

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

UNIVERSITE "DR. TAHAR MOULAY SAÏDA"
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



MEMOIRE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
MASTER

SPECIALITE : Biologie

OPTION : microbiologie appliqué

Thème :

**Isolement et pré-identification des bactéries lactiques du
lait de chèvre et de chamelle de la wilaya de LAGHOUAT**

PRESENTÉ PAR:

- **Hamidi Chadia**

Soutenu le : 22/06/2017

Devant le jury composé de :

Président : Dr. Terras Mohamed

Examineur : Dr. Adli Djallel Eddine

Encadreur : Dr. Ammam . Abdelkader

Année Universitaire : 2016-2017

REMERCIEMENT

Avant tout, je remercie Dieu le Tous Puissant de m'avoir donné la force, le courage, la santé et la patience pour pouvoir accomplir ce travail.

Au terme de ce travail, mes remerciements au Prof. AMMAM K. Pour la confiance que vous avez placée en moi. Ses conseils judicieux m'ont permis de mener à bien ce travail.

Je tiens bien sûr à remercier LES MEMBRES DE JURY d'avoir accepté d'évaluer mon travail et de l'investissement que cela représente.

Je remercie beaucoup plus ma sœur nabila pour son soutien et pour tous ce qu'elle a fait pour moi .

Mes remerciements s'adressent, à mon mari, et toute personne ayant participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Résumé

Les bactéries lactiques font naturellement partie de notre environnement et notre alimentation, on reconnaît depuis longtemps aux bactéries lactiques la propriété de produire des substances antimicrobiennes ainsi leur utilisation dans la fermentation et la bio-préservation des aliments.

La recherche des souches de bactéries lactiques productrices des substances antimicrobiennes a été entreprise à partir du lait cru de chamelle et de chèvre.

L'isolement des bactéries lactiques à partir de lait cru de chèvre et de chamelle nous a permis d'obtenir 06 souches (Gram positif, catalase négatif) qui ont été purifiées et conservées.

L'étude des caractéristiques phénotypiques ; biochimiques et physiologiques (type fermentaire, croissance en présence de NaCl : 4% et 6,5% , test de croissance à différentes températures :30°C et 45°C, test de croissance en milieu lait UHT, test d'hydrolyse de l'arginine (ADH), production d'acétoïne, utilisation du citrate ,production de CO₂ à partir du citrate ,test des sucres) a permis d'identifier *Leuconostoc mesenteroides subsp mesenteroides* et *leuconostoc mesenteroides subsp dixtranicum*

Les souches testées ont été testées pour leur effet antibactérien à l'encontre de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Escherichia coli* ATCC 25922 et salmonella .L'interaction de nos souches lactiques et les bactéries pathogènes a donné des résultats positifs pour presque de toutes les souches observées par des zones d'inhibition .

Mots clés : activité antibactérienne ; Bactéries lactiques ; *Leuconostoc*; interaction lait de chèvre ; lait de chamelle

Abstract :

Lactic acid bacteria are a natural part of our environment and our food. It has long recognized, with the property of lactic acid bacteria produce antimicrobial substances and are used in fermentation and food biopreservation.

The search for lactic acid bacteria strains producing antimicrobial substances has been taken from the raw goat's milk and camel's milk .

The isolation of lactic acid bacteria from raw cow's milk and goat's allowed us to obtain 06 strains (Gram positive, catalase negative) were purified and stored.

The study of phenotypic characteristics, biochemical and physiological (fermentation type, growth in the presence of 4% NaCl and 6.5%, growth at pH 9.6, the ability to grow at 30°C and 45°C, survival after heating at 60°C for 30 min, , hydrolysis of arginine (ADH) test, hydrolysis of esculin, production of acetone, citrate utilization, CO₂ production from citrate, production of exopolysaccharides,

The 06 strains were tested for their antibacterial effect against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Salmonella* ATCC 25983 . All our lactic acid bacteria strains showed antimicrobial activity against pathogenic bacteria, observed by zones of inhibition.

Keywords: Lactic acid bacteria ; *Leuconostoc* ; Interaction ; antibacterial activity; goat's milk ; camel's milk .

ملخص

بكتيريا حامض اللاكتيك هي جزء من بيئتنا و غذائنا، نعلم منذ قديم الزمن أن هذه البكتيريا لها خاصية إنتاج مواد مضادة للمكروبات فهي تستخدم في التخمير و حفظ الأغذية، إن البحث عن سلالات بكتيرية منتجة للمواد المضادة للمكروبات و الذي تم على مستوى حليب الماعز و الناقة.

عزل بكتيريا حامض اللاكتيك من حليب الماعز و الناقة سمح لنا الحصول على ستة سلالات (موجبة الصبغ لجزام، سالبة الكتلاز) التي تم تنقيتها و تخزينها.

دراسة الخصائص المظهرية البيوكيميائية و الفيزيولوجية (نوع التخمير، النمو في وسط يحتوي على كلوريد الصوديوم بتركيز 3 % و 6,5 %، اختبارات النمو في درجات حرارة مختلفة 4 و 15 و 37 و 45 درجة مئوية، دراسة المقاومة الحرارية، اختبار تحلل الأرجنين ADH، اختبار إنتاج الأسيتون، استخدام السيترات، إنتاج CO2 من السيترات، اختبار تحليل السكر.

هذه التحاليل مكنتنا من عزل نوعين من السلالات:

Leuconostoc mesenteroides subsp mesenteroides et Leuconostoc mesenteroides subsp dixtranicum.

هذه السلالات اختبرت بسبب تأثيرها المضاد للبكتيريا الضارة (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Salmonella* ATCC 25982)، و قد أثبتت فعاليتها ضد هذه الأخيرة.

كلمات مفتاحية:

بكتيريا حامض اللاكتيك، لوكونوستوك، النشاط المضاد للبكتيريا، حليب الماعز و حليب الناقة.

Sommaire

Remerciement	
Résumé	
Abstract	
Résumé en arabe	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Sommaire	

Chapitre1 :

Généralité sur le lait utilisé pour l'isolement des souches lactiques

1.1. Le lait de chamelle	5
1.1.1. Définition de lait de chamelle.....	5
1.1.2. Caractéristiques du lait de chamelle	5
1.1.2.1. Caractéristiques physiques et organoleptiques	5
1.1.2.2. Qualité microbiologique du lait camelin.....	7
1.2. Le lait de chèvre	9
1.2.1. Le lait de chèvre.....	9
1.2.2 - Caractéristiques Physico-Chimiques.....	10
1.2.2.1- pH.....	10
1.2.2.2 - Composition chimique.....	10
1.2.3 - Caractéristiques Microbiologiques.....	12
1.2.3.1 – Bactéries.....	12

Chapitre 2 :

Les bactéries lactiques

2.1. Présentation générale	15
2.2. Taxonomie des bactéries lactiques	15
2.3. Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques	16
2.3.1. Genre <i>Lactobacillus</i>	16
2.3.2. Genre <i>Lactococcus</i>	17
2.3.3. Genre <i>Streptococcus</i>	18
2.3.4. Genre <i>Enterococcus</i>	18
2.3.5. Genres <i>Leuconostoc</i> , <i>Oenococcus</i> et <i>Weissella</i>	19
2.3.6. Genres <i>Pediococcus</i> et <i>Tetragenococcus</i>	20
2.3.7. Genre <i>Bifidobacterium</i>	20
2.4. Identification des bactéries lactiques	21
2.4.1. Caractères morphologiques et structuraux.....	21
2.4.2. Caractères physiologiques et biochimiques	22
2.5. Principales voies fermentaires des bactéries lactiques	23
2.5.1. Voie homofermentaire ou EMP.....	23
2.5.2. Voie hétérofermentaire ou voie des pentoses phosphate.....	23
2.6. Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques	23
2.6.1. Acides organiques	24
2.6.2. Acides gras	24
2.6.3. Peroxyde d'hydrogène	25
2.6.4. Dioxyde de carbone (CO ₂)	25
2.6.5. Diacétyle.....	25
2.6.6. Acétaldéhyde.....	26
2.6.5. Reutérine	26
2.7. Les bactériocines des bactéries lactiques	26
2.7.1 Définition.....	26
2.7.2. Classification.....	27
2.7.3 Mécanisme d'action.....	31

Chapitre 03 :

Matériel et méthodes

3.1. Objectif de l'étude	35
3.2. Prélèvement et collection des échantillons	35
3.3. Souches utilisées	35
3.4. Isolement et culture de la flore lactique	35
3.5. Purification et conservation des souches	36
3.6. Identification des isolats	38
3.6.1. Critères morphologiques	38
3.6.2. Critères physiologiques et biochimiques	38
3.6.2.1. Test de catalase.....	38
3.6.2.2. Croissance à différentes températures	38
3.6.2.3. Type fermentaire	39
3.6.2.4. La culture à Ph9,6 et celle en présence de NaCl :4 %,6,5%.....	39
3.6.2.5. Production de l'acétoine	39
3.6.2.6 Production de CO ₂ à partir de citrate	40
3.6.2.7. Utilisation des citrates	40
3.6.2.9 Dégradation d'arginine(ADH)	40
3.6.2.10. Fermentation des hydrates de carbones.....	41
3.7. Etude de l'activité antibactérienne des souches	41
3.7.1. Méthode de double couche (méthode de Fleming et al.,1975)	41
3.7.2. Méthode de puits (méthode de Barefoot et Kaenhammer,1983)	43

Chapitre 04 :

Résultats et discussion

4.1.Résultats	46
4.1.1. Identification des isolats	46

4.1.1.1. Critères morphologiques.....	48
4.1.1.2. Critères physiologiques et biochimiques	48
4.1.1.3. Identification de l'espèce	53
4.1.2 . Résultats de l'activité antibactérienne.....	54
4.2. Discussion.....	57
4.2.1. Isolement et identification des souches	57
4.2.2 : l'activité antibactérienne	59
Conclusion	62
Références bibliographiques.....	65
Annexes	

Chapitre I

**Généralité sur le lait utilisé pour
l'isolement des BL**

Introduction

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes très répandues dans la nature. On les retrouve dans le sol, sur les végétaux, elles jouent un rôle important dans notre santé car elle constitue une fraction majeure de notre flore intestinale et tapissent les muqueuses nasales buccales et vaginales, contribuant ainsi à nous protéger contre l'invasion des germes pathogènes).(Klaenhammer et *al.*,2005).

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes de catégorie alimentaire qui jouent un rôle essentiel dans la fermentation des matières premières animales et végétales. Elles occupent des niches écologiques extrêmement variées. Leur capacité à fermenter les hydrates de carbone et, à un moindre degré, de dégrader les protéines et les lipides mène à la synthèse d'une large gamme des composés, tels que les acides organiques, les peptides, les composés antimicrobiens et aromatiques et les exo polysaccharides. Ces métabolites peuvent contribuer aux caractéristiques organoleptiques, technologiques et nutritionnelles des aliments fermentés (Mozzy et *al.*, 2010).

Depuis l'époque de Louis Pasteur et Robert Koch, il y a eu un besoin essentiel d'identification scientifique pour contrôler les microorganismes de l'environnement. En plus la découverte de la pénicilline par Alexander Flemming en 1929 a ouvert la porte pour l'usage thérapeutique des antibiotiques dans le domaine médical et vétérinaire afin

de lutter contre les microorganismes pathogènes. D'autres agents chimiques de conservation et additifs alimentaires ont des propriétés antimicrobiennes.

Actuellement, les scientifiques exploitent les interactions microbiennes des bactéries lactiques pour réduire d'une façon considérable la présence des microorganismes indésirables et nuisibles. En plus de l'effet protecteur de l'acide lactique, l'acide acétique, le diacétyle et le peroxyde d'oxygène, la découverte des bactériocines a donné un élan pour le développement d'aliments de qualité sanitaire meilleure.

