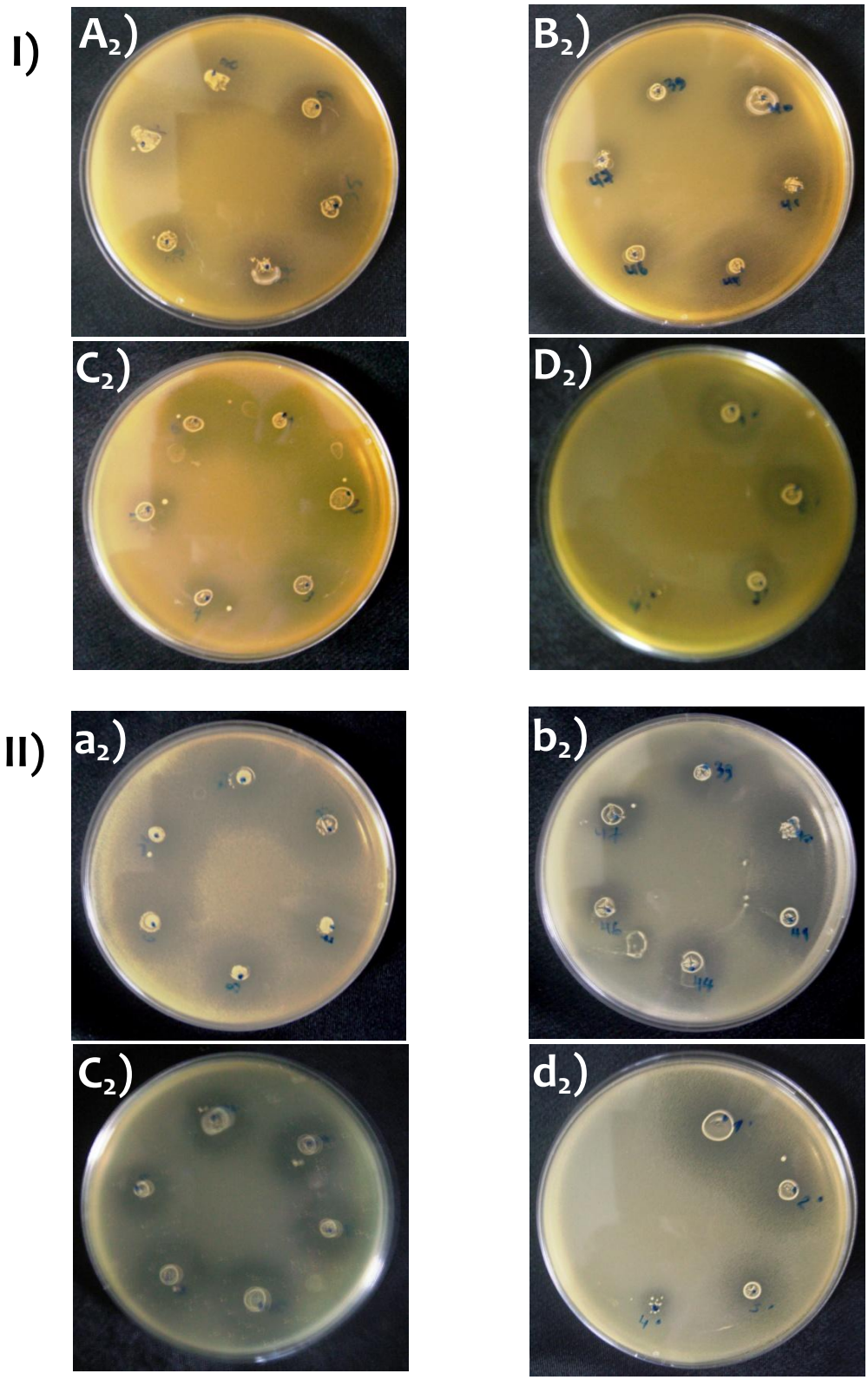


Figure 3.13 : Résultats du test de l'activité antibactérienne (*Spot agar test*) des candidats bactériens contre *Staphylococcus aureus ATCC 6538 ;* I) sur MRS non tamponné, II) sur MRS tamponné.

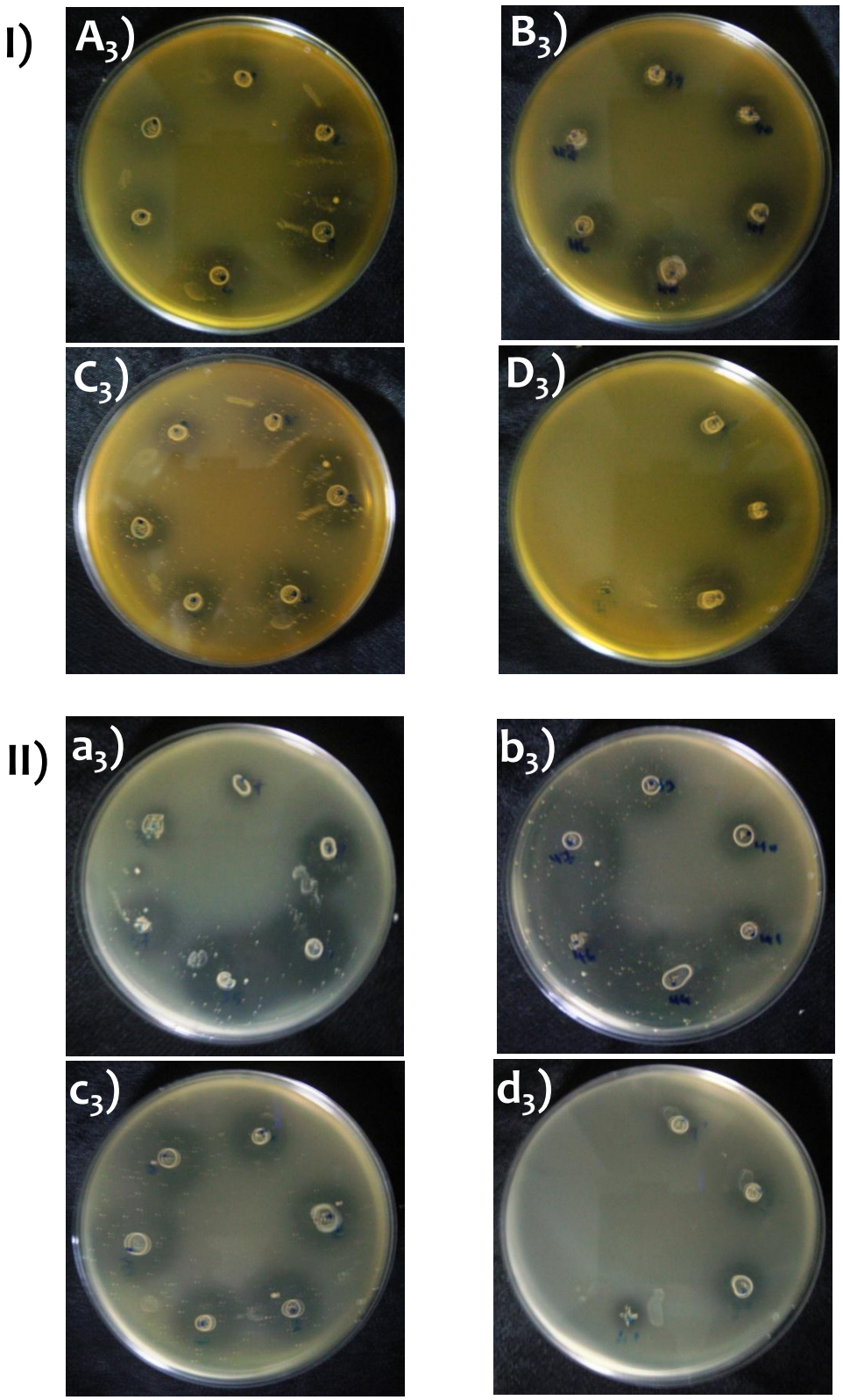


Figure 3.14 : Résultats du test de l'activité antibactérienne (*Spot agar test*) des candidats bactériens contre *Escherichia coli ATCC 8739 ;* I) sur MRS non tamponné, II) sur MRS tamponné.

3.3.2 Méthode indirecte (*Wells diffusion assays*)

Ce test a servie d'observation de l'activité des bactériocines. Il a montré la présence de six isolats à pouvoir *bactériocinogènes* assez remarquable (L_{Y01}, L_{Y05}, L_{Y09}, L_{Y44}, L_{Y46}, L_{Y50}) limitant ainsi la croissance du pathogène (*Listeria innocua* ATCC 33090) avec des diamètres d'inhibition légèrement variables ayant des valeurs comprises entre 15.5 ± 0.50 à 11 ± 1 et (*Staphylococcus aureus ATCC* 6538) avec diamètres d'inhibition allant de 14 ± 0.15 à 10 ± 0.25 (Tableau 3.4 et figure 3.15).

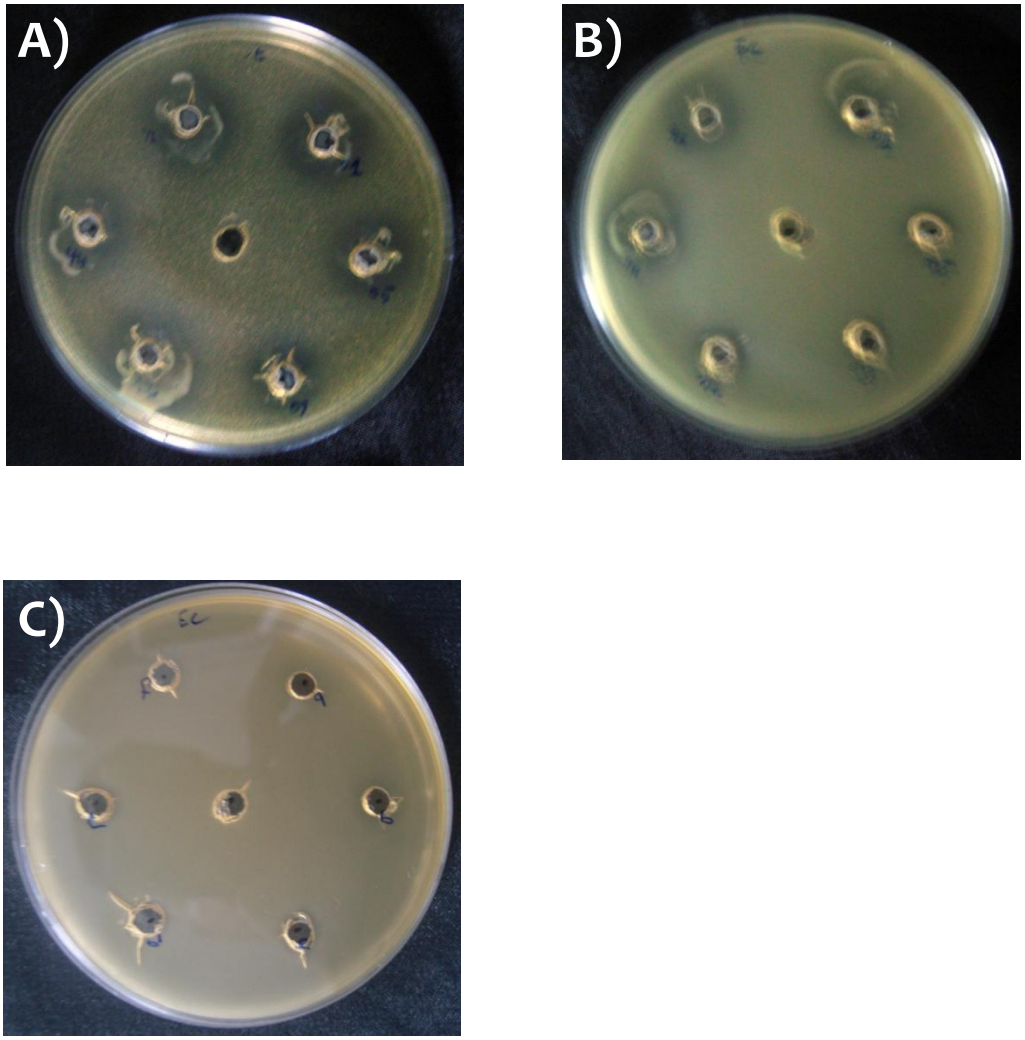


Figure 3.15 : Résultats du test de l'activité antibactérienne (*Well difusion assay*) des candidats bactériens L_{Y01}, L_{Y05}, L_{Y41}, L_{Y44}, L_{Y46} et L_{Y50} contre ; A) *Listeria innocua ATCC 33090*, B) *Staphylococcus aureus ATCC 6538*, C) *Escherichia coli ATCC 8739*

Tableau 3.4 : Diamètres des zones d'inhibition (mm) suite à la diffusion sur puits en gélose.

Souches test	*Souches indicatrices*		
	L. innocua ***ATCC33090***	***S. aureus*** ***ATCC 6538***	***E. coli*** ***ATCC 8739***
L_{Y01}	12.9 ±0.14	12.85 ±0.21	-
L_{Y05}	12.85 ±0.21	10.9 ±0.14	-
L_{Y41}	13 ±0.14	10.95 ±0.07	-
L_{Y44}	14.4 ±0.14	14.1 ±0.14	-
L_{Y46}	15.5 ± 0.23	13.6 ±0.14	-
L_{Y50}	10.9 ±0.14	10.15 ±0.21	-

3.4 Nature de l'agent inhibiteur

Pour déterminer la nature de l'agent inhibiteur ; acidifiant et c'est le cas presque de tous les bactéries lactiques, production de peroxyde d'hydrogène, lysogénie due au attaques des phages lactiques, soit elle est de nature protéique.

3.4.1 L'acide lactique

Les *Leuconostocs* produisent des acides organiques ; notamment de l'acide lactique et acétique (**Kihal *et al.*, 2006**) qui se libèrent dans le milieu provocant l'acidification qui peut être une cause principale d'inhibition des souches pathogènes. L'utilisation d'un tampon phosphate a permet de stabiliser le pH et donc exclure l'effet d'acidité. Des travaux similaires ont été réalisés par **Labioui *et al.*, (2005)** par la neutralisation du surnageant pour éliminer l'effet acidifiant lors des études de sélection de bactéries lactiques antimicrobiennes (Tableau 3.5 et figure 3.11).

3.4.2 Les bactériophages

Le test des phages s'est révélé négatif pour l'ensemble des souches, par conséquent aucune des inhibitions observées dans notre étude étaient due à la lysogénie (Figure 3.16).

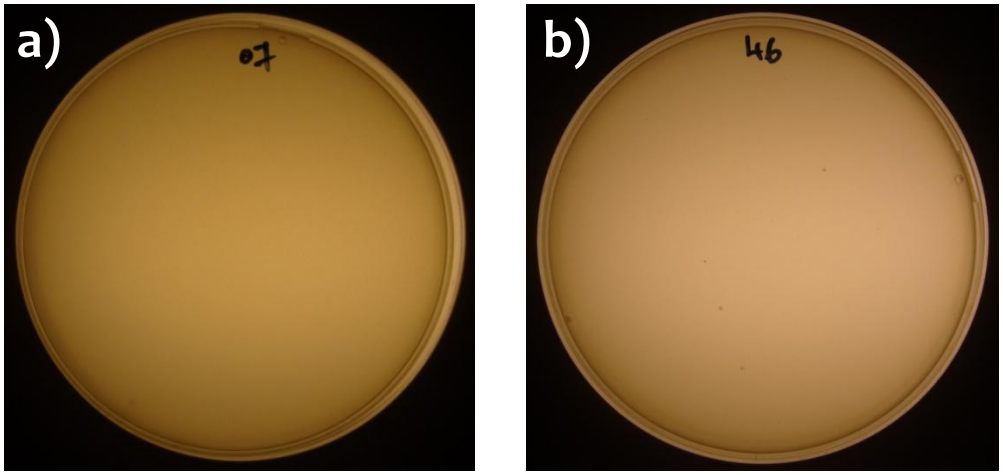


Figure 3.16 : Absence des plages de lyse dans le test des phages pour les souches LY07 et LY46.

3.4.3 Le peroxyde d'hydrogène

L'ensemble de nos isolats produisent de peroxyde d'hydrogène qui montre une activité inhibitrice contre la plupart des pathogènes, pour éliminer son effet on a ajoutés le catalase qui le dégrade (Tableau 3.5).

Tableau 3.5 : Diamètres des zones d'inhibition suite au (*Spot agar test*) avec MRS, MRS tamponée et BHI + catalase.

	Souches indicatrices								
	Listeria innocua			***Staphylococcus aureus***			***Escherichia coli***		
	MRS	MRST	BHI+C	MRS	MRST	BHI+C	MRS	MRST	BHI+C
L_{Y01}	27	17	09	20	17	11	21	17	00
L_{Y02}	18	14	14	23	18	00	18	12	00
L_{Y03}	17	14	14	20	17	00	20	13	00
L_{Y04}	18	15	14	21	15	14,5	21	12	00
L_{Y05}	28	19	10	25	19	12	25	18	00
L_{Y06}	24	15	13	22	13	00	22	13	00
L_{Y07}	25	13	12	20	14	00	11	08	00
L_{Y08}	26	16	15	20	12	00	19	07	00
L_{Y09}	25	13	13	28	14	00	25	14	00
L_{Y35}	25	14	12	26	17	00	28	19	00
L_{Y37}	23	12	11	25	18	00	23	16	00
L_{Y38}	25	13	13	24	13	12	24	14	00
L_{Y39}	22	11	11	19	09	08	16	07	00
L_{Y40}	24	15	14	24	14	11	24	14	00
L_{Y41}	19	15	12	23	15	13	23	15	00
L_{Y44}	**24**	**20**	**16**	**27**	**22**	**13**	**27**	**23**	**00**
L_{Y46}	**29**	**22**	**15**	**28**	**21**	**13,5**	**28**	**21**	**00**
L_{Y47}	19	11	10	17	08	08,5	22	14	00
L_{Y48}	23	13	12	22	11	00	12	10	00
L_{Y49}	20	14	14	19	10	00	13	09	00
L_{Y50}	22	13	09,5	24	12	10	18	11	00

3.4.4 La nature protéique des substances antimicrobiennes

La nature protéique des surnageants bactériens des six isolats les plus performants (L_{Y01}, L_{Y05}, L_{Y41}, L_{Y44}, L_{Y46}, L_{Y50}) a été confirmée par la thermostabilité de ces substances à des températures de 60°C pendant 30min et 70°C pendant 15min c'est pour cela l'inhibition apparaitre inchangeable, tandis qu'elles sont thermosensibles à 80°C pendant 60min, 90°C pendant 30min et 100°C pendant 15min et 121°C pendant 15min (Figure 3.17) ; ce qui révèle la nature protéique de ces substances.

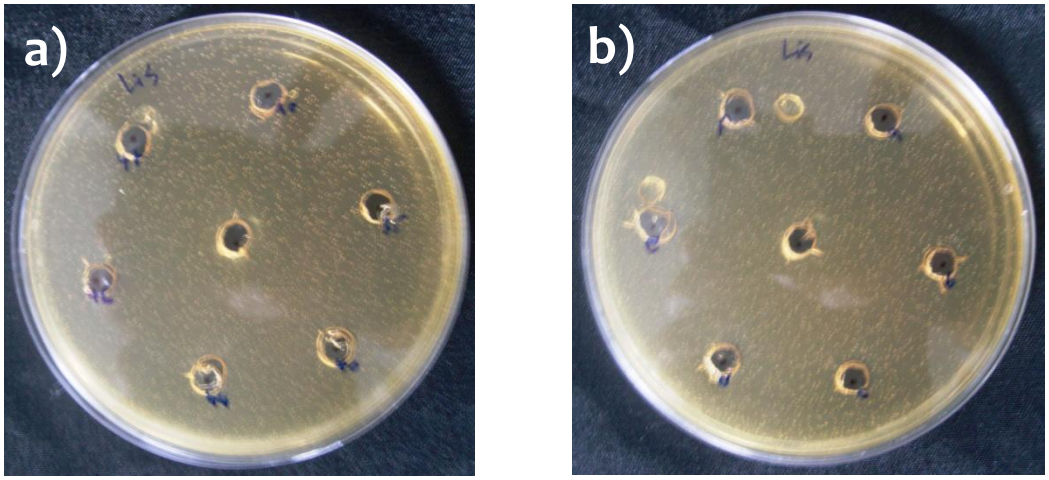


Figure 3.17 : Thermosensibilité des surnageants des isolats LY44 et LY46 ; a) à 100°C pendant 15min, b) à 120°C pendant 15min.

3.4.5 Sensibilité aux enzymes protéolytiques

L'ensemble des surnageants montrent une sensibilité aux protéases (trypsine, α-chymotrypsine) montré par l'absence des zones d'inhibition (Figure 3.18), ce qui confirme la nature protéique des surnageants (Tableau 3.6).

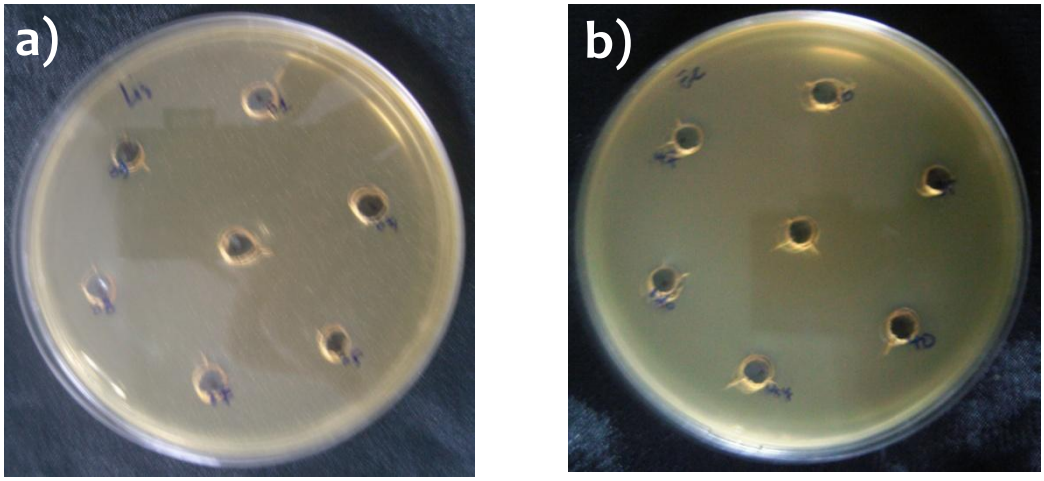


Figure 3.18 : Sensibilité des surnageants aux protéases ; a) trypsine, b) α-chymotrypsine.

3.4.6 Sensibilité aux pH

L'activité inhibitrice des surnageants semblé stable à un intervalle de pH entre 4 et 8 pour les six isolats testés suite aux zones d'inhibition inchangeables (Tableau 3.6).

3.4.7 Effet des solvants organiques

Les solvants organiques généralement doublent l'activité inhibitrice des surnageants retenues, comme le tween 80 et affiche un diamètre de 20.25 ±0.23 et 21.37 ±0.16 pour les surnageants retenues des isolats bactériens L_{Y44} et L_{Y46}, respectivement, tandis que, en présence de l'urée l'activité inhibitrice a été diminue montrer par un diamètre un peu réduit 9.9 ±0.17 et 8.9 ±0.21, respectivement (Figure 3.19 et tableau 3.6).

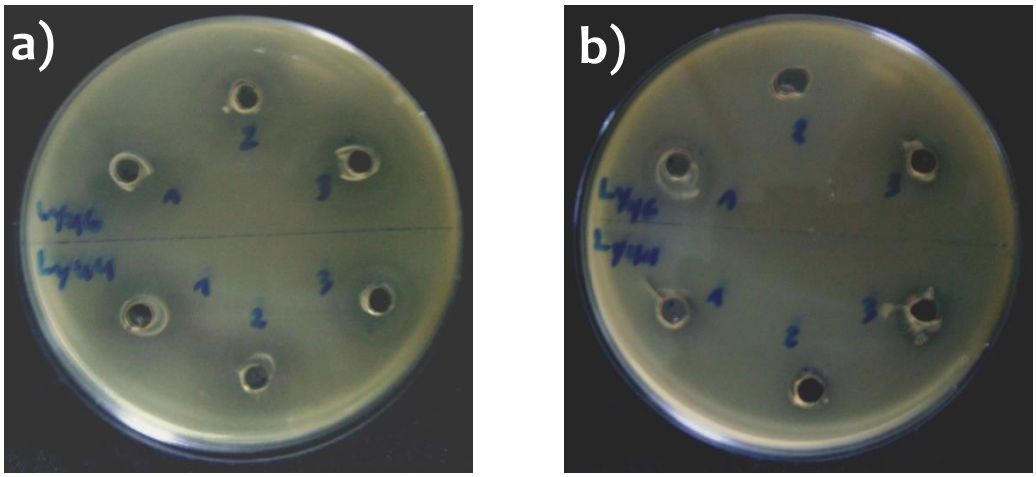


Figure 3.19 : Résultats de l'effet des solvants organiques sur les surnageants des isolats L_{Y44} et L_{Y46} ; a) Effet de la Tween 80 ; b) Effet de l'Urée.

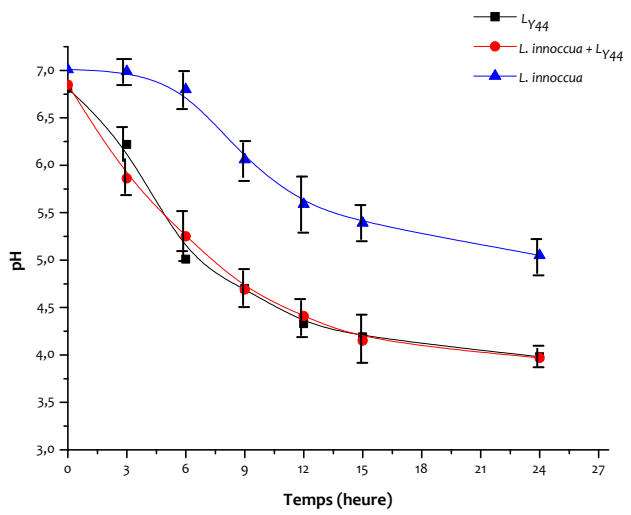
Tableau 3.6 : Effet de traitement de température, pH, enzymes protéolytiques et des solvants organiques sur les substances antimicrobiennes produites par les isolats test.