Des efforts considérables ont été consacrés au cours de ces cinquante dernières années pour affermir la compréhension de la physiologie, de la biochimie et de la génétique des BL

(Collins et *al.*, 1989 ; Berthier et Erlich., 1999 ;Bolotinet *al.*, 2001;Bourel et *al.*, 2001; Axelsson, 2004; Marrokiet *al.*, 2010 et Djadouniet Kihal., 2012).

Ces dernières années, l'intérêt de l'emploi de la bactériocine et ou tout autre BL productrice de substances inhibitrices pour des applications de bio préservation a suscité beaucoup de recherches (Schillinger et Lucke, 1989;Budde et *al.*, 2003;Jacobsen et *al.*, 2003;Vermeiren et *al.*, 2004; Guessa, 2007 et Saidi, 2007).

Toutes ces recherches ont permis aux microbiologistes et aux industriels de choisir les meilleures souches et d'améliorer le rendement de la productivité, la qualité, et la sécurité des produits finis. (Crow et *al.*, 1993, Desmazeaud et Cogan., 1996 et Fitzsimmons et *al.*, 1999).

C'est dans ce contexte qu'on a réalisé ce travail qui a pour objectif d'isoler des souches lactiques à partir de lait cru de chèvre et de chamelle prélevés de la wilaya de Laghouat et d'évaluer leur activité antibactérienne contre certaines souches pathogènes.

Chapitre1 :

Généralité sur le lait utilisé pour l'isolement des souches lactiques

1.1. Le lait de chamelle

1 .1.1. Définition de lait de chamelle

Le lait de chamelle constitue depuis des temps très lointains, la principale ressource alimentaire pour les peuplades nomades qui le consomment habituellement à l'état cru ou fermenté. Il est considéré comme l'aliment de base pour une période annuelle prolongée, dans la plupart de ces zones pastorales sahariennes physico-chimique relativement similaire à celle du lait bovin, ce lait se singularise néanmoins par une teneur élevée en vitamine C et en niacine et par la présence d'un puissant système protecteur, lié à des taux relativement élevés en Lysozyme, en Lactopéroxydase (système LP/ SCN/ H₂O₂), en Lactoferrine et en Bactériocines produites par des bactéries lactiques. Il se conserve naturellement pendant quelques jours sous des températures relativement élevées. (Sbouï, 2009)

1.1.2. Caractéristiques du lait de chamelle

1.1.2.1. Caractéristiques physiques et organoleptiques

Le lait de chamelle est de couleur blanche, en raison notamment de la structure et de la composition de sa matière grasse, relativement pauvre en β -carotène (Sawaya et al., 1984). Il est légèrement sucré, avec un goût acide, parfois même salé (Abdel-Rahime, 1987) et / ou amer (Ramet, 2003). Cette variabilité dans le goût est liée au type de fourrage ingéré ainsi qu'à la disponibilité en eau (Yagile et Etzion, 1980 ; Wangoh et al., 1998) le pH du lait camelin se situe au tour de 6,6 et l'acidité est de l'ordre de 15° Dornic. Sa densité oscille entre 0,99 et 1,034 avec une viscosité moyenne de 2,2 centpoise (Hassane et al., 1987) et un point de congélation variant de -0,53 à -0,61°C.

La composition chimique globale du lait de chamelle, même si elle fluctue selon les auteurs (donc selon les animaux et l'environnement considéré), montre néanmoins des teneurs importante et équilibré en nutriments de base (protéines, matière grasses et lactose) avec des proportions similaires à celles présentes dans le lait de vache. Les teneurs en protéines et en matière grasse varient respectivement de 2,5 à 4% et de 1,1 à 4,6% (avec une fréquence élevée à des taux supérieurs à 3%), alors que la teneur en lactose fluctue 2,5 et 5,6%. (Siboukeur ,2009).

La teneur en eau du lait camelin, qui varie selon son apport dans l'alimentation, atteint son maximum pendant la période de sécheresse.

En effet il a été montré que la restriction en eau alimentaire des chameles se traduit par une dilution du lait : un régime riche en eau donne un lait ayant un taux de 86% alors que dans un régime déficient, celui-ci s'élève à 91% (Yagil et Etzion, 1980 ; Faye et Mulato, 1991). Cette dilution pourrait être l'effet d'un mécanisme d'adaptation naturelle pourvoyant en eau les chameles durant la période de sécheresse.

Les sels minéraux présents dans le lait de chamelle sont aussi diversifiés que se rencontrés dans le lait de vache. On y dénombre en effet des macroéléments et des oligo-éléments qui se trouvent sous forme de sels (phosphates, chlorures et citrates) ou de métaux divers (sodium, potassium, fer, cuivre, zinc...etc.).

Le lait de chamelle se singularise par sa richesse relative en vitamine B3 (niacine) et en vitamine C. même si des variations importantes de 25 à 60 mg/l) de la teneur de cette dernière dans le lait camelin sont rapportés (Farah, 1993), il n'en demeure pas moins que les teneurs signalées (autour de 36 mg/l selon Farah et *al.*, 1992) sont en moyenne 3 fois plus élevées que celles présentes dans le lait bovin, qui ne dépassent pas 22 mg/l selon Mathieu (1998). Cette caractéristique est particulièrement intéressante, car elle permet au lait de cette espèce, par son apport important en cette vitamine, de répondre aux besoins nutritionnels, aussi bien du jeune

chamelon que des populations locales, qui vivent dans un environnement où l'apport en ce type de vitamine est particulièrement limité.

Farah (1993) signale que le lait camelin contient des teneurs plus faibles en vitamines A et E et en certaines vitamines du groupe B (vitamine B2, B5 et B9).

Tableau n°01 : Composition chimique globale (%) du lait de chamelle (selon différents auteurs) ; comparaison avec le lait de vache

Origine du lait	Constituents					References
	Eau	MST	Lactose	MG	Protéines	
Lait de chamelle	90,2	9,8	4,2	3,2	2,7	Sawayaet <i>al.</i> , 1984
	88,1	11,9	4,4	3,6	2,9	Gnan et SHEREHA, 1986
	87,0	13,0	5,6	3,3	3,3	Abdel Rahim, 1987
	87,4	13,4	4,8	3,2	3,4	Hassanet <i>al.</i> , 1987
	89,1	10,9	3,9	3,5	3,1	Farah et Ruegg, 1989
	87,8	12,2	5,2	3,2	3,3	Bayoumi, 1990
	86,6	13,4	5,5	3,5	2,8	Elamin et Wilcox, 1992
	88,3	10,9	4,1	3,1	3,2	Mehaia, 1992
	91,3	8,7	4,5	1,1	2,5	Mehaia, 1993a
Lait de vache	87,0 – 87,5	12,5 – 13,0	4,8 – 5,0	3,4 – 4,4	2,9 – 3,5	Miettonet <i>al.</i> , 1994

1.1.3. Qualité microbiologique du lait camelin

Le lait est un produit naturellement périssable du fait de sa teneur élevée en eau, son pH voisin de la neutralité, et de sa composition en éléments nutritifs. Le lait renferme inévitablement une microflore dont la nature et l'importance sont conditionnées par l'état

sanitaire de l'animal, les conditions de traite, la température, la durée de conservation... etc. Sous des conditions rigoureuses de collecte, sa charge ne dépasse cependant pas 5.10³ germes /ml (Larpent et al, 1997).

Si la microflore du lait bovin a fait l'objet de nombreuses études, cela est loin d'être le cas du lait camelin où quelques travaux seulement lui sont consacrés. L'une des raisons principales de cette carence est la relative absence des moyens matériels humains (laboratoires, chercheurs...) tout près des lieux de collecte ce qui éviterait à recourir à la congélation ou à l'utilisation d'agents anti-microbiens, comme c'est généralement le cas des études physico-chimiques.

L'étude réalisée par Barbour et al (1984) met en évidence l'inhibition des bactéries pathogènes par le lait camelin. Al-Moizea et al (1994), en s'appuyant sur la numération de quatre groupes de micro-organismes (la flore aérobie totale, les psychotrobes, les coliformes et bactéries sporulantes) déduisent que la qualité hygiénique du lait camelin est satisfaisante.

Yagilet al (1994) soutiennent que la pasteurisation du lait de chamelle n'est pas indispensable si tous les dromadaires du troupeau sont en bonne santé.

L'activité anti-microbienne du lait de chamelle, due à la présence des protéines protectrices citées précédemment (Lysozyme, lactopéroxydase, lactoferrine...), serait responsable de cet état (BARBOUR et al, 1984). Dans ce contexte, d'autres auteurs ont montré l'effet inhibiteur du lysozyme extrait et purifié à partir du lait camelin, sur *Escherichia coli* et *Micrococcus lysodeikticus* en le comparant à celui de l'ovalbumine (Durhaiman, 1988).

Dans le même ordre d'idée, l'efficacité de l'activité des protéines protectrices du lait de chamelle contre *Lactococcus lactis* ssp *cremoris*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* et rotavirus, a été également signalée (El-Sayed et al., 1992).

Par ailleurs, on reconnaît depuis longtemps, aux bactéries lactiques, la propriété de produire des substances antagonistes tels que les acides organiques (acide lactique et acide citrique), le peroxyde d'hydrogène et des protéines antimicrobiennes (Klaenhammer *et al.*, 1994).

Il est important de signaler que les acides aminés libres et les autres composés azotés non protéiques (NPN) dont le taux est plus élevé que dans le lait bovin, sont facilement dégradés par les microorganismes, particulièrement la flore bifidogène connue pour ses exigences en matière de facteurs de croissance. En effet, des travaux portant sur quatre espèces (*Bifidobacteriubreve* ; *B.bifidum* ; *B.longum* et *B.angulatum*), rapportent que le lait camelin est un excellent milieu de culture, naturel, pour les bifidobactéries. En outre, le stockage de ce lait à 4°C n'affecte pas leur viabilité et leur activité protéolytique est plus forte que dans le lait bovin. A cet effet, ces mêmes auteurs préconisent, l'utilisation de la poudre de lait camelin comme milieu de préculture de cette flore à haut potentiel nutritionnel et thérapeutique (Abu-Tarboushet *al.*, 1997).

L'activité antimicrobienne du lait camelin due à la synergie des effets précédemment cités, confère au lait camelin une bonne aptitude à la conservation, mais se répercute négativement sur ses aptitudes à la transformation en produits dérivés (Farahet *al.*, 1990 ; Kamoun, 1995 ; Ramet, 1994 ; Abou-Tarbouschet *al.*, 1998).

1.2. Le lait de chèvre :

1.2.1. Le lait de chèvre

Le lait de chèvre est un liquide blanc ou mât, opaque d'une saveur peu sucrée dont l'odeur (chèvre) lorsqu'il est récolté et conservé proprement, est peu marquée voire inexistante. Il donne une impression bien homogène c'est-à-dire ni trop fluide ni trop épais (Bosset J-O ; Albrecht B ; Badertscher R et *al.*, (2000). Du point de vue de ces qualités nutritives et digestives, le lait de chèvre possède une valeur de premier ordre. Il est moins allergène et subit plus lentement la fermentation lactique que celui de la vache (17). Ces qualités diététiques

sont la conséquence d'un certain nombre de caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques (Bosset J-O ; Albrecht B ; Badertscher R ; *etal.*, (2000) ; Montel N-C, 2003

1.2.2 - Caractéristiques Physico-Chimiques

1.2.2.1- pH

Le pH est le cologarithme de la concentration en ions W ($\text{pH} = -\log [W]$) d'une solution donnée. Il permet de déterminer « l'acidité actuelle » du lait, qui peut être mesurée soit par le pH-mètre soit par le papier pH (Doutoum A- A , 1995)). Un lait normal de chèvre à la sortie de la mamelle est proche de la neutralité et a un pH de 6,5 qui peut varier jusqu'à 6,7. Toute valeur située en dehors de cet intervalle traduit une anomalie mammaire ((Bosset J-O ; Albrecht B ; Badertscher R et *al.*, (2000)).

1.2.2.2 - Composition chimique

✓ *Eau et extrait sec*

L'eau est l'élément le plus important du lait sur le plan pondéral soit 88,6 % du poids total. Elle tient en suspension tous les autres éléments (glucides, lipides, protéines et divers sels minéraux). La détermination de sa teneur permet de détecter les mouillages (Bosset J-O ; Albrecht B ; Badertscher R ; *etal.*, 2000). L'extrait sec ou matière sèche totale du lait est composé par les constituants du lait autres que l'eau. L'extrait sec joue un rôle dans la technologie de transformation du lait surtout en fromagerie en influençant les rendements ((Bosset J-O ; Albrecht B ; Badertscher R ; *etal.*, 2000).

✓ *Matières azotées*

Elles constituent la fraction azotée du lait avec un taux qui varie entre 25 et 35g/l. Elles sont composées de protéines vraies et d'azote non protéique. Les protéines vraies sur le plan

technologique et surtout en fromagerie sont constituées de protéines coagulables et non coagulables.

✓ *Matières grasses*

Elles sont présentes dans le lait sous forme d'émulsion de globules gras. Elles sont produites dans la mamelle à partir de précurseurs provenant de la circulation sanguine. Constitués de lipides simples (99 % de triglycérides) et de lipides complexes (phospholipides, stérols, caroténoïdes .. ,). Les matières grasses du lait de chèvre sont sous forme globulaire dont le diamètre peut varier entre 1 à 10 nm. Cependant, le diamètre moyen est environ 3 nm (contre 6 nm pour le lait de vache). En fromagerie, elles contribuent à la saveur et à la texture de la pâte (Bosset J-O ; Albrecht B ; Badertscher R ;. *Etal.*, 2000).

✓ *Glucides*

Les glucides constituent d'une manière générale les sucres du lait. Ils sont formés principalement d'oligosaccharides, de saccharides azotés et non azotés. Le lactose, galactoside (1-4) glucose, diholoside réducteur, principal sucre du lait est fermentescible. Il est transformé en acide lactique par la flore lactique lorsque les conditions sont réunies et est à l'origine de la coagulation via l'abaissement du pH.

✓ *Eléments minéraux*

Ils sont présents en faible quantité dans le lait mais jouent un rôle important dans l'organisme et dans la transformation du lait. Ces éléments sont le, calcium, et divers chlorures (Evette J-L,1975).

1.2.3 - Caractéristiques Microbiologiques

1.2.3.1– Bactéries

La teneur en nutriments et en eau élevée du lait fait de lui un biotope favorable au développement des micro-organismes dont certains peuvent être nuisibles à la santé du consommateur (bactéries pathogènes) à la conservation et à la fabrication de produits laitiers (bactéries d'altérations) (Coulin J-B et Rock E, 2003). Les bactéries retrouvées dans le lait sont d'origines différentes. Certaines sont liées à la nature du produit, d'où l'expression flore native du lait tandis que, d'autres sont issues d'une contamination endogène ou exogène.

✓ *Flore native du lait*

Le lait contient peu de micro-organismes s'il est prélevé dans de bonnes conditions à partir d'un animal sain. Les germes rencontrés sont des germes saprophytes du pis et des canaux galactophores (DOUTOUM A- A, 1995 ; Evette J-L, 1975 ; Njassap H-V-N, 2001) et jouent des rôles importants : inhibition de la flore pathogène et d'altération, accroissement de la qualité marchande du lait, action antiseptique intestinale du consommateur. Ces rôles découlent du pouvoir fermentescible de la flore native du lait dont le type de fermentation permet de distinguer deux groupes de bactéries. Les homo-fermentaires et les hétéro-fermentaires (Casalta E, 2000).

✓ *Flore de contamination endogène*

Les bactéries de ce groupe accompagnent le lait depuis sa sécrétion et sont constituées de genres pathogènes pour l'homme pouvant être source d'intoxication (agents de mammites) ou d'infection (responsable de zoonoses).

Les principaux agents de mammites sont les Staphylocoques, certains Mycoplasmes, *Escherichia-coli*, alors que ceux des zoonoses sont représentés essentiellement par *Brucella* et *Listeria* (Fresse O-M et Paul-pascal M-P, 1993).

✓ *Flore de contamination exogène*

Les sources multiples de contamination sont responsables de la diversité des genres. Une contamination élevée par ces derniers peut avoir des conséquences néfastes allant de l'altération du produit (flore d'altération) à la transmission de maladies d'origine alimentaire (flore pathogène) (Doutoum A- A. 1995 ;Njassap H-V-N,2001).

✓ *Flore d'altération*

Elle est à l'origine des pertes de lait. Les genres impliqués sont :

- Les Pseudomonas, qui par leur rôle protéolytique ou lipolytique sont souvent responsables des anomalies du goût et l'odeur du lait ou des produits laitiers.
- Les entérobactéries, quant à elles, sont indésirables en fromagerie car elles produisent des gaz et des acides pouvant induire des défauts de texture (gonflement précoce), des saveurs désagréables ou un mauvais caillage.

✓ *Flore pathogène*

La contamination microbienne des aliments constitue une obsession dans les pays en voie de développement où *Salmonella*, *Escherichia-coli*, *Clostridium*, *Staphylococcus* et *Streptococcus* sont les causes fréquentes des maladies transmissibles par les aliments.

Chapitre II

Les bactéries lactiques

Chapitre 2 :

Les bactéries lactiques

2.1. Présentation générale

Les bactéries lactiques sont des Cocci ou des bâtonnets qui sont en générale aérotole'rances (Larpent, 1989). Cependant certaines esp'ces habitant par exemple le tube digestif des animaux sont ana'robies strictes, m'eme en pr'sence d'O₂, elles sont incapables de r'aliser la phosphorylation oxydative. Elles sont Gram-positif ; g'n'ralement immobiles et a sporul'ees. Elles ne poss'edent ni catalase, ni nitrate r'ductase, ni Cytochrome oxydase. En plus de cela ne liqu'efient pas la g'latine, ne produisent pas d'indole ni d'hydrog'ne sulfureux (Delaglio et *al.*, 1994)

Les bact'eries lactiques regroupent un ensemble d'esp'ces h't'rog'nes (Labioui et *al.*, 2005). Ce sont des cellules vivantes, autonomes et procaryotes (Doleyres, 2002), dont le trait commun est leur aptitude ' produire de l'acide lactique suite ' la fermentation des glucides (Ait Belghanaoui, 2006).

2.2. Taxonomie des bact'eries lactiques

La classification des bact'eries lactiques peut se faire selon des crit'eres phylog'n'tiques par l'utilisation des m'ethodes mol'culaires. Cependant, la caract'risation ph'notypique /biochimique classique demeure pratique dans l'identification pr'liminaire des microorganismes. Certaines caract'ristiques ph'notypiques sont utilis'ees pour identifier les esp'ces ' l'int'rieur des genres comme la capacit' ' : fermenter les hydrates de carbone, tol'erer diff'rentes concentrations en bile,

produire des polysaccharides extracellulaires, exiger des facteurs de croissance, produire de l'acétoïne et synthétiser certaines enzymes. La composition en G+C de l'ADN, la composition en acides gras, la mobilité électrophorétique de la lactate déshydrogénase sont également d'autres critères qui peuvent être étudiés pour l'identification des espèces lactiques (Vandamme, 1996 ; Stiles et Holzopfel, 1997 ; Ho et al., 2007).

La morphologie est considérée comme la caractéristique clé pour décrire et classer les genres des bactéries lactiques. De ce fait, les bactéries lactiques peuvent être divisées arbitrairement en bacilles (*Lactobacillus* et *Carnobacterium*) et coques (tous les autres genres). Le genre *Weissella*, récemment décrit, est le seul genre qui comporte à la fois des bacilles et des coques (Collins et al., 1993 ; Ho et al., 2007).

2.3. Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques

2.4.1. Genre *Lactobacillus*

Lactobacillus est le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae*, il contient de nombreuses espèces qui sont des agents de fermentation lactique intervenant dans de nombreuses industries ou qui sont rencontrées comme contaminants. Il s'agit de bacille longs et fins (parfois incurvés) souvent groupés en chaînes, immobiles, asporulés, catalase négative, se développent à un optimum de température situé entre 30 et 40°C. Les lactobacilles ont des exigences nutritionnelles très complexes en acides aminés, et vitamines, en acides gras, en nucléotides, en glucides et en minéraux (Khalidet Marth, 1990 ; Leclerc et al., 1994).

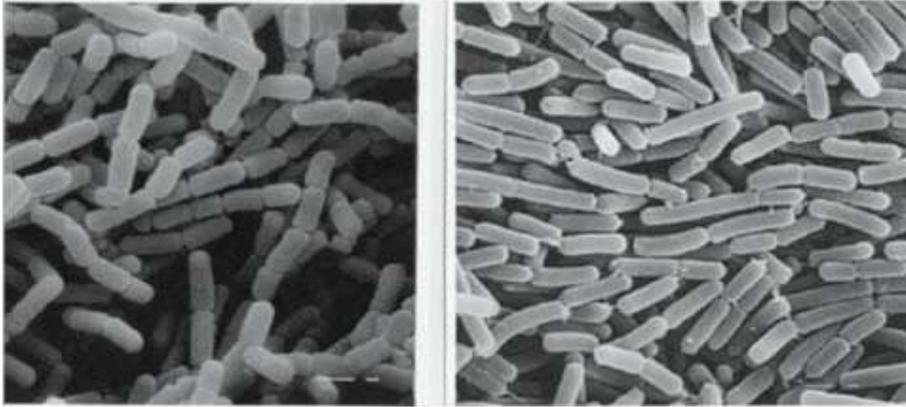


Figure n°1: Morphologie de **A:** *Lactobacillus casei* and **B:** *Lactobacillus acidophilus*
(Examen en microscopie électronique, $\times 7000$)

2.3.2. Genre *Lactococcus*

Le genre *Lactococcus* (streptocoque du groupe N) représente les streptocoques dits « lactique », car ils sont associés à de nombreuses fermentations alimentaires et ne possèdent aucun caractère pathogène. Les produits végétaux constituent leur réservoir principal, mais ils sont largement présents dans le lait et les produits laitiers (Pilet et al., 2005).

Les lactocoques se présentent sous forme de coques en paire ou en chaînes de longueur variable. Ce sont des bactéries anaérobies facultatives homofermentaires ne produisant que de l'acide lactique L(+), seul *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *Diacetylactis* produit le diacétyle. Leur température optimale de croissance est proche de 30°C, capable de se développer à 10°C mais pas à 45°C. Quelques espèces produisent des exo polysaccharides et des bactériocines. Elles sont capables de se développer à 3% de bleu de méthylène et d'hydrolyser l'arginine (Tamime, 2002)

2.3.3. Genre *Streptococcus*

Le genre *Streptococcus* est toujours large et la classification est très mouvementée. Ce genre est généralement divisé en trois groupes : pyogène (la plupart des espèces pathogènes et hémolytiques), oral (tel que *St. salivarius*, *St. bovis*) et les autres streptocoques (Scheilfer, 1987). La seule espèce de streptocoques qui soit utilisée en technologie alimentaire est *Streptococcus thermophilus* qui a été incluse dans le groupe des « autres streptocoques », mais ensuite transféré au groupe des streptocoques oraux à cause de leur degré d'homologie avec l'ADN de *Streptococcus salivarius* (Stiles et Holzapfel, 1997).