Les traitements	Activité inhibitrice des souches productrices	
	L_{Y44}	L_{Y46}
Température		
60°C / 30 min	14.4 ±0.14	15.5 ±0.23
70°C / 20 min	14.4 ±0.14	15.5 ±0.23
80°C / 20 min	14.4 ±0.14	15.5 ±0.23
100°C / 15 min	-	-
121°C / 15 min	-	-
pH		
2	-	-
4	14.1 ±0.29	15.2±0.09
6	14.3 ±0.17	15.1 ±0.15
8	12.6 ±0.22	13.4 ±0.35
10	-	-
Enzymes protéolytiques		
α-chymotrypsine	-	-
Pepsine	-	-
Solvants organiques		
Urée	9.9 ±0.17	8.9 ±0.21
Tween 80	20.25 ±0.23	21.37 ±0.16

3.5 Suivi cinétique de l'évolution du pH et d'acidité Dornic

Les résultats illustrées dans les figures 3.20, 3.21, 3.22, 3.23 a l'issu de la cinétique de l'évolution du pH des deux isolats performants L_{Y44}, L_{Y46} en culture pure et en culture mixte indiquent que les deux souches indicatrices *Listeria innocua* et *Staphylococcus aureus* sont moins acidifiantes en culture pure dans le milieu lait, observée par une chute de pH de 7.01 ±0.12 à 5.05 ±0.24, 6.96 ±0.17 à 5.08 ±0.15 après 24h respectivement. Par ailleurs, en culture mixte le potentiel de pH se montre plus acide après 24h (3.97 ±0.19 et 3.99 ±0.22 respectivement).

a)



b)

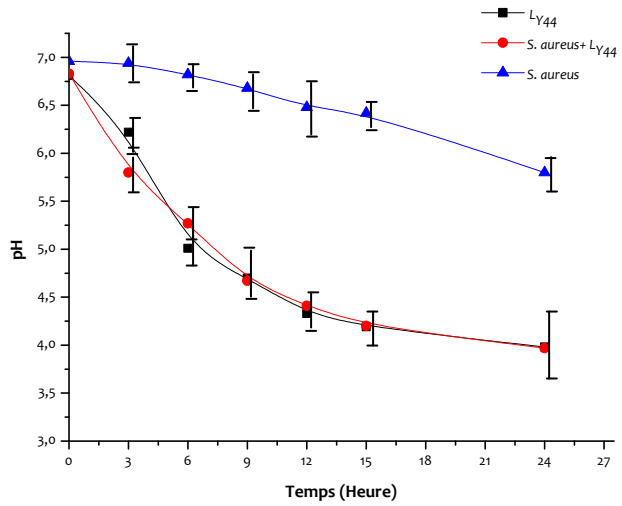
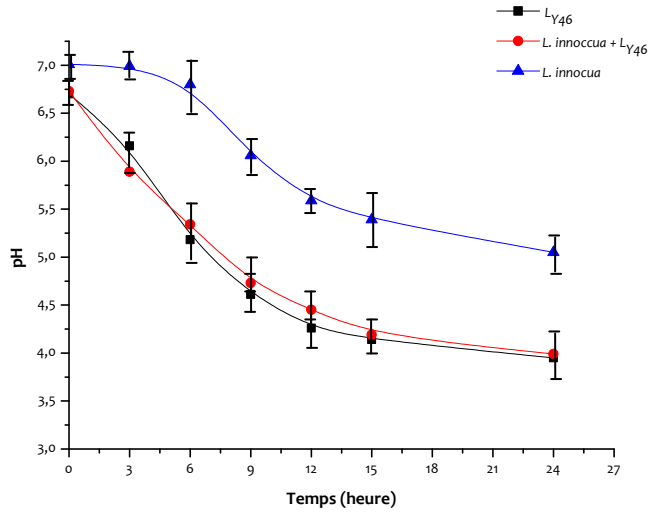


Figure 3.20 : Evolution de pH chez la souche L_{Y44} en culture pure et en culture mixte ; a) avec la souche pathogène *Listeria innocua ATCC 33090*, b) avec la souche pathogène *Staphylococcus aureus ATCC 6538.*

a)



b)

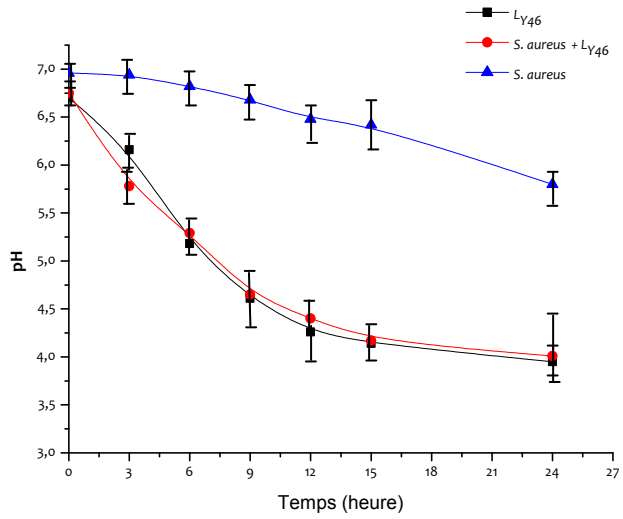


Figure 3.21 : Evolution de pH chez la souche L_{Y46} en culture pure et en culture mixte ; a) avec la souche pathogène *Listeria innocua ATCC 33090* , b) avec la souche pathogène *Staphylococcus aureus ATCC 6538.*

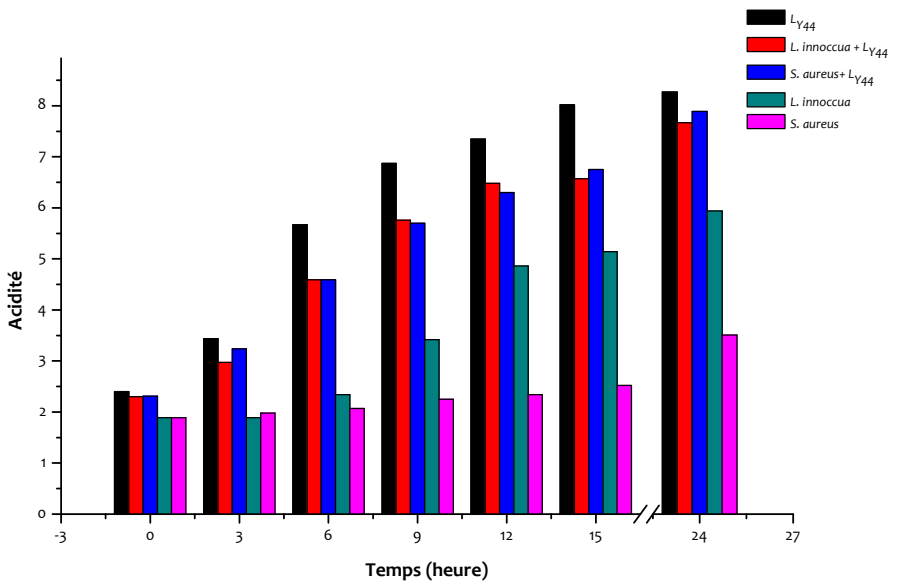


Figure 3.22 : Cinétique d'évolution de l'acidité Dornic chez la souche L_{Y44} en culture pure et en culture mixte avec *Listeria innocua* et *Staphylococcus aureus*.

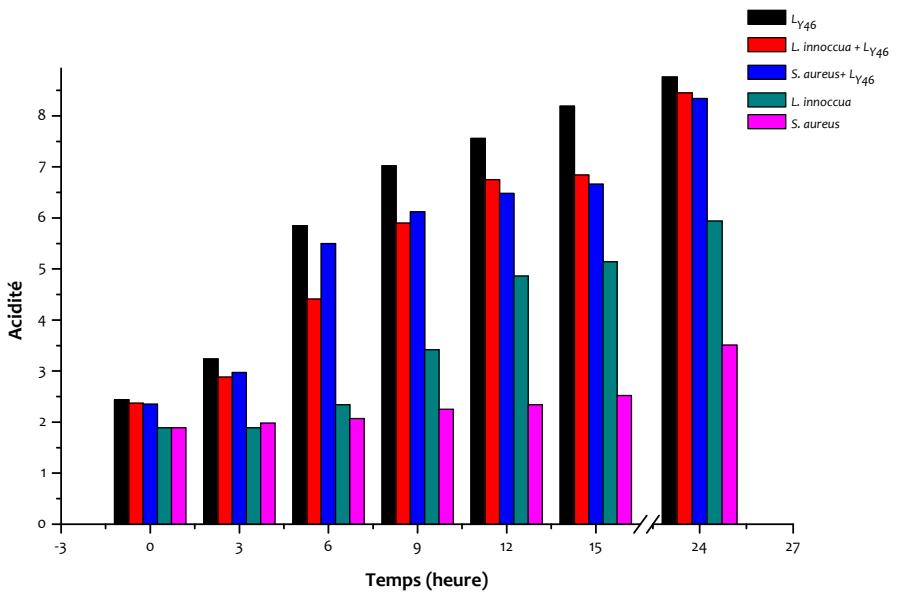


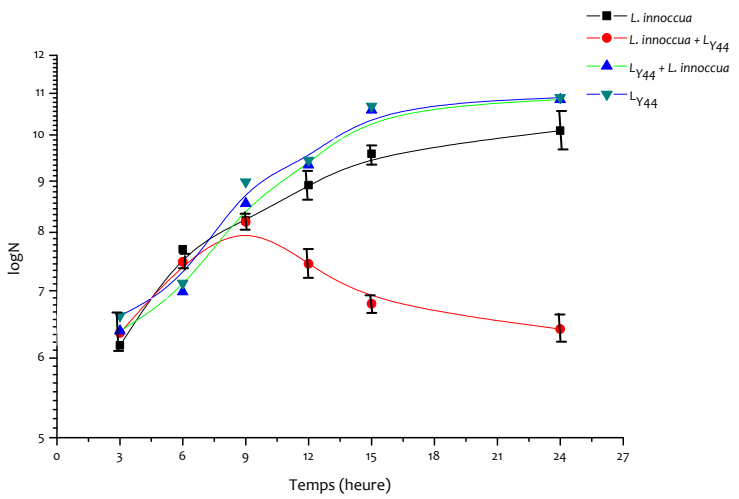
Figure 3.23 : Cinétique d'évolution de l'acidité Dornic chez la souche L_{Y46} en culture pure et en culture mixte avec *Listeria innocua* et *Staphylococcus aureus*

3.6 Cinétique de croissance des pathogènes indicatrices en présence des cultures *de Leuconostoc* retenues

3.6.1 La culture putative L_{Y44}

Le taux de croissance spécifique maximum (µ*max*) de *Listeria innocua ATCC 33090* a été de 0.763± 0.0082 pour le contrôle. Tandis que, celle en présence de l'isolat L_{Y44} a été de 0.286± 0.0067, ce qui constitue une retardation de 37.5 % par rapport au contrôle (Figure 3.24). Par contre, celle de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 a été de l'ordre de 0.607± 0.0027 pour le contrôle d'une part, et 0.489± 0.0013 en présence de l'isolat L_{Y44}.

a)



b)

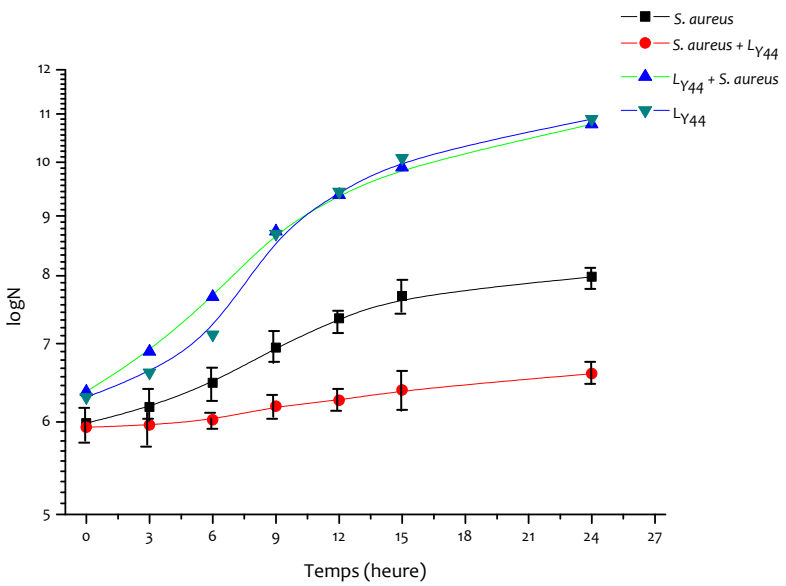


Figure 3.24 : Suivie cinétique de la souche test L_{Y44} en culture pure et en culture mixte ; a) avec *Listeria innocua ATCC 33090* , b) avec *Staphylococcus aureus ATCC 6538.*

3.6.2 La culture putative L_{Y46}.

Le taux de croissance spécifique maximum (µ*max*) de *Listeria innocua ATCC 33090* a été de 0.720± 0.0091 pour le contrôle. Celle en présence de l'isolat L_{Y46} a été de 0.287± 0.0073 ce qui constitue une retardation de 39.89 % par rapport au contrôle (Figure 3.25). A l'opposé, la souche *Staphylococcus aureus ATCC 6538* présente un taux de croissance de 0.599± 0.0034 en culture pure tandis que 0.495±0.0019 en culture mixte avec L_{Y46} ce qui révèle une retardation de croissance de 17.35% par rapport au contrôle.