Streptococcus thermophilus se différencie par son habitat (lait et produits laitiers) et son caractère non pathogène. La résistance à la température, la capacité de croître à 52°C et le nombre limité des hydrates de carbones permettent de distinguer les *St. thermophilus* de la plupart des autres streptocoques (Haddie, 1986 ; Pilet et al., 2005).

2.3.4. Genre *Enterococcus*

Ce genre regroupe les streptocoques fécaux qui représentent une hémolyse de type α et β et qui appartiennent au groupe D. Ce sont des commensaux de l'intestin. Les espèces rencontrées dans l'alimentation sont essentiellement *En. faecalis* et les espèces proches.

Les entérocoques sont des coques qui peuvent être mobiles, homofermentaires, généralement différenciés par la fermentation de l'arabinose et le sorbitol, ils croissent entre 10°C et 45°C (Tamime, 2002 ; Ho et al., 2007).

2.3.5. Genres *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*

Ils ressemblent les coques lenticulaires en paires ou en chainettes mésophiles, qui possèdent un caractère hétérofermentaire marqué, avec production d'acide lactique (isomère D), de CO₂ et d'éthanol. Les caractéristiques telles que l'hydrolyse de l'esculine la formation de dextrane, les conditions de croissance, la capacité à croître à différents pH et température, l'assimilation de citrate et/ou malate permettent la différenciation entre les genres *Leuconostoc* et *Weissella* (Pilet et al., 1998 ; Ho et al., 2007).

Actuellement, le genre *Leuconostoc* comprend quatorze espèces, ils sont également anaérobies facultatifs et exigeants au point de vue nutritionnel et leur croissance est toujours lente. Le développement des leuconostoc entraîne souvent l'apparition d'une viscosité dans le milieu grâce à la production des exo polysaccharides. Les leuconostoc principalement *Ln. mesenteroides* ssp. *cremoris* et *Ln. lactis* sont utilisés en association avec les lactocoques dans l'industrie laitière pour produire en plus de l'acide lactique et le CO₂, des substances aromatiques telles que le diacétyl et l'acétoïne à partir des citrates (Hassan et Frank, 2001 ; Guiraud, 2003 ; Ogier et al., 2008).

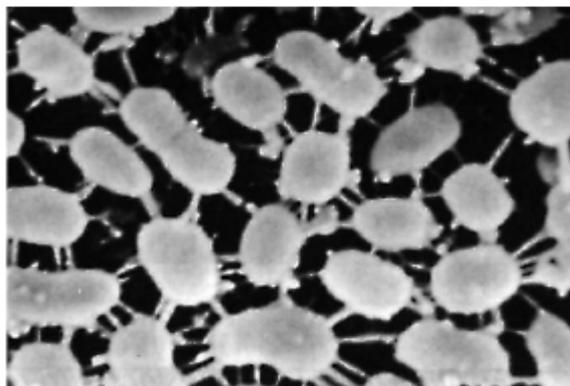


Figure n° 02 : Fixation des *Leuconostoc*s sur les moules en grès-vernissé.
(Examen en microscopie électronique de balayage, 11 500×).

2.3.6. Genres *Pediococcus* et *Tetragenococcus*

Les *Pediococcus* sont des coques homofermentaires dont la particularité est le regroupement en tétrade. Ils sont mésophiles, le plus souvent incapable d'utiliser le lactose, et leur développement nécessite la présence de divers facteurs de croissance. Certaines espèces se distinguent par leur capacité à se développer à des teneurs en sels très élevées, comme *Pediococcus halophilus*, renommé *Tetragenococcus halophilus* et *Tetragenococcus muriaticus* qui tolère jusqu'à 18% de NaCl (Pilet et al., 2005).

Les espèces de *Tetragenococcus* ont un rôle crucial dans la fabrication des produits alimentaires à concentration élevée en sel comme les sauces de soja, alors que les pediocoques sont parfois utilisés comme levains lactiques pour les charcuteries (Guiraud et Rosec, 2004 ; Tosukhowong et al., 2005).

2.3.7. Genre *Bifidobacterium*

Le genre *Bifidobacterium* est considéré comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques grâce à la similarité de ses propriétés physiologiques et biochimiques et à sa présence dans le même habitat écologique, tel que le tube gastro-intestinal. Ces microorganismes sont phylogénétiquement sans rapport avec ces dernières. Ils sont davantage liés au phylum *Actinobacteria* (anciennement *Actinomycètes*) des bactéries Gram positif dont l'ADN est à haut pourcentage de G +C (Pilet et al., 2005).

Les bifidobactéries se caractérisent par leur forme très irrégulière souvent en forme V mais pouvant être coccoïdes, la présence d'une enzyme, la fructose-6-phosphate phosphocétolase, celle-ci leur permet de fermenter les hexoses en produisant de l'acide acétique et de l'acide lactique. Leur température de croissance varie de 36°C à 43°C (Axelsson et al., 2004 ; Pilet et al., 2005 ; Ho et al., 2007).

2.4. Identification des bactéries lactiques

2.4.1. Caractères morphologiques et structuraux :

- ❖ **La forme** : des cellules microbiennes représentent souvent un caractère distinctif de l'espèce et du genre bactérien (coques ou bâtonnets) (Prevost ,2009) se trouve à la figure 01.

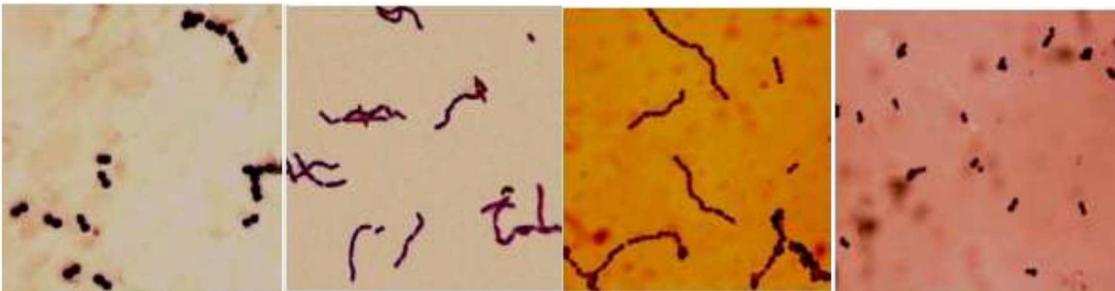


Figure n°03: différentes formes microscopiques de bactéries lactiques obtenues au laboratoire de microbiologie appliquée de l'université d'Oran par Saidi (2007). De gauche – droite, Diplocoques (*Leuconostoc* sp.), (*Lactobacillus* sp.), streptocoques et diplocoques (*Lactococcus lactis* sp.) (Grossissement x 1000).

- ❖ **Le diamètre cellulaire** : est un caractère plus stable que la longueur cellulaire.
- ❖ **La mobilité** : est une caractéristique rare chez les bactéries lactiques qui sont généralement non mobiles, sauf dans certains cas où elles possèdent des flagelles péritriches.
- ❖ **La sporulation** : toutes les bactéries lactiques sont non sporulées.
- ❖ **L'analyse de ces composés** cellulaires est entrain de devenir un instrument essentiel non seulement pour la classification mais aussi pour l'identification des bactéries.
- ❖ **Les recherches chimio taxonomiques** réalisées sur les bactéries ont contribué de façon fondamentale à expliquer les relations génétiques intra et inter spécifiques.

- ❖ La présence d'inclusions cellulaires, corpuscules métachromatiques ou de volutine, est un caractère distinctif de certaines espèces du genre *Lactobacillus* homofermentaires strict (Renouf, 2006).

2.4.2. Caractères physiologiques et biochimiques :

Regroupent la quantité et la configuration de l'acide lactique produit, la température de croissance minimale, optimale et maximale, la tolérance à l'oxygène et au chlorure de sodium, production de gaz et d'arôme, la production d'ammoniaque à partir de l'arginine, la capacité d'hydrolyser l'esculine ou de résister aux sels biliaires et à différentes valeurs de pH (Luquet et Roissard, 1994).

2.4.3. Caractères immunologiques :

La réaction immunologique se traduit par l'agglutination des cellules bactériennes, ou par la précipitation à l'interface antigène-antisérum (Roissard et Luquet 1985). La sérologie a été utilisée pour la classification et l'identification des streptocoques, depuis que **Lancefield (1933)**, propose les premiers groupements. Les groupes sérologiques comme le cas des streptocoques lactiques qui sont rangés dans le groupe sérologique N.

2.5. Principales voies fermentaires des bactéries lactiques

2.5.1. Voie homofermentaire ou EMP

Les bactéries lactiques homofermentaires comprennent les espèces de lactocoques, pediocoques, ainsi que certains lactobacilles. Cette voie conduit dans des conditions optimales de croissance à la Production de deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP par molécule de glucose consommée. La fructose-1,6-bisphosphate

aldolase (FBA) est une enzyme clé indispensable au fonctionnement de la voie EMP (Thompson et Gentry-Weeks, 1994).

2.5.2. Voie hétérofermentaire ou voie des pentoses phosphate

Les bactéries lactiques qui fermentent le glucose en produisant, en plus de l'acide lactique, de l'acétate, de l'éthanol et du CO₂ sont dites hétérofermentaires. Les groupes principaux de bactéries présentant ce type de métabolisme sont les leuconostoc et certains lactobacilles. Ces microorganismes sont dépourvus d'une FBA et le système de transport PTS (Thompson et Gentry-Weeks, 1994).

2.6. Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques :

Les mécanismes antimicrobiens spécifiques des bactéries lactiques exploitées dans la bio préservation des nourritures incluent la production des acides organiques, du peroxyde d'hydrogène, de l'anhydride carbonique, du diacétyl, des antimicrobiens à large spectre tels que la reutéline et la production de bactériocines (de Vuyst et vandamme, 1994 b; Stiles, 1996; Jacobsen et *al.*, 2003 et Vermeiren Et *al.*, 2004).

2.6.1. Acides organiques

L'acide lactique est le métabolite principal des BL causant la réduction du pH qui inhibe largement de microorganismes (Eklund, 1989 et Schnüreret Magnusson, 2005). La forme non dissociée et plus hydrophobe de l'acide se répand au-dessus de la membrane des cellules et se dissocie à l'intérieur de la cellule, libérant les ions H⁺ qui acidifient le cytoplasme (Piard et Desmazeaud, 1991). En plus de l'effet du pH, l'acide

non dissocié fait chuter le gradient électrochimique de proton, entraînant la bactériolyse et finalement la mort des bactéries sensibles (Eklund, 1989).

2.6.2. Acides gras :

Dans certaines conditions, quelques lactobacilles et lactocoques possédant des activités lipolytiques peuvent produire des quantités significatives d'acides gras, par exemple dans la fermentation du lait fermenté (Rao et *al.*, 1984) et des saucisses sèches (Sanz et *al.*, 1988).

L'activité antimicrobienne des acides gras a été identifiée pendant plusieurs années. Les acides gras insaturés présentent une activité contre les bactéries à Gram+, et l'activité antifongique des acides gras dépend de la composition, de la concentration, et du pH du milieu (Gould, 1991).

2.6.3. Peroxyde d'hydrogène :

En général, les bactéries lactiques sont capables de transformer l'oxygène moléculaire (O_2) en super oxyde excité (O_2^-), en peroxyde (H_2O_2) ou en eau (H_2O). Ces réactions sont catalysées par des enzymes spécifiques généralement en présence d'un substrat à oxyder. Ces enzymes ont été trouvées chez des souches de Streptococcus, Lactococcus, Lactobacillus, Leuconostoc et Pediococcus (Condon, 1987). L'effet antimicrobien de H_2O_2 peut résulter de l'oxydation des groupes sulfhydriques causant la dénaturation d'un certain nombre d'enzymes, et de la peroxydation des lipides de membrane ; de ce fait provoque l'augmentation de la perméabilité de la membrane (Kong et Davison, 1980).