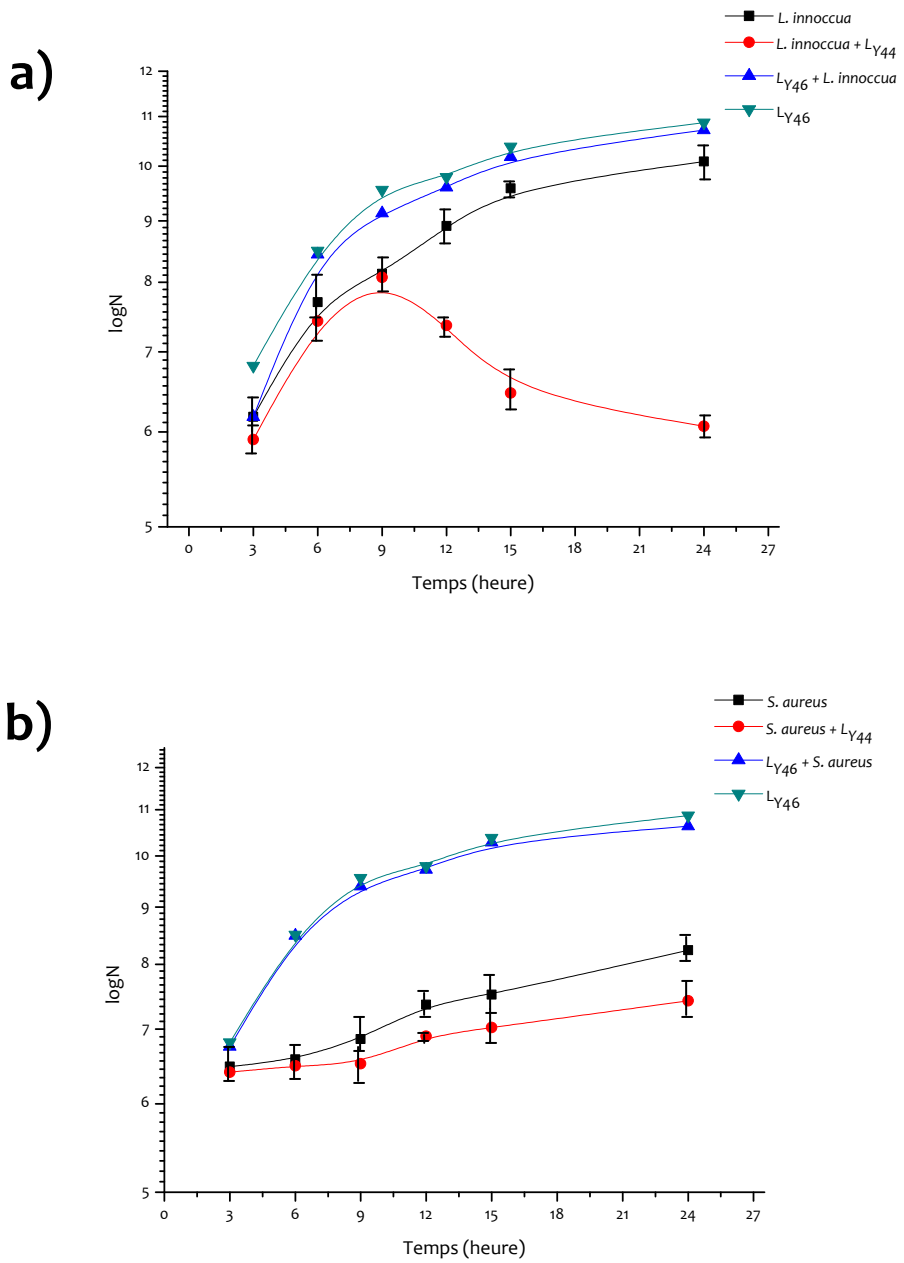


Figure 3.25 : Suivie cinétique de la souche test L_{Y46} en culture pure et en culture mixte ; a) avec *Listeria innocua ATCC 33090* , b) avec *Staphylococcus aureus ATCC 6538.*

Chapitre 4

Discussions

La présente étude portée sur l'isolement, l'identification et le screening des souches autochtones de *Leuconostoc mesenteroides* à partir du lait cru de chamelle, ces dernières productrices de substances antimicrobiennes actives contre des germes pathogènes et ou d'altération.

L'isolement et le screening des microorganismes à partir des milieux naturels ont été toujours les moyens les plus redoutables pour avoir des cultures utiles à des fins scientifiques et commerciales. Ce qui est évident pour les bactéries lactiques qui jouent un rôle primordial dans de nombreuses variétés alimentaires particulièrement laitières (**El Soda *et al*., 2003; Vijai *et al*., 2004**).

Le lait de chamelle est un aliment clé des zones arides et semi-arides ou il couvre leur besoins nutritionnels qualitatifs et quantitatifs. Les peuplades nomades anciennes imaginent que le lait de chamelle à plusieurs vertus thérapeutiques. Cette observation empirique à été scientifiquement démontrée, il a une forte activité antimicrobienne par rapport à celle des autres mammifères et sa capacité à inhiber les Gram positif et Gram négatifs pathogènes qui préoccupe la sécurité alimentaire (**Barbour *et al*., 1984**).

Les bactéries lactiques forment un groupe de germes à *Gram* + unis par une multitude de caractéristiques morphologiques et métaboliques constituées principalement de ces quatre genres ; *Leuconostoc, Lactobacillus, Pediococccus,* et *Lactococcus*, habitent des abris riches en nutriments tels que divers produits alimentaires : lait, viande, boissons, légumes (**Carr *et al.,* 2002 ; Axelsson, 2004**), sont sûrs pour la consommation humaine ce qui a conduit à la reconnaissance de leur statut *GRAS* « *Generally Recognized As Safe* » (**Klaenhammer *et al.,* 2005 ; Castellano *et al.,* 2008 ; Dortu *et al.,* 2009**). Les bactéries lactiques (LAB) ont été utilisés pour conserver

la viande et produits laitiers (**Stiles et Holzapfel, 1997**) et de légumes fermentés ou jus de fruits (**Ruiz-Barba *et al*., 1994**). Le succès de LAB dans la prévention de la croissance et l'activité de micro-organismes indésirables est due à une grande diversité des mécanismes d'action, y compris les acides organiques, bactériocines et d'autres composés de faible masse moléculaire, peroxyde d'hydrogène et diacétyle (**Alakomi *et al*., 2000 ; Cleveland *et al*., 2001**). Les Bacteriocines se divisent en trois groupes principaux. Classe I, ou lantibiotiques (**Breukink et Kruijff, 1999**), classe II, qui comprend stables à la chaleur non-peptides modifiés et deux bactériocines peptidiques (**Eijsink *et al*., 1998**), et de classe III, qui sont grandes et de la chaleur peptides labiles **(Cleveland *et al*., 2001)**. L'utilisation des souches bactériocinogènes protectrices pourrait permettre de contourner ces problèmes en raison de la constante localisée et la délivrance du composé antibactérien, qui va ajouter à d'autres avantages, comme colonisation de l'espace par la souche, conduisant à une plus ne protection efficace du produit alimentaire. L'effet bioprotecteur de LAB et des bactériocines a été testé dans les produits laitiers (**Guessas *et al*., 2005 ; Mechai A. *et* Kirane D., 2008 ; Mezaini *et al*., 2009**).

Parmi les LAB, le genre *Leuconostoc* présent dans de nombreux environnements, la végétation verte et les racines des plantes sont leur habitat écologique naturel, et peuvent facilement se propager dans les produits fermentés et les aliments réfrigérés (**Hemme *et al*., 2004**). Le genre montre une bonne activité antagoniste, bien qu'elle a été également liée à la détérioration des activités de produits alimentaires (**Conn *et al*., 1995**). L'action antimicrobienne de *Leuconostoc* contre les germes pathogènes a été attribuée à des mécanismes différents y compris les acides organiques (**Blom *et al*., 1999 ; Alakomi *et al*., 2000**), peroxyde d'hydrogène (**Condon, 1987**) et des bactériocines (**Ennahar *et al*., 2000**). Les *Leuconostoc* isolés à partir de lait de chamelle et de chèvre et des produits dérivés ont été signalés à être inhibitrices envers *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* sans provoquer des effets néfastes sur le produit frais (**Benkerroum *et al*., 2003** ; **Nikolic *et al*., 2007**).

L'étude de l'aspect macroscopique des souches lactiques isolées à partir de quatre échantillons de lait de chamelle cru de région saharienne et subsaharienne sur

milieu MRS solide semblées des colonies petites, rondes, blanches, et lenticulaires (Figure 3.1). Par contre, sur milieu MSE apparaissent transparentes, gluantes et gélatineuses (Figure 3.5) suite a l'utilisation du saccharose et formation de dextrane. L'observation microscopique montre que les cellules sont Gram positive avec une forme ovoïde associées en pairs ou en courtes chainettes. Tous les isolats présentent une activité catalasique négative, capable de produire du gaz à partir du glucose (hétérofermentaires) (Figure 3.8), incapable de dégrader l'arginine ; ces isolats sont considérer du genre *Leuconostoc* (**Garvie, 1986 ; Badis *et al*., 2005 ; Ogier *et al*., 2008 ; Ghazi *et al*., 2009**).

Les souches isolées et purifiées ont la capacité à pousser à 15°C, 30°C et 37°C mais pas à 4°C et 45°C ce qui confirme son caractère mésophile, tous les isolats sont résistantes à 3% de NaCl (Figure 3.3); tandis que elles sont incapables à pousser à 6.5% de NaCl. Les isolats poussent à pH 6.5 et pas à pH 4, la thermorésistance à 63.5°C pendant 30min paraître négative chez tous les isolats, ceci est comparables avec les travaux de **Guirraud, (1986**).

La production de dextrane dans le milieu MSE est un caractère important pour différencier entre les espèces de *Leuconostoc*, 21 isolats sont capables de dégrader le saccharose et de produire le dextrane, ce qui a été montré par **Car *et al*., (2002), Badis *et al*., (2005)** et **Ogier *et al*., (2008**).

Les résultats du profil fermentaire des sucres sont montrés dans le tableau 3.5 qui révèle l'appartenance des isolats à deux sous-espèces de *Leuconostoc mesenteroides*, ils se divisent en deux groupes : (I) Glu^+, Lac^+, Gal^+, Suc^+, Frc^+, Mal^+, Xyl^+, Mnt^-, Rha^-, Ara^-, $Sorb^+$, Man^-, Dcl^-, Esc^- qui appartient au *Leuconostoc mesenteroides* subsp *dextranicum*, tandis que le groupe (II) : Glu^+, Lac^+, Gal^+, Suc^+, Frc^+, Mal^+, Xyl^+, Mnt^-, Rha^-, Ara^+, $Sorb^+$, Man^-, Dcl^-, $Esc^{\pm}$, qui est classé sous *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides*. L'arabinose est le sucre clé pour la différenciation entre les sous-espèces de *Leuconostoc mesenteroides* (Figures 3.9, 3.10).

L'identification phénotypique (physiologique et biochimique) révèle que 19 isolats apparaître comme *Leuconostoc mesenteroides* subsp *dextranicum* et deux isolats classés sous *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides,* ce qui montrè dans les travaux de **Kihal (1996), Carr *et al*., (2002), Bjorkroth *et al*., (2006) *et* Ghazi *et al*., (2009).**

Les isolats montrent un caractère variable pour l'utilisation de citrate en milieu KMK ; 18 isolats sont susceptibles d'utiliser le citrate et forment des colonies bleues sur gélose KMK (Figure 3.7), qu'indiquant leur capacité à utiliser les précurseurs des composés aromatiques qui est porté comme caractère important pour la sélection des espèces à intérêt technologique. Cette variabilité selon **Bellengier *et al*. (1994)** et **Kihal *et al*. (1996)**, peut être due à la perte de plasmides codant pour les gènes responsables de la dégradation de citrate. Toutes les isolats sont incapables de produire de l'acétoïne à partir du glucose ce qui correspond aux caractéristiques des sous-espèces de *Leuconostoc mesenteroides* (**Badis *et al*., 2005**).

Le dosage de l'acide lactique montre divers taux (de 0.645 ±0.06 à 1.455 ±0.021 gr/l) ce qui indique des caractères d'acidification assez variés, susceptibles d'avoir un effet inhibitoire sur la flore d'altération typique par une baisse du pH (**Niemand *et al*., 1984**). L'effet antimicrobien des acides organiques lactique ou acétique affecte les propriétés membranaires de la cellule telle que le potentiel de la membrane et l'intégrité de la cellule (**Hemmes *et al*., 2002**).

Ammor *et al*., (2007) ont noté que l'effet antimicrobien de l'acide réside dans la réduction du pH, et dans l'action de molécules d'acide non dissociées.

La cinétique d'acidification des isolats de *Leuconostoc* nous a permis de bien conclure que le temps d'incubation a influencé positivement sur le rendement de ces dernières. Les résultats montrés dans l'histogramme 3.10 révèlent que la quantité d'acide produite est modifiée selon le stade de vie de la bactérie qui peut être expliqué par une déficience dans le système de transport des composés fermentescibles du milieu vers le cytoplasme cellulaire (**Albenzino *et al*., 2001**). La variabilité dans la production de l'acide lactique par nos isolats est moins importante puisque elles appartiennent au même genre.

La versatilité de la cinétique d'acidification peut être démêlée par plusieurs facteurs, le plus important c'est l'aptitude des isolats à posséder une activité protéolytique qui est codé par un matériel extra-chromosomique (**Juillard *et al*., 1998**).

Le *screening* est effectué sur milieu solide à fin d'évaluer l'inhibition de la croissance d'un indicateur causée par une culture test envers l'indicateur (**Tagg *et al.*, 1976**). En effet, différentes techniques existent, l'étude des réactions antimicrobiennes des isolats, réalisée en milieu tamponné et en milieu non tamponné, a permis de voir que certaines inhibitions sont dues à l'acidité des *Leuconostoc,* puisque les inhibitions ont été levées en milieu tamponné (85% des cas) contre *Listeria innocua* et *Escherichia coli*, ainsi que 90% des cas contre *Staphylococcus aureus* (Tableau 3.5 et figures 3.12, 3.13 et 3.14).

Autrement, **Guessas *et al.*, (2005)** ont affirmé que l'activité antagoniste des LAB contre *Staphylococcus aureus* est due majoritairement à la diminution du pH résultante de la production des acides organiques.