2.6.4 Dioxyde de carbone (CO₂) :

Il est principalement produit par les BL hétérofermentaires. Le mécanisme précis de son action antimicrobienne est toujours inconnu. Cependant, le CO₂ peut jouer un rôle antimicrobien en créant un environnement anaérobique, qui empêche les décarboxylations enzymatiques, et l'accumulation de CO₂ dans le milieu peut causer un dysfonctionnement de la perméabilité (Eklund, 1984).

Le CO₂ peut aussi empêcher la croissance de beaucoup de microorganismes de détérioration, particulièrement les bactéries psychotrophes à Gram- (Farber, 1991 et Hotchkiss et *al.*, 1999).

2.6.5. Diacétyle

Il est produit par des souches de *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *Diacetylactis* par la fermentation du citrate (Lindgren Et Dobrogosz, 1990 et Cogan et Hill, 1993). Il est responsable des quelques autres produits laitiers fermentés. Les niveaux sensoriels acceptables du diacétyle sont de 2 à 7 µg/ml (Earnshaw, 1992).

2.6.6. Acétaldéhyde

Chez *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, l'action d'une thréonine aldolase, clive la thréonine en acétaldéhyde et en glycine. L'acétaldéhyde à une concentration de 10 à 100 ppm empêche la croissance de *Staphylococcus aureus*, de *Salmonella typhimurium* et d'*E. Coli* dans les produits laitiers (Piard et Desmazeaud, 1991).

2.6.5. Reutéline :

La reutéline est produite par *Lactobacilles reuteri*, une espèce hétérofermentaire dont la niche écologique est l'appareil gastro-intestinal des humains et des animaux (Axelsson et al., 1989). La reutéline montre un large spectre d'activité antimicrobienne contre certaines bactéries à Gram+ et à Gram-. Les organismes de détérioration sensibles à la reutéline comprennent Salmonella, Shigella, Clostridium, Staphylococcus, Listeria, Candida, et Trypanosoma (Axelsson et al., 1989)

2.7. Les bactériocines des bactéries lactiques

2.7.1 Définition

Contrairement aux antibiotiques classiques, les bactériocines sont synthétisées par voie ribosomique généralement par des bactéries à Gram positif appartenant au groupe des bactéries lactiques. Elles peuvent subir ou non des modifications post-traductionnelles avant d'être excrétées dans le milieu extracellulaire. Leur spectre d'action antibactérien, généralement étroit, comprend souvent des souches appartenant à la même espèce que la souche productrice. Cette dernière produit une protéine d'immunité pour se protéger des effets délétères de la bactériocine qu'elle produit (Jack et al., 1995).

2.7.2. Classification

Il existe plusieurs classifications. La première est fondée sur les spectres d'action (Klaenhammer 1988). Les connaissances acquises ont permis de créer une classification

reposant sur les structures et les mécanismes d'action des bactériocines (Klaenhammer 1993).

Cette dernière a été modifiée par l'ajout de sous-classes et est actuellement utilisée (Nes *et al.*, 1996 ; Diep *et al.*, 2002). Cette classification se décompose en quatre classes distinctes :

- **Classe I** : il s'agit de peptides de taille réduite (< 5 kDa) contenant des acides aminés inhabituels obtenus par modifications post-traductionnelles. Un de ces acides aminés caractéristiques est la lanthionine ; c'est pourquoi les bactériocines appartenant à la classe I sont appelées lantibiotiques pour "*lanthionine containing antibiotics*". La nisine est la bactériocine de la classe I la plus étudiée. La structure de ces bactériocines diffère selon la localisation des ponts établis entre les acides aminés inhabituels (Twomey *et al.*, 2002). Il existe deux types de lantibiotiques selon leur structure.

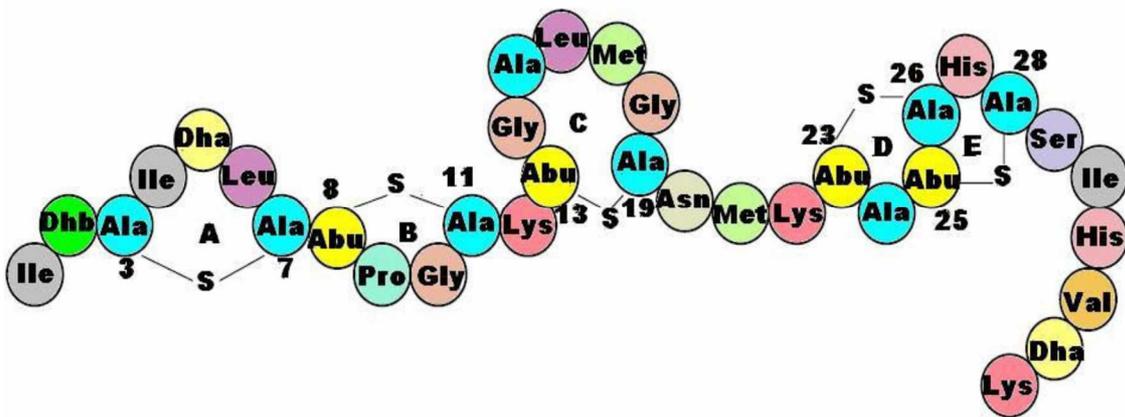


Figure n° 4 : structure de la nisine A

lantibiotiques de type B regroupent les bactériocines globulaires, dont la plus connue est la mersacidine (Figure 2A). Le mécanisme d'action de cette bactériocine, tout comme celui de la nisine, est fondé sur la liaison avec le lipide II, non pour former un pore, mais pour inhiber la synthèse de la paroi, notamment la transpeptidation, ou de certaines phospholipases (Hsu *et al.*, 2003).

Certains lantibiotiques n'appartiennent ni au type A ni au type B, comme la mutacine II (Woodruff *et al.*, 1998) (Figure 2B). C'est un peptide de petite taille (3245 Da) qui contient une B -méthyllanthionine ainsi que deux lanthionines en plus d'un acide aminé didéshydrogéné. Ce lantibiotique, de par sa petite taille, ne peut pas former de pore au sein de la bicouche lipidique de la cellule cible (Chikindas *et al.*, 1995a). Ces peptides antibactériens agissent sur le potentiel de membrane ($\Delta\psi$) ainsi que sur le gradient de Ph.

- **Classe II** : cette classe regroupe les petites bactériocines (< 10 kDa) thermostables et ne subissant pas de modification post-traductionnelle ; cependant elles sont généralement synthétisées sous forme d'un pré peptide qui sera mûri lors de son excrétion dans le milieu extracellulaire. Le site du clivage protéolytique du peptide leader s'effectue généralement au niveau d'un doublé de glycine. Le mécanisme d'action de ces bactériocines est principalement fondé sur la perméabilisation de la membrane de la cellule cible. Les bactériocines peuvent interagir avec cette dernière. En effet, ces peptides sont hydrophobes, cationiques et adoptent une structure secondaire en hélice α en milieu apolaire (Fregeau Gallagher *et al.*, 1997 ; Wang *et al.*, 1999 ; Sprules *et al.*, 2004a).

Cette catégorie contient plus de 50 bactériocines ; avec l'acquisition de nouvelles connaissances, trois sous-classes ont été introduites :

- **Sous-classe IIa** ou « *pediocin-like* » : les bactériocines de cette sous-classe ressemblent d'un point de vue structural à la pédiocine qui fut la première bactériocine de ce groupe à être décrite. Ces bactériocines ont deux particularités, la première est la présence d'une séquence N-terminale conservée **YYGNGV-C---C-V-WG-A---I** (Ennahar *et al.*, 2000 b), la deuxième est la présence d'une activité anti-*Listeria* sp. Les Carno bactériocines BM1 et B2 font partie de cette sous-classe (Quadri *et al.*, 1994) ainsi que la mésentéricine Y105 (ou mésentérocin 52A) (Hécharde *et al.*, 1992 ; Revol-Junelles *et al.*, 1996b).

- **Sous-classe IIb** : ce groupe correspond à des bactériocines possédant deux composants. L'activité optimale dépend de l'action conjuguée des deux peptides. Ils peuvent être actifs individuellement mais une synergie d'action est observée lorsqu'ils sont associés, comme par exemple pour l'entéroline L50A/L50B (Cintas *et al.*, 1998). Ces peptides peuvent également être inactifs individuellement ; seul un mélange des deux composants permet d'observer une activité antibactérienne, comme c'est le cas pour la plantaricine JK (Diep *et al.*, 1996).

- **Sous-classe IIc** : cette catégorie était initialement réservée aux bactériocines activées par réduction de groupements thiols ("*Thiol-activated* ") (Klaenhammer 1993), comme la lactococcine B (Venema *et al.*, 1993). Cependant, la réduction d'un groupement thiol ne semble pas indispensable à son activité antibactérienne (Venema *et al.*, 1996). D'autres auteurs (Nes *et al.*, 1996) ont proposé de dédier cette sous-classe aux bactériocines de la classe II excrétées par le système général d'excrétion (le système *sec*), car les autres bactériocines de la classe II sont excrétées par des systèmes spécifiques type ABC "*ATP Binding Cassette*". Deux exemples ont été décrits, l'acidocine B (Leer *et al.*, 1995) et la divergicine A (Worobo *et al.*, 1995). Cependant, des bactériocines de la sous-classe IIa, sécrétées par le système *sec*, ont été décrites, comme l'entéroline P (Cintas *et al.*, 1997). Ces découvertes remettent en question l'existence de cette sous-classe. Finalement, la sous-classe IIc regroupe les bactériocines de la classe II ne pouvant pas être classés ni dans la sous-classe IIa ni dans la IIb (Hécharde *et al.*, 2002). La mésentéroline 52B (mésentéricine B105) en fait partie (Revol-Junelles *et al.*, 1996b ; Hécharde *et al.*, 1999).

- **Classe III** : cette classe regroupe les bactériocines de haut poids moléculaire (> 30 k Da) qui possèdent une activité antimicrobienne. Ces protéines, contrairement aux peptides de la classe II, ne sont pas thermostables. L'entérolisine A, synthétisée par

Enterococcus faecalis, appartient à cette classe et présente une activité anti-*Listeria* sp. (Nilsen *et al.*, 2003 ; Nigmatova *et al.*, 2008). Cette protéine possède dans sa région N-terminale une activité « *endopeptidase-like* ». De plus, sa région C-terminale est similaire au gène de lyse de bactériophages (A2, T4). Une délétion des 58 derniers résidus d'acides aminés entraîne une perte totale de son activité. Le mécanisme d'action de cette bactériocine repose sur une activité muralytique permettant la dégradation de la paroi de la cellule cible (Nilsen *et al.*, 2003).

- **Classe IV** : cette dernière classe regroupe les protéines couplées à une partie non protéique (lipide, oligosaccharide). Cette classe est très peu représentée voire éliminée (Drider *et al.*, 2006). *Leuconostoc paramesenteroides* OX produit une molécule antimicrobienne, la leucocine S, appartenant à cette classe. Cette protéine de haut poids moléculaire, thermosensible, perd totalement son activité vis-à-vis de *Lactobacillus sakei* en présence d' α -amylase, enzyme dégradant les glucides complexes. Un prétraitement de la souche cible avec cette même enzyme n'affecte pas l'activité de la leucocine S. Par conséquent, l' α -amylase agit directement sur la bactériocine et non sur un récepteur potentiel présent sur la souche sensible (Lewus *et al.*, 1992). Sa nature glycoprotéique a été confirmée lors d'une SDS-PAGE suivie d'une coloration au bleu Alcian (Lewus *et al.*, 1992). Face à la complexité et à l'hétérogénéité de cette classification, certains auteurs ont proposé d'établir des classifications selon le genre producteur ; une classification pour les bactériocines produites par le genre *Enterococcus* est ainsi disponible (Franz *et al.*, 2007).