De nombreuses études ont indiqués que le peroxyde d'hydrogène qui est considérer comme substance à potentiel antimicrobien assez remarquable produite par les bactéries lactiques (**Schillinger et Lüke, 1989 ; Carr *et al.*, 2002 ; Moraes et *al.*, 2010**).

L'addition de la catalase au milieu BHI permet de dégrader le peroxyde d'hydrogène qui aurait pu être produit par nos isolats test (**Moreno *et al.*, 1999**), ce qui a permis de sélectionner les isolats producteurs de peroxyde d'hydrogène inhibant ainsi les Gram positif et Gram négatif. A l'issue duquel, 24% des nos isolats affichent une production significative de peroxyde d'hydrogène contre *Listeria innocua* exprimer par la diminution du diamètre des halos dans le milieu BHI+catalase (Tableau 3.4).

La lysogénie de nos isolats s'est révélée négative conséquence de l'absence des phages chez les souches testés (Figure 3.16).

Les bactériocines sont des substances protéique produites par la bactérie lactique et secréter dans le milieu extérieur (**Hugas *et al.*, 2003**). A cet effet, l'activité antimicrobienne est due à une substance extracellulaire.

Les résultats du tableau 3.5 et la figure 3.18 montrent que les substances antimicrobiennes sont inactivées par les enzymes protéolytiques (α-chymotrypsine et

pepsine) ce qui indique que les substances antimicrobiennes produites sont de nature protéique, qui est une caractérisation générale des bactériocines (**Ammor *et al*., 2006**).

Cette hypersensibilité des bactériocines des bactéries lactiques envers les enzymes protéolytiques métaboliques est très intéressante en matière de sécurité alimentaire, cela signifié que l'ingestion des bactériocines ne modifié pas l'écologie du tube digestive et aussi ne causera pas des risques liées à l'utilisation des antibiotiques communs (**Bromberg *et al*., 2004**).

Alors que, suite aux traitements thermiques, d'une part, les six extraits bruts sont entièrement insensibles à l'inactivation de la chaleur, jusqu'à 121 °C (Figure 3.17) conservant les mêmes diamètres d'inhibition engendrés par leur présence, ce qui suggère l'appartenance de ces substances antimicrobiennes à la classe II des bactériocines (**Klaenhammer, 1993 ; Stiles, 1994 ; Abee *et al*.,1995 ; Cleveland *et al*., 2001 ; Aly *et al*., 2006 ; Castellano *et al*., 2008 ; Dortu *et al*., 2009**), cette classe est parmi les plus susceptibles d'être utilisées dans les applications alimentaires en raison de leur spécificité (**Castellano *et al*., 2008**).

D'autre part, ces substances antimicrobiennes ont montrées une stabilité à des valeurs de pH allant de 2 à 10, leur potentiel d'activité était réduit à pH 3 et moins et à pH 6 et plus, par contre, il est complètement active entre pH 4 et pH 6. Dans notre étude les substances protéiques secrétées par les isolats L_{Y44} et L_{Y46} présentent le même profile.

De nombreuses études ont révélées la thermostabilité et la stabilité des bactériocines de *Leuconostoc sp* à certaines température et pH, ce qui a été révélé dans de nombreuses études tel que **Héchard *et al*., (1992), Stiles M.E., (1994), Osmanagaoglu O., (2007)** et **Lacroix *et al*., (2011**).

L'incubation de ces substances protéique en présence des solvants organiques montre une diminution de l'activité antimicrobienne en présence de l'urée suite a la dénaturation de ces substances protéiques par l'urée, tandis que une élévation des zones d'inhibition en présence de Tween 80 (Figure 3.19 et tableau 3.5) qui s'explique par la suppression de l'adhésion bactériocine-cellule par le Tween 80 (**Huot *et al*., 1996 ; Aslam *et al*., 2012**). Ces résultats sont comparables à celles illustré par **Labioui *et***

***al.*, (2005)** lors de leur étude sur la sélection des souches lactiques productrices de substances antimicrobiennes.

Il est pertinent de noter que les bactériocines, un terme proposé par **Hurst, (1981)** en les qualifiant de « *biological food preservatives* », produites par les bactéries lactiques associées au lait, à savoir : *Leuconostoc*, *Lactobacillus* et *Pediococcus* sont susceptibles d'avoir un potentiel beaucoup plus grand dans le biocontrôle des germes pathogènes (**Stiles *et al.*, 1991 ; Lewus *et al.*, 1991 ; Abee *et al.*,1995 ; Bromberg *et al.*, 2004**).

Les résultats illustrées dans les figures 3.20, 3.21, 3.22, 3.23 a l'issu de la cinétique de l'évolution du pH de nos deux isolats performants L_{Y44}, L_{Y46} en culture pure et en culture mixte indiquent que les deux souches indicatrices *Listeria innocua ATCC 33090* et *Staphylococcus aureus ATCC 6538* sont moins acidifiantes en culture pure dans le milieu lait, observée par une chute de pH de 7.01 à 5.05, 6.96 à 5.08 après 24h respectivement. Par ailleurs, en culture mixte le potentiel de pH se montre plus acide après 24h (3.97 et 3.99 respectivement).

Suite a l'étude de la cinétique de l'acidité et évolution du pH montrée dans les figures 3.20, 3.21, 3.22, 3.23, elles révèlent une vicissitude notable soit en culture pure ou en culture mixte, qui s'explique par la production des acides organiques surtout lactique et acétique par nos isolats de *Leuconostoc* (8.55, 8.37g/l après 24h). De ce fait, on peut conclure que le temps d'incubation a influencé positivement sur le rendement de nos isolats. Conséquemment, on peut constater que la quantité d'acide produite change selon le stade de vie de la bactérie, cette différence peut être expliquée par une déficience dans le système du transport des substances fermentescibles du milieu vers le cytoplasme cellulaire **(Albenzino *et al.*, 2001).**

Cette variation dans la cinétique d'acidification peut être démêlée par plusieurs facteurs, le plus important c'est l'aptitude de nos isolats à posséder une activité protéolytique, cette dernière codée par un matériel extra-chromosomique **(Juillard *et al.*, 1998).**

Du faite que les milieux permettant le développement des bactéries lactiques sont aqueux et complexes du point de vue nutritionnel. Ils présentent soit des substrats de fermentation soit des écosystèmes digestifs comme c'est le cas pour les bactéries lactiques séjournant dans le tractus intestinal de l'homme ou des animaux, ou des écosystèmes alimentaires. Ces écosystèmes sont également peuplés par de nombreux autres microorganismes comprenant des espèces pathogènes ou d'altération.

Eu égard, cette présente étude, la première approche qui a été choisie pour développer une microflore compétitive qui pourra être exploitée comme culture protectrice maitrisant la croissance des pathogènes dans les produits alimentaires. Par ailleurs, à notre connaissance, beaucoup d'études menées sur différents types d'antagonisme demeurent sporadiques au niveau algérien. Ainsi, une sélection des candidats les plus prometteurs s'est basée sur la démarche suivante, selon l'ordre suivant : (1), un *screening* «*in vitro*» apportant des informations qualitatives primaires sur une activité antimicrobienne possible, (2) suivie d'une méthode descriptive amenant à des informations quantitatives relatives à la dynamique de croissance.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne envers *Listeria innocua ATCC 33090* révèle une petite variation de la répétabilité (donnant limite inferieure de la variabilité des résultats) ce qui indique une dispersion intérieure assez proche jusque nulle traduit par des coefficients de répétabilité homogènes (L_{Y01} : 1.06 %, L_{Y05} : 1.59 %, L_{Y09} :1.06 %, L_{Y44} : 1.06 %, L_{Y46} : 0 %, L_{Y50} : 1.06 %). Inversement, d'un isolat à l'autre les diamètres d'inhibition varient légèrement (12.9, 12.85, 13, 14.4, 15.5 et 10.9 mm respectivement pour L_{Y01}, L_{Y05}, L_{Y09}, L_{Y44}, L_{Y46} et L_{Y50}), signifiant ainsi que les potentiels observés connaissent une distribution peu homogène, interprétée par un carré moyen entre isolat (externe) supérieur à celui du carré intérieur qui est de l'ordre de 0.377 et 0.123 respectivement. Le coefficient de reproductibilité a affiché une valeur de 11.80% (donnant limite supérieure de variabilité des résultats).

Par ailleurs, l'estimation de cette activité envers *Staphylococcus aureus ATCC 6538* affiche une variabilité peu notable traduit par des coefficients de répétabilité peu homogènes (L_{Y01} : 1.75 %, L_{Y05} : 1.17 %, L_{Y09} :0.58 %, L_{Y44} : 1.17 %, L_{Y46} : 1.17 %, L_{Y50} : 1.75 %). A

l'opposé, les isolats s'expriment avec des zones d'inhibition (12.85, 10.9, 10.95, 14.1, 13.6 et 10.15 mm respectivement pour L_{Y01}, L_{Y05}, L_{Y09}, L_{Y44}, L_{Y46} et L_{Y50}), évoqué ainsi une capacité antistaphylococcique peu variable en comparant avec celle antilistériale expliquer par un antagonisme assez variable des *Leuconostoc* envers les deux pathogènes, avec un coefficient de reproductibilité de l'ordre de 13.52%.

Le dernier volet de la partie pratique de ce présent travail fut consacré au test descriptif qui à été utilisé pour déterminer l'efficacité des cultures les plus performantes, potentiellement bactériocinogèniques, par un suivie cinétique de la croissance du pathogène indicateur « *Listeria innocua ATCC 33090* » en présence des isolats test les plus performants L_{Y44} et L_{Y46}, une telle détermination semblait nécessaire pour des informations quantitatives sur l'impact des métabolites produits par les isolats retenus sur la dynamique du pathogène en question. Les phases de croissance peuvent être décrites quantitativement par : le temps de latence, le taux de croissance spécifique maximum « µ*max* », et l'asymptote « *ymax* » définit comme étant la charge microbienne maximale atteinte lors d'une croissance bactérienne (**Zwietering *et al.*, 1990 ; Brown, 2007**). Le cas de cette étude, le paramètre µ*max* fut retenu, étant suffisant pour apprécier les réponses de la population microbienne du pathogène à la présence des isolats de *Leuconostoc*.

Différentes classes de modèles prédictifs de la croissance de population animale /microbienne existent, que ce soit pour l'étude de peuplement à évolution exponentielle ou sigmoïdale microbienne à fin d'apporter une appréciation quantitative de la dynamique ponctuée par des valeurs difficilement décelables à partir d'une simple courbe observée. Les plus utilisés sont les modèles de Gompertz (**Gibson *et al.*, 1987 ; Zwietering *et al.*, 1990**), de Baranyi (**Baranyi *et al.*, 1993 ; Baranyi *et* Roberts, 1994**) ou le modèle logistique avec délai et rupture (**Kono, 1968 ; Broughall *et al.*, 1983 ; Rosso, 1995**). Aussi ces modèles donnent des estimations des paramètres de croissance légèrement différents (**Sanaa, 2002**). Ainsi ces paramètres de croissance peuvent être utilisés pour décrire l'effet inhibiteur de certains produits bioactifs (**Skyttä *et al.*, 1991**). Par ailleurs, la sécurité et l'espérance de vie des produits alimentaires sont dictées par le temps requis par les microorganismes pathogènes et ou d'altération d'atteindre un niveau critique, c'est pourquoi

l'estimation quantitative de µ*max* est à la fois nécessaire et d'une grande importance en microbiologie prédictive (**Dalgaard *et al.*, 1994**).

Les taux de croissance spécifique maximum « µ*max* » ont été estimés par le modèle de **Baranyi & Roberts (1994)** enregistrant des réductions significatives (en pourcentage par rapport au control) de la charge listériale, observée après addition des cultures protectrices L_{Y44}, L_{Y46} de l'ordre de 37.5% et 39.49% respectivement. La plus grande régression bactérienne à été attribué à la culture L_{Y46} (Figures 3.24, 3.25).

Tandis que, la charge staphylococcique affiche une diminution moins notable après l'ajout des cultures test L_{Y44} et L_{Y46} de l'ordre 19.29% et 17.35% respectivement.

Suite à l'étude de la cinétique de croissance, les cultures testées montrent une croissance assez lente, une qualité qui les favorisent comme souches bioprotectrices pour la maîtrise des pathogènes du fait que ceci aboutie à une inhibition ou retardement de croissance de ces derniers. Elles enregistrent une réduction de la charge listériale de l'ordre de 4.56 unité log pour l'isolat L_{Y44}, et une réduction de l'ordre de 4.02 unité log de l'isolat L_{Y46}, une réduction moins importante si comparée avec l'addition de l'isolat L_{Y44}. Cette variation nous rapproche vers l'efficacité des bactériocines produites par les *Leuconostoc* envers les espèces de *Listeria* surtout *Listeria monocytogenes* et *Listeria innocua* (**Koo *et al.*, 2012**). En outre, il est d'une pertinence capitale d'arriver à une vérité qui affirme la spécificité de la bactériocine dite mesenterocin envers les espèces de *Listeria sp*.

Tandis que, l'inhibition de la charge staphylococcique, elles affichent une régression de croissance après l'addition des isolats L_{Y44} et L_{Y46} de l'ordre de 1.39, 0.82 unité log, respectivement (Figures 3.24, 3.25), une baisse moins importante montrant constamment la performance de l'isolat L_{Y44} (*Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides*) envers *Staphylococcus aureus*, même attitude avec celles des bactéries lactiques testées par **Guessas *et al.*, (2005)**.

Cette approche s'explique par la différence du comportement des micro-organismes au cours de la croissance au sein des aliments susceptibles à plusieurs facteurs écologiques qui peuvent être physiques, technologiques ou microbiens qui révèlent les interactions qui peuvent exister avec les bactéries lactiques présentes

dans l'aliment. Ils peuvent favoriser ou ralentir la croissance des microorganismes étudiés **(Augustin J.C., 2005).**

L'efficacité des deux souches testées au cours de cette étude étant démontrée par l'évaluation de l'impact positif de *Leuconostoc mesenteroides* sur les pathogènes testés (*Listeria innocua* et *Staphylococcus aureus*). Elle constitue pour autant une piste prometteuse pour l'application de telles auxiliaires en bioconservation, et maîtrise des pathogènes et microorganismes d'altération pour la protection des aliments, une assurance pour la santé des consommateurs, dont l'originalité réside dans leur « origine » lait de chamelle Algérien, promettant d'autres tenant compte de l'important potentiel économique dont jouie l'industrie agroalimentaire Algérienne.... La première pierre pour l'édifice d'une autosuffisance en termes de produits alimentaire fonctionnels...

Conclusion

L'objectif de la présente étude été d'isoler et de caractériser des *Leuconostoc* dotés d'une activité antagoniste afin de les utiliser en tant que cultures protectrices pour contrôler le niveau des germes pathogènes et d'altération dans les aliments.

Ainsi la première étape de ce travail a aboutie à l'identification de 21 isolats comme étant phénotypiquement appartenant au genre *Leuconostoc*. Les tests physiologiques et biochimiques ont révélées l'appartenance probable de 2 isolats à la sous-espèce *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides*, tandis que 19 isolats ont été classés comme étant *Leuconostoc mesenteroides* subsp *dextranicum.* Le screening de l'activité antimicrobienne a démontrée une activité antagoniste des isolats, orientée vers les pathogènes cibles (*Listeria innocua ATCC 33090* et *Staphylococcus aureus ATCC 6538*), menant ainsi à la sélection des isolats (L_{Y01}, L_{Y05}, L_{Y09}, L_{Y41}, L_{Y44}, L_{Y46}, L_{Y50}). Par ailleurs le suivi cinétique de croissance à prouver l'efficacité des souches performantes (L_{Y44}, L_{Y46}) pour maitriser les pathogènes en réduisant significativement la charge listeriale dans le milieu lait.

Cette étude, mériterait d'être poursuivie, afin d'accomplir les objectifs pour une meilleur application. La sommation de toutes ces considérations constitue une exhortation à l'usage de tels auxiliaires en bioconservation par des LAB indigènes de lait de chamelle Algérien. Par la suite, et pour une meilleur caractérisation de ces isolats lactiques, il serait souhaitable d'utiliser des outils moléculaires, censés être plus fiable en terme d'identification concise.

Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans ces myriades de phénomènes aussi complexes qu'extraordinairement efficaces mènera à une meilleure exploitation, et un meilleur usage de ces cultures bioprotectrices isolées a partir du lait de chamelle. Il apparait donc intéressant d'utiliser des souches de bactéries lactiques productrices de bactériocines pour contrôler le niveau de *Listeria* dans les produits alimentaires.

A cet égard, des perspectives intéressantes devront être ouvert en application locale, le choix d'utiliser les cultures bioprotectrices ou les bactériocines purifiées pour la

conservation des aliments semble être spécifique au cas particulier des souches du genre *Leuconostoc* et mérite d'être soigneusement évalués pour chaque application. Ainsi il faudrait utiliser en combinaison dans les produits laitiers plusieurs stratégies de lutte contre les germes nuisibles, qui mettre en œuvre de multiples systèmes antimicrobiens dirigés vers des cibles cellulaires différentes à fin de réduire la fréquence d'apparition de population résistantes (**Klaenhammer, 1993**).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABDELGADIR,W. S., AHMED, T. K. AND DIRAR, H. A., 1998. The traditional fermented milk products of the Sudan. *International Journal of Food Microbiology*, 44: 1-13.

ABEE, T., KROCKEL, L. & HILL, C., (1995): Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *International Journal of Food Microbiology*, **28:** 169-185.

ALBENZINO, M., CORBO, M. R., REHMAN, S. U., FOX, P. F., DEANGELIS, M., CORSETTI, A., SEVI, A. ET GOBETTI, M., 2001. "Microbiologicaland biochemical characteristics of Canestrato Pugliese cheesemade from raw milk, pasteurized milk or by heating the curd in hot whey, *International Journal of Food Microbiology*, 67: 35-48.

ALEMANY AGULLO, J., 2001. Caracterització de Metabòlits produïts per Soques de *Pseudomonas fluorescens* efectives en El Control Biològic de Fongs Fitopatògens. Girona: Université de Girona, Espagne.

ÁLVAREZ-LEON, E.E., ROMAN-VIÑAS, B., SERRA-MAJEM, L., 2006. Dairy products and health: a review of the epidemiological evidence. *The British Journal of Nutrition,* 1: 94-99.

AMMOR, S., TAUVERON, G., DUFOUR, E., & CHEVALLIER, I., 2006a. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1—Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control*, 6: 454–461.

AMMOR, S., TAUVERON, G., DUFOUR, E., & CHEVALLIER, I., 2006b. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. 2—Behaviour of pathogenic and spoilage bacteria in dual species biofilms including a bacteriocin-like-producing lactic acid bacteria. *Food control*, 17: 462-468.

ANONYME, (2006). Evolution des effectifs du cheptel de 1990 à 2005. Direction des statistiques Agricoles, Ministère de l'Agriculture, Algérie.

ASADUZZAMAN, S. M. & SONOMOTO, K., 2009. Lantibiotics : Diverse activities and unique modes of action. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107: 475-487.

ASLAM, M., SHAHID, M., REHMAN, F., MURTAZA, M.A., SHARIF, S., ATA, A. & NOOR, S., 2012. Production optimization and characterization of a low molecular weight bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *African Journal of Microbiology Research*, 6: 5924-5933.

AUGUSTIN J.C., 2005. Modélisation de la croissance microbienne et gestion de la sécurité sanitaire des aliments. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, pp 6-8.

AVRIL, J. L., DABERNAT, H. & DENIS, F., 2000. Bactériologie clinique. 3em édition. Ellipse. p. 140- 150

AXELSSON L., 2004. Lactic Acid Bacteria, Classification and Physiology in: Salminen Seppo., Von Wright Atte., Ouwehand Arthur., Lactic Acid Bacteria, Third Edition, Marcel Dekker, New York.

BADIS, A., GUETARNI, D., MOUSSA-BOUDJEMAA, B., HENNI, D. E. & KIHAL, M., 2004. Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat's milk of Algerian races. *Food. Microbiology,* 21: 579-588.

BAKR SHORI A., 2012. Comparative study of chemical composition, isolation and identification of micro-flora in traditional fermented camel milk products: Gariss, Suusac, and Shubat. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences.*, doi:10.1016/j.jssas.2011.12.001

BARANYI, J. & ROBERTS, T.A., 1994. A dynamic approach to predicting microbial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23: 277-294

BAYLON N., 1987. Recrudescence des Listérioses. *Medical Nutrition,* 6: 399- 401.

BEMRAH, N., SANNA, M., CASSIN, M.H., GRIFFITHS M. W. & CERF, O., 1998. Quantitative risk assessment of human listeriosis from consumption of soft cheese made from raw milk. *Prevent. Veter. Med*., **37**: 29- 145.

BENDIMERAD, N., KIHAL, M., BERTHIER, F., 2012. Isolation, identification and technological characterization of wild *Leuconostocs* and Lactococci for traditional raib type milk fermentation. *Dairy Science and Technology*. 92: 249-264.

BENKERROUM, N., DAOUDI, A. & MERYEM, K., 2003. Behaviour of *Listeria monocytogenes* in raw sausages (merguez) in presence of a bacteriocin producing lactococcal strain as protective culture. *Meat Science,* 63: 479-484.

BENKERROUM, N., MEKKAOUI, M., BENNANI, N. & HIDANE, K., 2009. Antimicrobial activity of camel's milk against pathogenic strains of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Dairy. Technol.*, 57: 39-43.

BERCHE, B., BRISABOIS, A., CATTEAU, M., FLANDROIS, J. P. & ROCOURT, J. 2000. Rapport de la commission d'étude des risques liés à *Listeria monocytogenes*. Commission *Listeria* AFSSA.

BJORKROTH, K. J., GEISEN, R., SCHILLINGER, U., WEISS, N., DE VOS, P., HOLZAPFEL, W. H., KORKEALA, H. J., & VANDAMME, P., 2000. Characterization of *Leuconostoc gasicomitatum sp*. nov., associated with spoiled raw tomato-marinated broiler meat strips packaged under modified-atmosphere conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 3764–3772.

BROMBERG, R., MORENO, I., ZAGANINI, C. L., DELBONI, R. R. & DE OLIVEIRA, J., 2004. Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from meat and meat products and its spectrum of inhibitory activity. *Brazilian Journal of Microbiology,* 35: 137-144.

BYCZKOWSKI, J., & GESSNER, T., 1988. Biological role of superoxide ion-radical. *International Journal of Biochemistry*, 20: 569–580.

CALLEWAERT, R., HUGAS, M. & DE VUYST, L., 2000. Competitiveness and bacteriocin production of Enterococci in the production of Spanish style dry fermented sausages. *Int. J. Food. Microbiol.,* 57: 33-42.

CARR, F.J., CHILL, D. & MAIDA, N., 2002. The lactic acid bacteria: A literature survey. *Crit. Rev. Microbiol*., 28: 281-370.

CASTELLANO, P.H., HOLZAPFEL, W.H. & VIGNOLO, G.M., 2004. The control of *Listeria innocua* and *Lactobacillus sakei* in broth and meat slurry with the bacteriocinogenic strain *Lactobacillus casei* CRL705. *Food Microbiology,* 21**:** 291-298.

CHEN, Y., LUDESCHER, R.D. & MONTVILLE, T.J., 1997. Electrostatic interactions, but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin PA-1 and its fragments to phospholipid vesicles. *Appl. Environ. Microbiol*., 63: 4770– 4777.

CHEN, Y., LUDESCHER, R.D. & MONTVILLE, T.J., 1998. Influence of lipid composition on pediocin PA-1 binding to phospholipid vesicles. *Appl. Environ. Microbiol*., 64**:** 3530– 3532.

CLEVELAND, J., MONTVILLE, T.J., NES, I.F. & CHIKINDAS, M.L., 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Foos Microbiology*, 71**:** 1-20

COGAN, T. M., BARBOSA, M., BEUVIER, E., BIANCHI-SALVADORI, B., COCCONCELLI, P. S., FERNANDES, I., GOMEZ, J., GOMEZ, R., KALANTZOPOULOS, G., LEDDA, A., MEDINA, M., REA, M. C., & RODRIGUEZ, E., 1997. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of Dairy Research*., 64**:** 409–421.

DAESCHEL, M. A., 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technology*, 43: 164–167.

DALGAARD, P., 1995. Modelling of microbial activity and prediction of shelf life for packed fresh fish. *International Journal of Food Microbiology*, 26: 305-317

DEVOYOD, J.J. & POULLAIN F., 1998. Les *Leuconostocs* propriétés : leur rôle en technologie laitière. *Revue Le lait*, 68: 249-280.

DE VUYST, L. & DEGEEST, B., 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol.Rev.,* 23: 130–135.

DORTU, C. & THONART, P., 2009. Les bactériocines des bactéries lactiques: caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **13(1):** 143-154.
DOYLE, M. P. & MENG, J., 2006. Bacteria in Food and Beverage Production. In : Dworkin Martin., Falkow Stanley., Rosenberg Eugene., Schleifer Karl-Heinz, Stackebrandt Erko. The Prokaryotes, Third Edition, Springer : 797-811.

EDMOND, B., 1992. Relation homme animal dans les sociétés pastorale. D'hier et d'aujourd'hui, *Agricultural Journal*.
EL AGAMY, E.I., RUPPANNER, R., ISMAIL, A., CHAMPAGNE, C.P. & ASSAF, R., 1992. Antibacterial and antiviral activity of camel milk protective proteins. *Journal Dairy Researchs,* 59: 169-175.
EL SODA, M., AHMED, N., OMRAN, N., OSMAN, G. & MORSI, A., 2003. Isolation, identification and selection of lactic acid bacteria cultures for cheesemaking. *Emirates Journal of Agricultural Sciences*, 15: 51-71
ENNAHAR, S., SASHIHARA, T., SONOMOTO, K., & ISHIZAKI, A., 2000. Class IIa bacteriocins: Biosynthesis, structure, and activity. *FEMS Microbiology Reviews*, 24: 85–106.
ENNAHAR, S., CAI, Y. & FUJITA, Y., 2003**.** Phylogenetic diversity of lactic acid bacteria associated with paddy rice silage as determined by 16S ribosomal DNA analysis. *Application Environment Microbiology,* 69: 444–451.