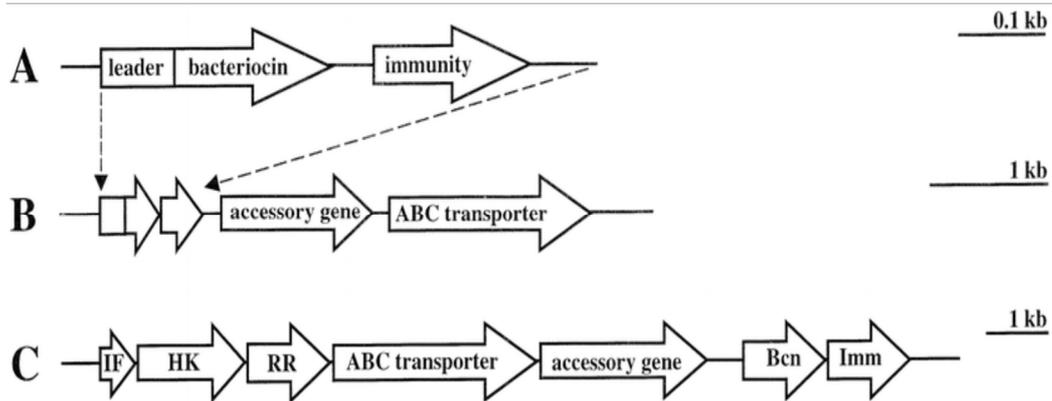


Figure n° 05: organisation générale des opérons producteurs de bactériocines

A : prébactériocine et sa protéine d'immunité

B : transporteur ABC et son facteur accessoire

C : système de régulation à trois composantes

HK : Histidine Kinase ; RR : protéine de régulation ; IF : facteur d'induction

3.8.3 Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action des bactériocines est très largement étudié. Il est admis qu'il se décompose en trois étapes. La première consiste en la fixation du peptide sur la membrane de la cellule cible. C'est durant cette étape que le peptide adopte sa conformation tridimensionnelle permettant l'expression de son activité. La seconde étape est l'insertion de la bactériocine dans la membrane cytoplasmique. Durant cette étape, plusieurs peptides antibactériens sont recrutés pour former un pore. La dernière étape est la formation du pore.

Ce dernier conduit à des fuites de composés intracellulaires vitaux. Leur perte entraîne donc des effets néfastes pour la cellule, allant d'un simple ralentissement de la vitesse de croissance bactérienne à la mort cellulaire.

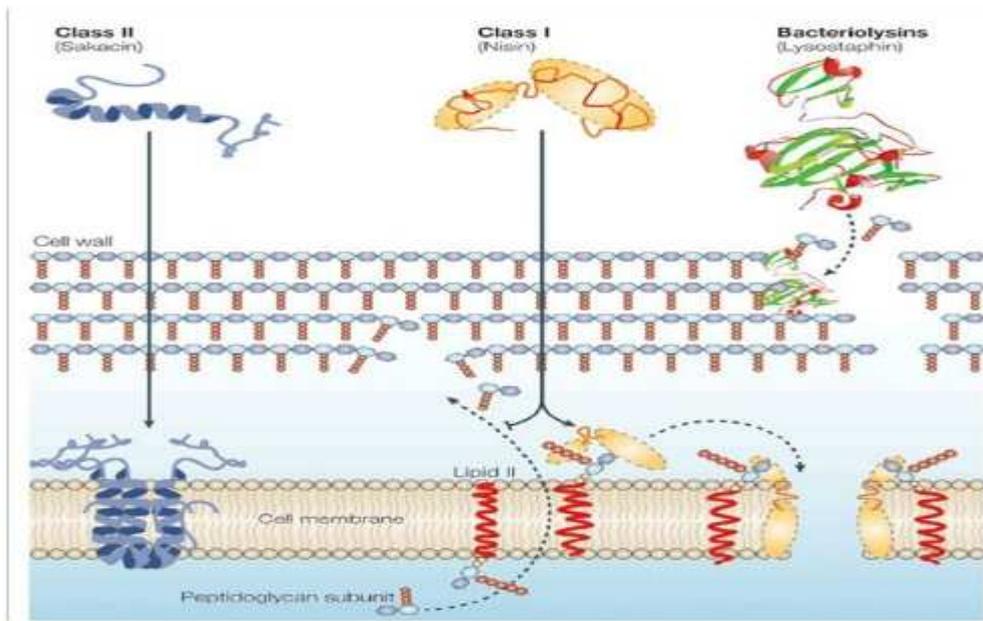


Figure 6 : Mode d'action des bactériocines de bactéries lactiques (Paul *et al.*, 2005)

partie pratique

Chapitre III

Matériel et méthode

Chapitre 03 :

Matériel et méthodes

3.1. Objectif de l'étude :

- Isolement et identification des souches lactiques à partir de lait cru de chèvre et chamelle.
- Sélection des souches lactiques productrices des substances antibactériennes.

3.2. Prélèvement et collection des échantillons :

Le prélèvement s'effectue en soutirant une quantité suffisante du liquide dans un flacon stérile. Il faut nettoyer la source de prise (le prélèvement a été fait aseptiquement après que les mamelles ont été désinfecté pas l'eau tiède contenant de l'eau de javel 2%), en suite l'échantillon est mis dans un flacon stérile et conserver à 4°C jusqu'à son utilisation. Le nombre d'échantillons prélevés est de raison 03 pour le lait de chèvre et de 03 pour le lait de chamelle.

Les échantillons de lait de chamelle et le lait de chèvre proviennent de la région de « Laghouat ».

3.3. Souches utilisées :

Pour l'étude de l'activité antibactérienne, on a utilisé trois souches pathogènes : Escherichia. Coli ATCC 25922, Staphylococcus aureus ATCC25923 et salmonella, ATCC :25983 les souches sont obtenues à partir de laboratoire de l'université de SAIDA.

3.4. Isolement et culture de la flore lactique

Isolement et identification des souches lactiques mésophiles : après coagulation de lait cru (lait de chèvre et lait de chamelle) qui est réparti en deux tubes ; le premier tube est incubé à 37° et le deuxième est incubé à 45°, des dilutions décimales (10^{-1} , 10^{-9}) de la suspension mère sont réalisés à l'aide de milieu de dilutions (peptone sel) et 1 ml de chaque dilution est ensemencé dans la masse des milieux gélosé suivants :

Tableau n° 02: milieux d'isolement des bactéries lactiques

Milieux d'isolement	Bactérie	T°C/durée	Incubation
MRS	Lactobacilles	37/24h-72h	Anaérobiose
M17	Streptocoques	45/24-72h	Aérobiose
Eliker	Lactocoques	30/48-72h	Aérobiose
MSE	Leuconostoc	30/48-72h	Aérobiose

3.5. Purification et conservation des souches :

Seules les bactéries à Gram positif et catalase négative ont été retenues. Pour chaque échantillons 5 à 10 colonies sont prélevées sur milieu MRS ou M17 et repiquées sur MRS ou M17. Après purification, les souches sont conservées par deux méthodes :

- Conservation court durée : les souches pures étaient ensemencées dans des tubes de gélose inclinée, après incubation à 30°, les tubes sont placés à +4° et le renouvellement des souches se fait toutes les 4 semaines.
- Conservation a longues durée : les cellules des isolats purifiés sont congelées à -20°C dans un milieu contenant 70 pour cent de lait écrémé (enrichit par 0.05 d'extrait de levure) et 30 pour cent de glycérol (samelis et *al.*,1994) après la centrifugation à 3000 tr/min pendant 10min.la culture peut être conservées plusieurs mois.

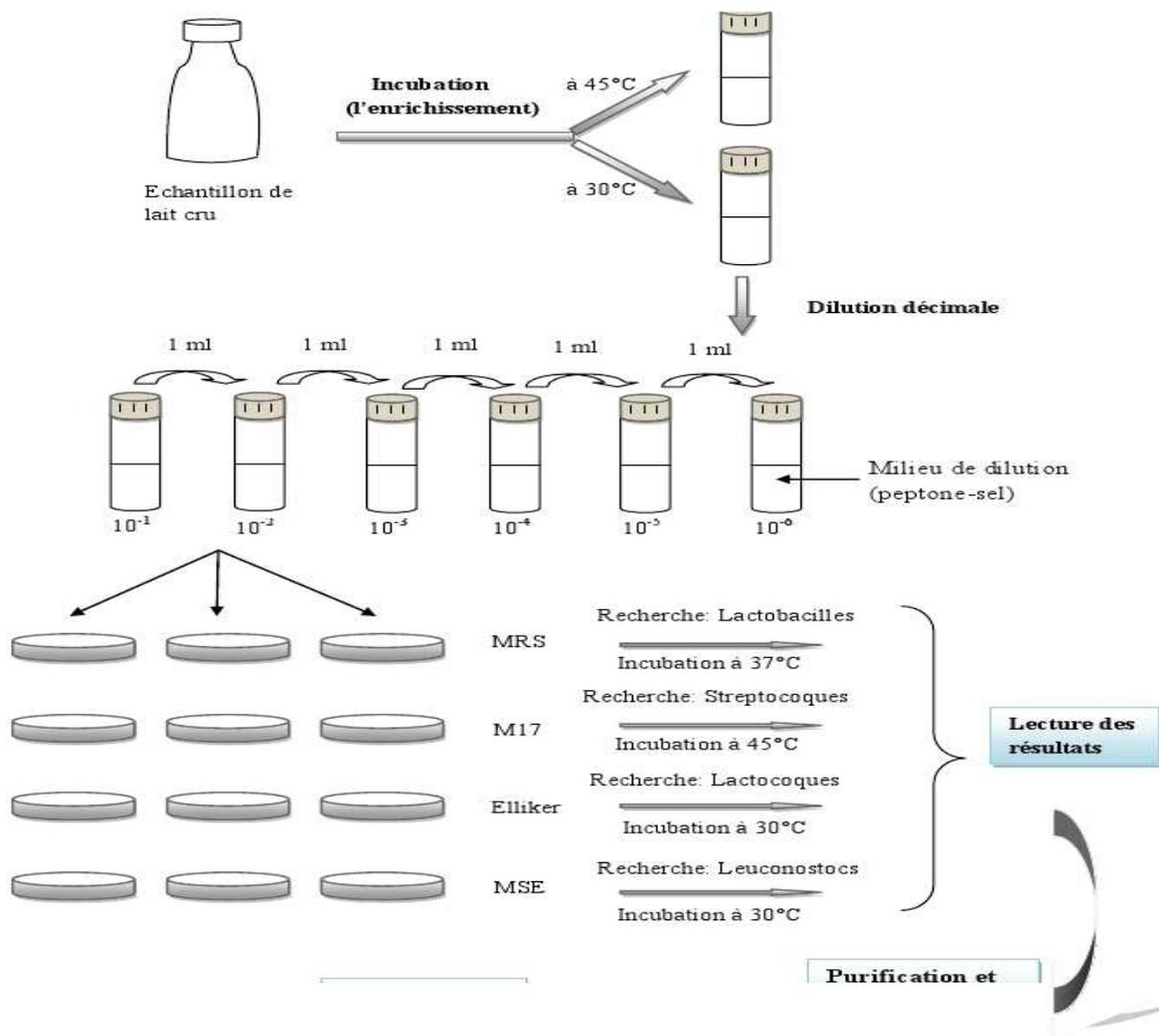


Figure n° 07 : protocole d'isolement des bactéries lactiques

3.6. Identification des isolats :

3.6.1. Critères morphologiques :

- **Caractérisation macroscopiques**

L'examen macroscopique est porté sur l'observation macroscopique qui permet de décrire l'aspect des colonies (la forme, la taille, pigmentation, viscosité, contour.)