FARAH Z., 1993. Composition and Characteristics of Camel Milk ; review. *Journal of Dairy Researchs*, 60: 603-626.
FARAH, Z., MOLLET, M., YOUNAN, M., & DAHIR, R. 2007. Camel dairy in Somalia: limiting factors and development potential. *Livestock Science*, 110: 187-191.
FARBER, J. M., 1991. Microbiological aspects of modified-atmosphere packaging technology a review. *Journal of Food Protection,* 54: 58–70.
FELIX, J.V., PAPATHANASOPOULOS, M.A., SMITH, A.A., VON HOLY, A., HASTINGS, J.W., 1994. Characterization of leucocin B-Ta11a: a bacteriocin from *Leuconostoc carnosum* Ta11a isolated from meat. *Current Microbiology,* 29, 207–212.
FLEURY, Y., DAYEM, M.A., MONTAGNE, J.J., CHAMBOISEAU, E., LE CAER, J.P., NICOLAS, P. & DELFOUR, A., 1996. Covalent structure, synthesis and structure–function studies of Mesentericin Y105, a defensive peptide from gram-positive bacteria. *Journal of Biology and Chemistery,* 271: 14421–14429.
FOOKS, L. J., & GIBSON, G. R. 2002a. Invitro investigations of the effect of probiotics and prebiotics on selecte human intestinal pathogens. Federation of European Microbiological Societies. *Microbiology Ecology*, 39: 67-75.
FOOKS, L. J., & GIBSON, G. R. 2002b. Mixed culture fermentation studies on the effects of symbiotics on the human intestinal pathogens *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli*. *Anaerobe*, 9: 231-242.
FREGEAU-GALLACHER, N.L., SAILER, M., NIEMCZURA, W.P., NAKASHIMA, T.T., STILES, M.E. & VERDERAS, J.C., 1997. Three-dimensional structure of Leucocin A in TFE and dodecylphosphocholine micelles: spatial location of residues critical for biological activity in type IIa bacteriocins from lactic acid bacteria. *Biochemistry,* 36: 15062–15072.
FREMEAUX, C., HECHARD, Y. & CENATIEMPO, Y., 1995. Mesentericin Y105 gene clusters in *Leuconostoc mesenteroides* Y105. *Microbiology,* 141: 1637– 1645.

GARVIE, E. I., 1986. Genus Leuconostoc van Tieghem 1878. In P. H. A.Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, & J. G. Holt (Eds.), Bergey's manual of systematic bacteriology (pp. 1071–1075). Baltimore: Williams and Wilkins.
GHAZI, F., HENNI, D. E., BENMCHERNENE, Z. & KIHAL M., 2009. Phenotypic and Whole Cell Protein Analysis by SDS-PAGE for Identification of Dominants Lactic Acid Bacteria Isolated from Algerian Raw Milk. *World Journal of Dairy Food Science*, 4: 78-87.

GILL, C. O. & BADONI, M., 2004. Effects of peroxyacetic acid, acidified sodium chlorite or lactic acid solutions on the microflora of chilled beef caracasses. *International Journal of Food Microbiology*, 91: 43-50.
GRAU, F.H., AND VANDERLINE, P.B., 1990. Growth of *Listeria monocytogenes* on vacuum packaged beef. *Journal Food Protect*, 53: 452-459.
GUEGUEN, Y., CHEMARDIN, P., LABROT, P., ARNAUD, A., & GALZY, P., 1997. Purification and characterization of an intracellular β-glucosidase from a new strain of *Leuconostoc mesenteroides* isolated from cassava. *Journal of Applied Microbiology*, 82: 469–476.
GUESSAS, B. & KIHAL, M., 2004. Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goats' milk. *African Journal of Biotechnology*, 3: 339-342.
GUESSAS, B., HADADJI, M., SAIDI, N. & KIHAL, M., 2005. Inhibition of *Staphylococcus aureus* growth in milk by lactic acid bacteria. *Dirassat*, 32: 53-60.
GUIRAUD, J.P. 1998. Microbiologie alimentaire. Technique et Ingénierie. Série agroalimentaire, Eds. Dunod Paris, 652 p.

HASSAÏNE, O., ZADI, Z. K., KARAM, N.E., 2007. Technologically important properties of lactic acid bacteria isolated from raw milk of three breeds of Algerian dromedary (*Camelus dromedarius*). *African Journal of Biotechnology*. 6: 1720-1727.
HASTINGS, J. W., SAILER, M., JOHNSON, K., ROY, K. L., VEDERAS, J. C., AND STILES, M. E., 1991. Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. *J Bacteriol*.173: 7491-7500.
HECHARD, Y., DERIJARD, B., LETELLIER, F. & CENATIEMPO Y., 1992. Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-Listeria bacteriocin from *Leuconstoc mesenteroides*, *J. Gen. Microbiol*. 138: 2725– 2731.
HÉCHARD, Y. & SAHL, H. G. 2002. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie*, 84: 545–557.
HEMME, D. & FOUCAUD-SCHEUNEMANN, C., 2004. *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *Int. Dairy*, pp. 467-494.
HUOT, E., BARRENA-GONZALEZ, C. & PETTIDERMANGE, H., 1996. Tween 80 effect on bacteriocin synthesis by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* J46. *Letters in Applied Microbiology*. 22: 307-310

IBRAHIM, S. A., YANG, H., & SEO, C. W., 2008. Antimicrobial activity of lactic acid and copper on growth of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 in laboratory medium and carrot juice. *Food Chemistry*, 109: 137-143.
ITO, A., SATO, Y., KUDO, S., SATO, S., NAKAJIMA, H. & TOBA, T., 2003. The screening of hydrogen peroxide-producing lactic acid bacteria and their application to inactivating psychrotrophic food-born pathogens. *Current Microbiology*, 47: 231-236.

JACK, R.W., TAGG, J.R. & RAY, B., 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiology Reviews*, 59: 171-200.
JANS, C., BUGNARD, J., KAMAU, N., PATRICK, M., LACROIX, C. & MEILE, L., 2012. Lactic acid bacteria diversity of African raw and fermented camel milk products reveals a highly competitive, potentially health-threatening predominant microflora. *Lebensmittel Wissenschaft and Technology Journal*, **47:** 371-379
JAY, J. M., 1982. Antimicrobial properties of diacetyl. *Applied and Environmental Microbiology*, 44: 525–532.
JEEVARATNAM., *JAMUNA M. & BAWA A. S.,* 2005. Biological preservation of foods–Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Indian journal of biotechnology*. **4 :** 446-454.
JIN, L.Z., MARQUARDT, R.R. & ZHAO, X., 1999. Antagonism of *Lactobacillus spp*., *Streptococcus spp* and Bifidobacteria spp. Against Enterotoxigenic *Escherichia coli*. 1st Edn., University of Manitoba, Winnipeg, MB., Canada, pp: 24-25.

JOFFIN, J.N. & LEYRAL, G., 2006. Microbiologie technique. 4ième Ed CRDP d'acquitaine. Bordeaux. 363P.
JUILLARD, V., FOUCAUD, C., FLAMBARD, B., FURLAN, S., BELLENGIER, P. & RICHARD, J., 1998. Interaction entre bactéries mésophiles rôle des surfactants nutritionnels. *Le lait*, 78 **:** 91-97.

KAMAT, A.S. & NAIR, P.M., 1996. Identification of *Listeria innocua* as a biological indicator for inactivation of *Listeria monocytogenes* by some meat processing treatment. *Food Science and Technological Leb,* 29: 714-720.
KHAY, E.O., IDAOMAR, M., PASTRANA CASTRO, L.M., BERNÁRDEZ, P.F., SENHAJI, N.S., ABRINI, J., 2011. Antimicrobial activities of the bacteriocin-like substances produced by lactic acid bacteria isolated from Moroccan dromedary milk. *African Journal of Biotechnology*, 10: 10447-10455.
KHEDID, K., FAID, M., MOKHTARI, A., SOULAYMANI, A. & ZINEDINE, A., 2009. Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. *Microbiology Researchs,* 164: 81-91.
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 Algérie.
KIM, E-L., CHOI. N. H., BAJPAI V. K. & KANG. S. C., 2008. Synergistic effect of nisin and garlic shoot juice against *Listeria monosytogenes* in milk. *Food Chemistery,* 110: 375- 382.
KLAENHAMMER T.R., 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria, Federation of European Microbiological Societies. *Microbiology Reviews,* 12: 39-86.
KONG, S., & DAVISON, A. J. 1980. The role of interactions between O2, H2, OH _ , e_ and O2_ in free radical damage to biological systems. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 204: 18-29.
KOO, O-K., EGGLETON, M., O'BRYAN, C. A., CRANDALL, P.G. & RICKE, S. C., 2012. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* on frankfurters formulated with and without lactate/diacetate. *Meat science*, 202 : 1010-1016

LABIOUI, H., ELMOUALDI, L., EL YACHIOUI, M. & OUHSSINE, M., 2005. Sélection de souches de bactéries lactiques antimicrobiennes. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 144 : 237-250
LACROIX, M. & MILLETTE, M., 2011. Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria. US20110236359A1.
LARPENT, J. P., 2004. *Listeria*. 3ème édition. Technique et documentation. Londres- Paris- New York. Lavoisier. ISBN : 2- 7430-065769. 227 p.
LEBRES E. A., 2006. Etude de prévalence et analyse du risque de *Listeria monocytogenes* dans les laits crus dans la région centre. Thèse de Doctorat. Centre universitaire d'El Taref. 158 p.
LE MENNIER, A. & LECLERCQ, A., 2009. *Listeria* et listériose : des animaux d'élevage à nos assiettes. *Pathological Biology*, 5 : 17- 22.
LHOSTE, F., (2004). Lait de chamelle pour l'Afrique. Atelier sur la filière cameline en Afrique, Niamey, 5-8 novembre 2003, Animal production and health, Publication FAO, Rome.
LINDGREN, S. E. & DOBROGOSZ, W. J., 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Reviews*, 7: 149–163.
LINTON, M., MACKLE, A. M., UPADHYAY, V. K., KELLY, A. L. & PATTERSON, M. F., 2008. The fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture of Camembert-type cheese: A comparison between raw milk and milk treated with high hydrostatic pressure. *Innovative Food Science Emergency Technology,* 9: 423- 428
LYHS, U., 2002. Lactic acid bacteria associated with the spoilage of fish products PhD Thesis. Department of Food and environmental Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Finland. ISBN 952-10-0532-7..

MAFTAH, A., RENAULT, D., VIGNOLES, C., HECHARD, Y., BRESSOLIER, P., RATINAUD, M.H., CENATIEMPO, Y. & JULIEN, R., 1993. Membrane permeabilization of *Listeria monocytogenes* and mitochondria by bacteriocin mesentericin Y105. *Journal of Bacteriology*, 175: 3232– 3235.

MARKAS, L., & VUYST, L. D., 2006. The in vitro inhibition of Gram negative pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids. *International Dairy Journal*, 16: 1049-1057.

MARTH E. H., 1986. *Listeria* in dray foods. *Cheese Rep*, 111: 1.

MATARAGAS, M., DROSINOS, E.H. & METAXOPOULOS, J., 2003. Antagonistic activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* in sliced cooked cured pork shoulder stored under vacuum or modified atmosphere at 4 ± 20C. *Food. Microbiol*, 20: 259-265.

MATHOT, A.G., KIHAL, M., PREVOST, H., & DIVIES, C., 1994. Selective enumeration of *Leuconostoc* on Vancomycin agar medium. *International Dairy Journal*, 4: 459-469.

MEZAINI, A., CHIHIB, N.E., BOURA, A.D., NEDJAR-ARROUME N. & HORNEZ, J.P., 2009. Antibacterial activity of some lactic acid bacteria isolated from an algerian dairy product. *J. Environ. Publ. Health*.

MORAES, P.M., PERIN, L.M., TASSINARI, ORTOLANI, M.B., YAMAZI, A.K., VIÇOSA, G.N. & NERO, L.A., 2010. Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. *Food science and Technology,* 43: 1320-1324.

MORENO, I., LERAYER, A.L.S. & LEITAO, M.F.F., 1999. Detection and cheracterization of bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* strains. *Revista de Microbiologia,* 30 : 130-136.

MOSSADAK, T.H., MALEK, N., MARTIN, P., JACQUET, C., 2007. Identification and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated in raw milk in the region of Algiers (Algeria). *International Journal of Food Microbiology*, 116: 190-193.

NAIDU, A. S., UNAL, R. & TULPINSKI, J., 2006. Bacteriocins: Antimicrobial Activity and Applications. In: *food biotechnology*. Shetty Kalidas., Paliyath Gopinadhan., Anthony., Pometto., Levin Robert E.

NAKAMURA, S., KUDA, T., KANNO, T., AN, C., TAKAHASHI, H., KIMURA, B., 2012. Inhibitory effects of *Leuconostoc mesenteroides* 1RM3 isolated from *narezushi*, a fermented fish with rice, on *Listeria monocytogenes* infection to Caco-2 cells and A/J mice. *Anaerobe*, 1: 19-24.

OSMANGAOGLU, Ö., 2007. Detection and characterization of Leucocin OZ, a new *anti-listerial* bacteriocin produced by *Leuconostoc carnosum* with a broad spectrum of activity. *Food Control*, 18 : 118-123

PAROISSE, ME. & HIGGINS, DP., 1989. Extinction de *Listeria monocytogenes* dans une seule force jus d'orange : comparaison des méthodes de détection dans les populations mixtes. *Journal of food safety*, 9: 267-277.

PEIRIS T.L.V., 2009. Lactic acid bacteria. University of Sri jaya ardenapura, *Food science*, 102-106.

PIARD, J. C. & DESMAZEAUD, M., 1991. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria: 1. Oxygen metabolites and catabolism endproducts. *Lait*, 71: 525–541.

PIARD, J. C. & DESMAZEAUD, M., 1992. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria: 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait*, 72: 113–142.

PODOLAK, P. K., ZAYAS, J. F., KASTNER, C. L. & FUNG, D. Y. C., 1996. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 on beef by application of organic acids. *Journal of Food Protection*, **59:** 370–373.

RAMNATH, M., BEUKES, M., TAMURA, K. & HASTINGS, J. W., 2000. Absence of a putative mannose-specific phosphotransferase system enzyme IIAB component in a leucocin A-resistant strain of *Listeria monocytogenes*, as shown by two-dimensional sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*, 66: 3098–3101.

REVOL-JUNELLES, A.M. & LEFEBVRE, G., 1996. Purification and N-Terminal Amino Acid Sequence of Dextranicin 24, a Bacteriocin of *Leuconostoc* sp.. *Current Microbiology*, **33:** 136-137.

RICHARD, C., 2006. Evidence on correlation between number of disulfide bridge and toxicity of class IIa bacteriocins. *Food Microbiol*., 23: 175-183.

RINGO, E. & GATESOUPE, J., 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture*, 160 : 177-203.

ROCOURT, J., 2000. *Listeria* et Listériose : Position phylogénétique et Classification du genre *Listeria* .*Précis de bactériologie clinique*. 46 : 943- 952.
ROCOURT, J., 2002. Analyse du risque .*Listeria monocytogenes* dans les aliments prêts à consommer .Cours national d'Hygiène et de Microbiologie des Aliment.IPA Alger. p. 1-62.
ROCOURT, J., BEN EMBAREK, P., TOYOFUKU, H. & SCHLUNDT, J., 2003. Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready - to - eat food: the FAO/WHO approach. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*. 35: 263- 267.
RUIZ-BARBA, J.L. & JIMENEZ-DIAZ, R., 1994. Vitamin and amino acid requirements of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from green olive fermentations. *Journal of Applied Bacteriology*, 76: 350-355.

SCHILLINGER, U. & LÜKE, F.K., 1989. Antimicrobial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and environmental Microbiology*, 55: 1901-1906.
SCHÖBITZ, R., ZAROR, T., LEON, O. & COSTA, M., 1999. A bacteriocin from *Carnobacterium piscicola* for the control of *Listeria*
monocytogenes in vacuum-packaged meat. *Food Microbiol*. 16: 249-255.
SNIJDERS, J. M., VAN LOGTESTIJN, J. G., MOSSEL, D. A. A., & SMULDERS, F. J. M., 1985. Lactic acid as a decontaminant in slaughter and processing procedures. *Veterinary Quarterly*, 7: 277-282.
STILES, M.E., 1997a. Bacteriocins produced by *Leuconostoc* species. *Journal of Dairy Science*, 77: 2718-272.
STILES, M.E. & HOLZAPFEL, W.H., 1997b. Lactic acid bacteria of food and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36: 1-29

TAGG, J. R., DAJANI, A. S. & WANNAMAKER, L. W., 1976. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. *Bacteuological reviews,* 40: 722-756.
TAHIRI, I., DESBIENS, M., BENECH, R., KLEADR, E., LACROIX, C., THIBAULT, S., OUELLET, D. & FLISS, I., 2004. 'Purification, characterization and amino acid sequencing of divercin M35: a novel class IIa bacteriocin produced by *Carnobacterium divergens*', *International Journal of Food Microbiology*, 97: 123-136.
TANNOCK, G.W., 2004. A special fondness for lactobacilli. *Applied Environ. Microbiol*, 70: 3189-3194.
TANTILLO, M.G., DI PA. & NOVELLO, L., 2002. Bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* as starter culture in dry sausages. *New. Microbiology*, 25: 45-49.

VANEGAS, M. C., VÁSQUEZ, E., MARTINEZ, A. J. & RUEDA, A. M., 2009. Detection of *Listeria monocytogenes* from raw whole milk for human consumption in Colombia by real- time PCR. *Food Control,* 20: 430- 432.

WAGNER, M. & MCLAUCHLIN, J., 2008. Handbook of *Listeria monocytogenes :* Biology. CRC Press. Boca Raton. Floride. USA. ISBN: 13- 978-1 - 4200-5140-7. p. 3-25.
WILSON, R. T., 1998. Camels. London, UK: MacMillan Educational Press Ltd. pp. 120-124, CTA series.

XIRAPHI, N., GEORGALAKI, M., RANTSIOU, K., COCOLIN, L., TSAKALIDOU, E. & DROSINOS, E.H., 2008. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* E131. *Meat Science,* 80: 194-203.

YAGIL, R. 1982. Camels and camel milk. Rome: Food and Agriculture Organization (FAO Animal Production and Health Paper No. 26 pp. 14-19).

ZADI, H.K., KARAM, N. N. 2006. Bactéries lactiques du lait de chamelle d'Algérie: mise en évidence de souches de *Lactococcus* résistantes au sel. *Tropicultura*, 24: 153-156
ZEUNER F.E., 1963. A History of Domesticated Animals. Hutchinson Ed., London.

Annexe A : Milieux de culture.

Bouillon MRS (De Man., Rogosa & Sharpe, 1960)

Formule par litre :

Peptone	10 g
Extrait de viande	10 g
Extrait de levure	5 g
Glucose	20 g
Acétate de sodium	5 g
Citrate de sodium	2 g
K_2HPO_4	0.2 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05g
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0.015g
Agar-agar	15g
Eau distillée	1000ml
pH	6.2

Autoclavage à 120°C pendant 20 min

MSE (Mayeux, Sandine and Eliker, 1962)

Tryptone	20 g
Gélatine	2.5 g
Extrait de levure	5 g
Saccharose	100 g
Glucose	5 g
Citrate de sodium	1 g
Azide de sodium	0.075 g
Agar-agar	15g
Eau distillée	1000ml
pH	6.8

Autoclavage à 120°C pendant 20 min

Milieu M16 BCP, Thomas, 1973

Peptone	10 g
Extrait de viande	5 g
Extrait de levure	2.5 g
Lactose	2 g
Acide ascorbique	0.5 g
L-arginine	4 g
Pourpre de bromocrésol	0.05 g
Agar-agar	15 g
Eau distilée	1000ml
pH	6.8

Autoclavage à 120°C pendant 20 min

Milieu KMK (Kempler Mc Kay, 1980)

Extrait de levure	3 g
Biopolytone	2.5 g
Glucose	5 g
Agar	15 g
Eau distilée	1000ml
pH	6.6

Le milieu est rempli à raison de 100ml par flacons, puis autoclavé 15 minutes à 120°C.

Au moment de l'emploi on ajoute :
1ml d'une solution aqueuse de ferricyanide de potassium 10% (p/v).
1ml d'une solution aqueuse à 2.5% (p/v) de citrate ferrique et citrate de sodium (p/p).
Ces solutions sont stérilisés par filtration sur filtres millipores 0.22 µm et ils sont conservés à l'obscurité à 4°C.

Milieu MRS BCP

MRS (milieu liquide) moins l'extrait de viande et sans sucre	1000ml
Pourpre de bromocrésol	0.025 mg

Autoclavage à 120°C pendant 20 min

L'eau physiologique

Chlorure de Sodium	8.5 g
Peptone	0.5 g
Eau distilée	1000ml
pH	7.0

Autoclavage à 120°C pendant 20 min

Milieu Mueller-Hinton (Mueller et Hinton, 1941)

Infusion de viande de bœuf	300cm^3
Peptone de caséine	17.5 g
Amidon de maïs	1.5 g
Agar-agar	17 g
pH	7.4

Autoclavage à 120°C pendant 20 min

Bouillon nutritif

Extrait de viande	1 g
Extrait de levure	2 g
Peptone	5 g
Chlorure de Sodium	5 g
Eau distilée	1000ml
pH	7.4

Autoclavage à 120°C pendant 20 min

Lait écrémé

Lait en poudre	300cm^3
Extrait de levure	17.5 g
Eau distilée	1.5 g

Autoclavage à 110°C pendant 10 min.

- **Gélose nutritive GN**

Préparation du milieu : Le milieu est préparé à partir du bouillon nutritif Merck© (8 g/L), mélangé d'agar (15.0 g/L). Additionner les ingrédients à l'eau distillée dans un volume de 1 litre, agiter ensuite avec chauffage et distribuer dans des tubes à essais. Enfin autoclaver 15 min à 15 psi (121 °C). Le pH du milieu est ajusté à 7.0 ± 0.2 à 25 °C.

- **Bouillon BHI (Brain Heart Infusion) (Fluka®)**

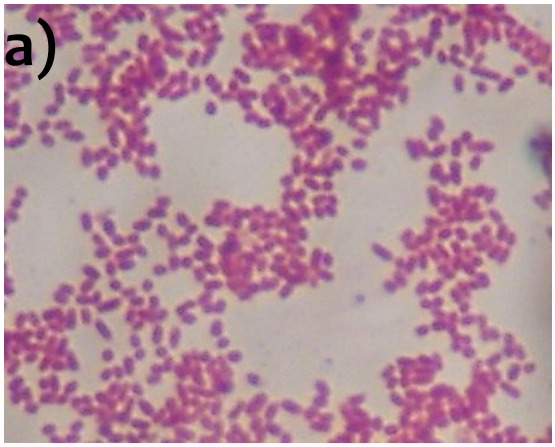
Préparation du milieu : dissoudre 37 g dans un volume de 1 litre d'eau distillée, agiter avec chauffage, distribuer dans des tubes à essais et autoclaver 15 min à 15 psi (121 °C). Le pH du milieu est ajusté à 7.4 ± 0.2 à 37 °C.

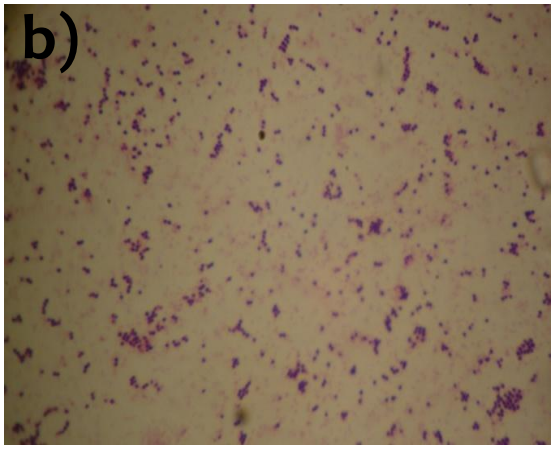
- **Solution tamponnée 0.2M :**

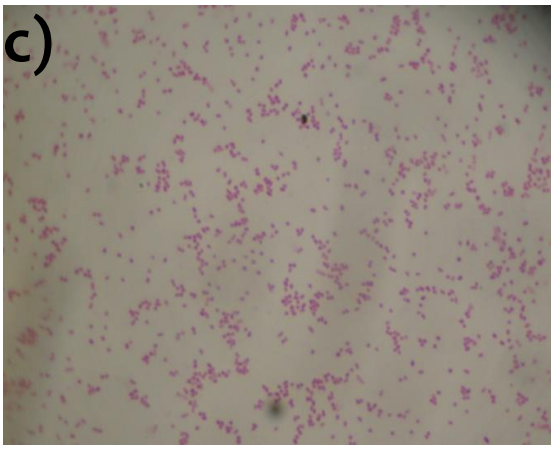
La solution A : phosphate mono sodique : 27,8g de NaH_2PO_4 dans 1000ml.
La solution B : phosphate disodique : 53,65g de Na_2HPO_4, $7H_2O$ (71,5g de Na_2HPO_4, $12H_2O$) dans 1000 ml.
Au moment de l'emploi, on mélange 39ml de la solution A avec 6 ml de la solution B.
Ce mélange est utilisé pour préparer 200ml de milieu de culture.

Annexe B : Résultats de la coloration de *Gram* des souches indicatrices.

(a) *Listeria innocua ATCC 33090*, (b) *Staphylococcus aureus ATCC 6538*, (c) *E .coli ATCC 8739*.







Résumé

Les bactéries lactiques sont économiquement importantes à cause de leur utilisation étendue dans les fermentations des aliments. Plusieurs espèces de LAB comme *Leuconostocmesenteroides* produisent une large variété de substances avec une activité antimicrobienne qui peut être utilisée pour la préservation des aliments. Ces substances ont une activité inhibitrice dirigée contre les bactéries proches de la souche productrice.Dans la présente étude 60 isolats de bactéries lactiques isolées à partir du lait cru de chamelleont été identifiées phénotypiquement suite aux tests physiologiques et biochimiques pour sélectionner les *Leuconostoc*des autres lactiques. A l'issue desquels 21 isolats ont été agencés dans le *GenreLeuconostoc.*Par la suite*, u*ne identification au niveau de *l'espèce* a été entreprise en s'intéressant au profil biochimique (fermentation des sucres) qui révèle l'appartenance de nos isolatsau*Leuconostocmesenteroides*avec ces deux sous espèces*Leuconostocmesenteroides*subsp*mesenteroides*et*Leuconostocmesenteroides*subsp *dextranicum*. Un *screening* d'activité antibactérienne putative en deux méthodes *in vitro* (directe « *SpotAgarTest »,* et indirect « *WellDiffusionAssay* ») à été réalisé à l'encontre de 3 souches pathogènes ou altérantes : *Listeria innocua ATCC 33090* du souchier de laboratoire LMA*et E.coli ATCC 8739, Staphylococcus aureus ATCC 6538* de l'unité ouest de LNCP Oran*.* Le screening initial a permis de sélectionner 17 candidats ayant un potentiel antagoniste envers les pathogènes, le second àpermis de retenir 6 *Leuconostoc meseneteroides bactériocinogènes*. Une description de la réponse des pathogènes indicatrices (*Listeria innocua ATCC 33090, Staphylococcus aureus ATCC 6538*) à la présence des isolats les plus performantsà été réalisée par un suivie cinétique de la croissance de ces pathogènes.

La technologie des cultures bio-protectrices serait ainsi une solution de choix pour une amélioration exemplaire de la sécurité microbiologique en Algérie.

Mots clés :

Leuconostoc Mesenteroides; Bactérie Lactique; Lait Chamelle; Effet Antimicrobien; Evaluation; Bactériocines; Acide Lactique; *Contrôle; Listeria Innocua; Staphylococcus Aureus.*