- **Caractérisation microscopiques :**

La coloration de Gram a été utilisée pour classer les bactéries selon leur gram, leur morphologie et leur mode d'association

Les bactéries Gram positives et catalase négatives sont présumées des bactéries lactiques.

Remarque : Un autre test a été réalisé : l'ensemencement d'une souche isolée dans un milieu MRS liquide pour voir la pureté des souches.

3.6.2. Critères physiologiques et biochimiques :

3.6.2.1. Test de catalase :

Le test de catalase sert à démontrer si la bactérie possède l'enzyme catalase servant à décomposer le peroxyde d'hydrogéné.

L'activité catalytique consiste à prélever une colonie sur gélose MRS ou M 17 ET dissocié dans une goutte d'eau oxygénée H₂O₂ 10 volume ; l'apparition de bulles révélant le dégagement d'oxygène (Ahmed et Irene ,2007).

3.6.2.2. Croissance à différentes températures :

Ce test est important car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles (Leveau et al, 1991). L'aptitude à la culture est testée à :

- 37° et 45°C (lactobacilles) sur milieu MRS (Man et al., 1960)

- 37°C (leuconostoc) sur milieu MRS
- 45°C(streptocoques, lactocoques, et entérocoques) sur milieu M17(Terzaghi et Sandine,1975). La croissance est appréciée par l'apparition de trouble.

3.6.2.3. Type fermentaire :

Ce test permet de classer les bactéries en hétérofermentaire ou homofermentaire .il est effectué dans un milieu dépourvu de citrate pour éviter la formation de CO_2 liée à ce métabolisme particulier (Dicks et Vans Vuuren,1987). On ensemence abondamment un tube de 10 ml de bouillon MRS (sans citrate) ou M17 dans le milieu on introduit une cloche de Durham, le CO_2 dégagé par les bactéries hétérofermentaires s'accumule dans la cloche après l'incubation à 30°C pendant 24 à 48h.

3.6.2.4. La culture à Ph9,6 et celle en présence de NaCl :4 %,6,5%

Un milieu hyper salé à différentes concentrations de Na cl (4%, 6,5 %) et le milieu MRS alcalisé à ph 9,6 sont ensemencés et incubés à 30°C pendant 2 à 3 jours .On apprécie la croissance par apparition d'un trouble .

3.6.2.5. Production de l'acétoine :

La recherche de l'acétoine est testée par la réaction de VogesProskauer (VP) (Harrigan et McCance ,1976 ;Zourari et *al.*,1991) ,après une culture de 24 h à 30°C sur milieu Clark et Lubs ;ajouter 5 gouttes de réactif VP₁ (solution de soude NaOH à 16 % dans l'eau distillée)et le même réactif VP₂ (alpha-naphtol à 6% dans l'alcool 95°) .agiter soigneusement les tubes et attendre maximum 10 mn .La présence d'acétoine se traduit par une coloration rose en surface mais pouvant diffuser dans tout le milieu.

3.6.2.6 Production de CO₂ à partir de citrate :

Cette recherche est faite en inoculant la souche dans un tube (10.5ml) de lait écrémé stérile 10 pour cent ,ajouter 0.5ml d'une solution de citrate de sodium stérile (10pour cent)et verser environ 4 ml de gélose blanche (1.5%)elle –même stérilisée .La décomposition des citrate se manifeste par la production de gaz dans la masse de milieu en trois à cinq jours d'incubation à 30 °C (Harrigan et McCance,1976 ; Leveau et *al*,1991) .la production de gaz chez les *leuconostoc* et *lactococcus lactis* ssp biovar diacétylactis par la fragmentation de la gélose dans le tube (Larpen-Gourgaud et *al.*,1997).

3.6.2.7. Utilisation des citrates :

L'utilisation de citrate est détectée sur le milieu Kempler et McKay (1980). Après l'incubation à 30°C pendant 24 h à 48h, les colonies qui fermentent le citrate sont des colonies bleues ou ont un centre bleu (citr⁺). Les colonies incapables de fermenter le citrate restent blanches.

3.6.2.8. Production de dextrane :

Appliqué pour les isolats de *leuconostoc*(Carr et *al.*,2002) ; les souches à tester sontensemencées sur gélose MSE (Mayeux et *al.* ;1962) ; après incubation à 30°C pendant 48h les colonies sont muqueuses brillantes d'une pellicule opaque à la surface de la gélose.

3.6.2.9 Dégradation d'arginine(ADH) :

Elle est mise en évidence sur un milieu de moeller (Moeller ,1995 ;Harrigan et Mc Cance ,1976) pour chaque souche isolée ensemencée un tube de bouillon Moellerarginine et un tube témoin (moeller sans arginine) recouvrir le milieu avec 4 à 5 mm d'huile de paraffine v/v stérilisé après 2 à 6 jours d'incubation à 30°C la culture dans le tube témoin se manifeste par un virage au jaune du a l'acidification du milieu (métabolisme de glucose) (Larpen Gourgaud

et *al.*,2002).la dégradation de l'arginine aboutissant à la formation d'ammoniaque est révélée par l'alcalinisation du milieu qui devient violet.

3.6.2.10. Fermentation des hydrates de carbonés

La fermentation des carbohydrates a été menée sur milieu MRS sans extrait de viande, sans sucre et additionné au pourpre de bromocrésol (BCP) comme indicateur de pH (MRSBCP-EV) (Badiset *al.*,2005). La source de carbone est représentée par l'un des sucres suivants : Arabinose, Glucose, Galactose, Fructose, Saccharose, Sucrose, Mannitol, Xylose, Manose, Cellobiose, Dextrose, Lactose et Maltose (Bjokrothret *al.*,2006).

Les solutions sucres sont préparées à 3% stérilisées au bain marie (110°C/10min). Un millilitre de la solution est additionné à 10ml de MRSBCP-EV (Hariri *et al.*,2009).

Dans les tubes à hémolyse (galerie classique), on met 1ml du milieu (MRSBCP-EV) additionné à la solution de sucre déjà préparée et 0.1ml de la solution bactérienne (Guessaset *al.*, 2004). Cette dernière a été préparée à partir d'une culture de 18h, centrifugée à 8000tr/min pendant 15min. Le culot ainsi récupéré est additionné de 2ml de tampon phosphate puis recentrifugé aux mêmes conditions pour se débarrasser des restes du milieu de culture et pour obtenir un culot cellulaire pur. A ce culot 0,2ml de milieu de MRSBCP-EV est additionné pour former cette solution. On ajoute 0.5ml d'huile de paraffine pour créer les conditions d'anaérobiose. Vu le nombre important de souches étudiées ainsi que le nombre des tubes à utiliser avec chaque souche, une plaque d'Elisa a été utilisée. ET puits de chaque ligne contiendront une source de carbone qui sera utilisée par différentes souches.

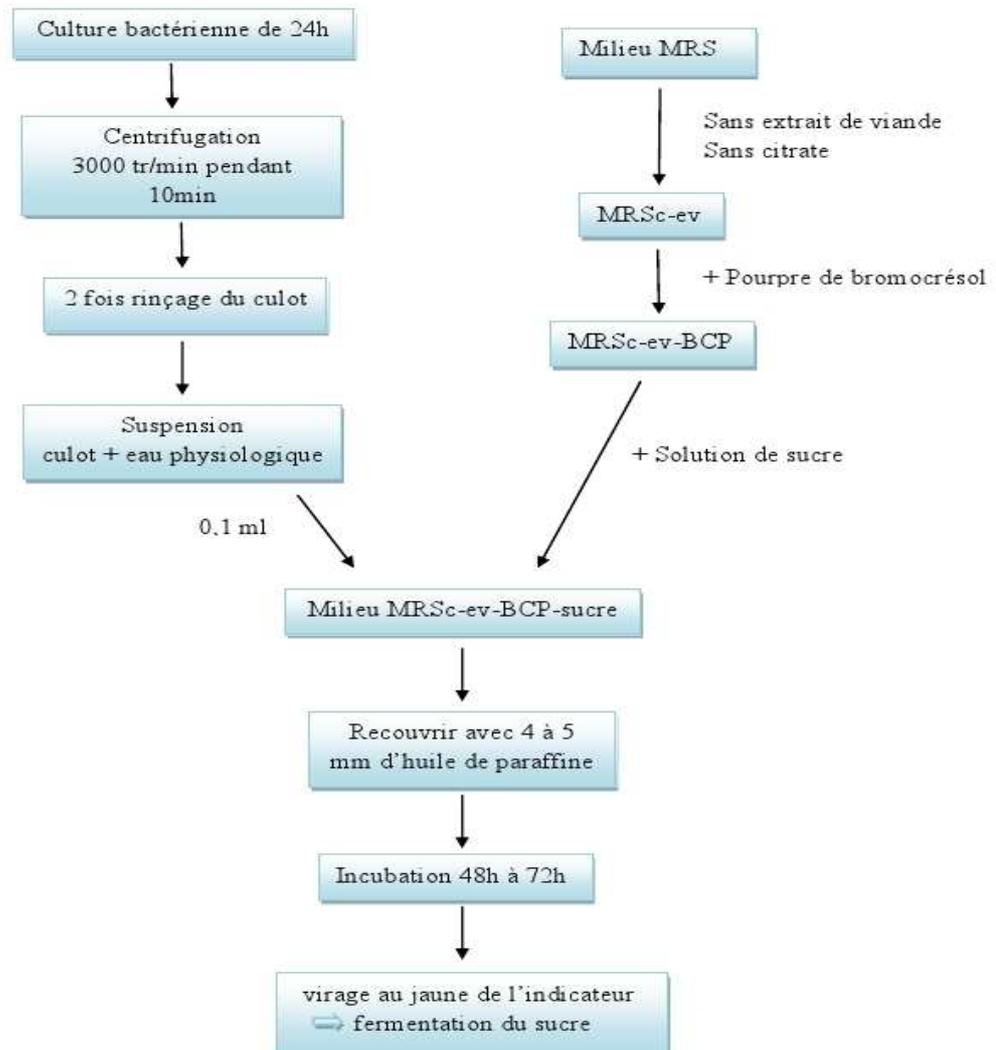


Figure 08 : protocole de la fermentation des hydrates de carbones.

Pour mettre en évidence les zones d'inhibition, les souches lactiques ont été ensemencées en touche (à l'aide d'un inoculateur multipoint stérile) à la surface d'un milieu MRS ou M17 solide à partir d'une culture de 24 h, les boîtes sont séchées sous la température ambiante pendant 2 heures. Après 24 h d'incubation chaque spot est recouvert avec une goutte de gélose nutritive maintenue en surfusion (50°C). Cela permet de fixer les colonies et d'éviter leur dispersions (Larpen-Gourgaud et al., 1997). Une couche de gélose moelle (0.7%) contenant 0.1ml d'une culture en milieu liquide de 18h d'une souche indicatrice (pathogène) est coulée au-dessus de la première couche de gélose.

La lecture des boîtes s'effectue après 24 heures d'incubation à 37°C en aérobiose, les souches présentant une zone transparente sont considérées comme productrices de substances antimicrobiennes. La taille des zones d'inhibition produites a été mesurée en mm.

3.7.2. Méthode de puits (méthode de Barefoot et Kaenhammer, 1983) :

Cette méthode est réalisée sur les bactéries lactiques inhibitrices possédant les plus grandes zones d'inhibition montrant la présence de substances peuvent diffuser dans un milieu de culture solide.

Les bactéries lactiques sont repiquées dans un milieu MRS ou M17 liquide et incubées pendant une période de 18 h à 30°C. Après incubation une centrifugation réfrigérée (4°C) est réalisée à 4000 tr/mn pendant 15 mn.

Des puits de 5 mm de diamètre sont creusés stérilement à l'aide d'un emporte-pièce (cloche de Durham) sur la gélose nutritive inoculé par la souche indicatrice (pathogène) et seront remplies avec 100ul du surnageant de culture ou d'extrait cellulaire. Les boîtes de Pétri sont mises à température de +4°/4h pour permettre la bonne diffusion de la substance antibactérienne (Doumandji et al., 2010). Les boîtes sont incubées à 37°C et la présence de zones d'inhibition formées autour des puits est examinée après 24h d'incubation (Hwanhlem et al., 2011).

notes

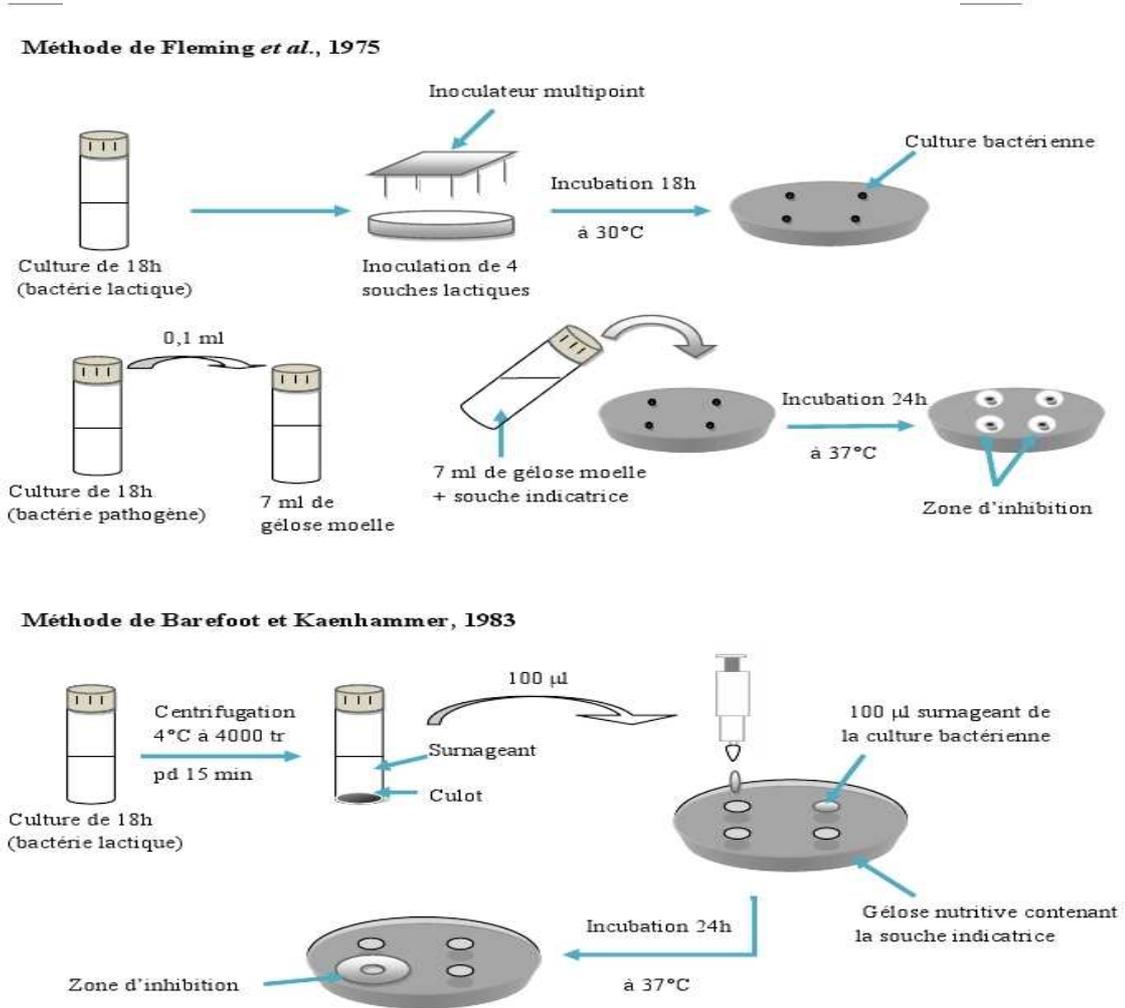


Figure n° 09: les différentes méthodes utilisées pour la recherche des substances antimicrobiennes

Chapitre IV

Résultats et discussion

Chapitre 04 :

Résultats et discussion

4.1.Résultats

4.1.1. Identification des isolats :

Lors de cette étude nous avons identifié les souches isolées à partir du lait de chèvre et lait de chamelle par les procédures phénol lytiques conventionnelles basés sur les tests morphologiques physiologiques et biochimiques.

Les isolats G+ et catalase – sont étudiées.

4.1.1.1. Critères morphologiques :

L'examen microscopique sur milieu MRS ou M17 montre des colonies circulaires bombées et de couleur blanche leur taille d'environ 1mm à 2 mm de diamètre ; l'aspect microscopique des souches après coloration de gram a révélé une forme cellulaire « coque » les coques sont disposés en paires (diplocoques), ou en courtes chainettes.

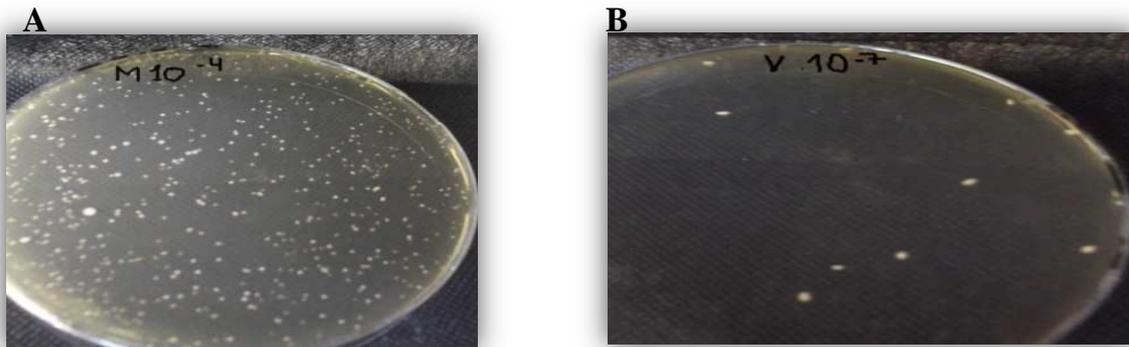


Figure n°10 : Aspect macroscopique des cultures bactériennes (*Leuconostocs*) ensemencée en profondeur avec MRSv

A : L'aspect macroscopique de la souche de *Leuconostoc* isolée à partir de lait de chèvre

B : L'aspect macroscopique de la souche de *Leuconostoc* isolée à partir de lait de chamelle.

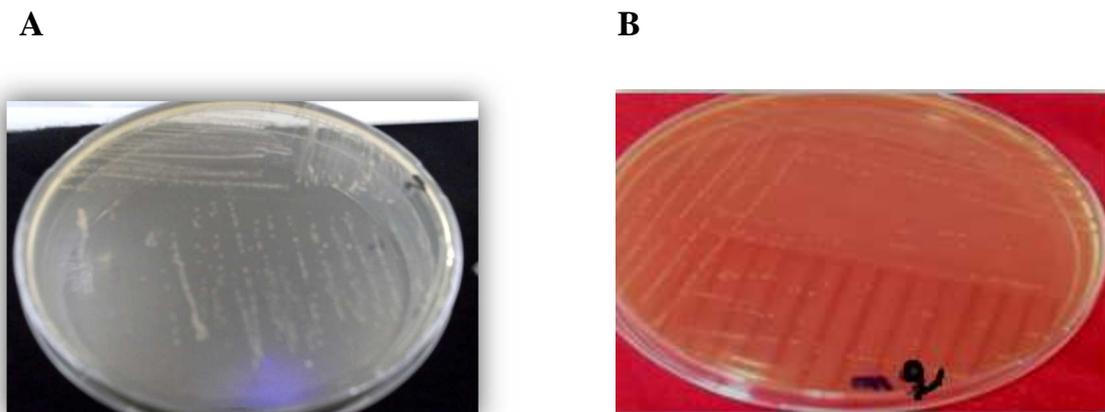


Figure n°11 : L'aspect macroscopique des souches V2 et M5 sur le milieu MRS (ensemencé en surface)

A : V2 la souche isolée de lait de chamelle. B : M2 la souche isolée de lait de chèvre.



Figure n°12 : Aspect de souche pure VI sur MRS liquide

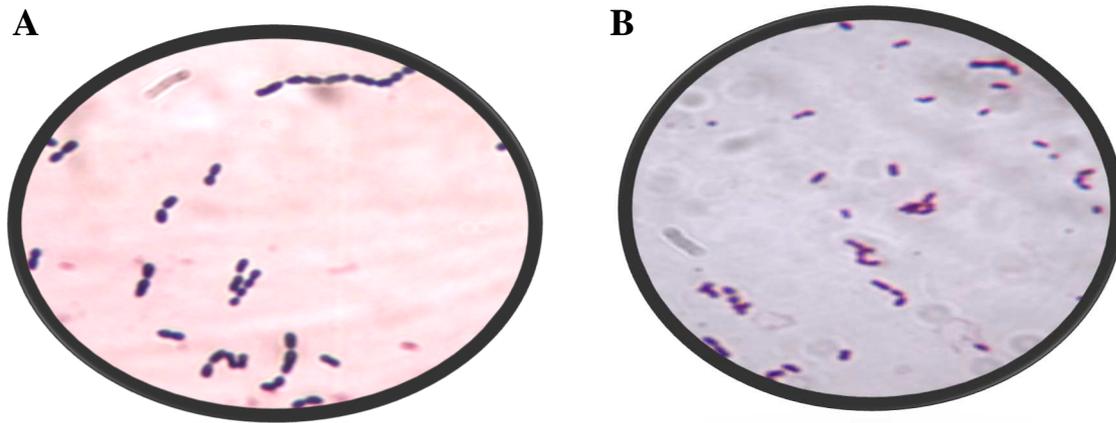


Figure n°13 : L'observation microscopique des cellules bactériennes (*Leuconostoc*) après fixation (Coloration de *Gram*) (**Gx1000**).

A : Lasouche M1 isolée de lait de chèvre. **B** : La souche V3 isolée de lait de chamelle

4.1.1.2. Critères physiologiques et biochimiques :

Les résultats des méthodes phénotypiques utilisées pour l'identification des souches lactiques sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau n° 03 : Les caractéristiques physiologiques et biochimiques des souches de *Leuconostoc* isolées.

Souches	M1	M2	M3	V1	V2	V3
Catalase	-	-	-	-	-	-
Gram	+	+	+	+	+	+
ADH	-	-	-	-	-	-
Production de CO ₂	+	+	+	+	+	+
4°C	-	-	-	-	-	-
15°C	+	+	+	+	+	+
37°C	+	+	+	+	+	+
45°C	-	-	-	-	-	-
63.5/30min	-	-	-	-	-	-
55/15min	+	+	+	+	+	+
pH4.8	-	-	-	-	-	-
pH6.5	+	+	+	+	+	+
3% NaCl	+	+	+	+	+	+
6.5% NaCl	-	-	-	-	-	-
Dextrane	+	+	+	+	+	+
L'utilisation de citrate	+	+	+	+	+	+
Production d'acétoïne	-	-	-	-	-	-

Les souches isolées sont déterminées comme *leuconostoc* grâce à la production de dextrane ; les souches donnent les résultats suivants : croissance à 37°C, ADH négatif, citrate positif, les souches de *leuconostoc* sont des hétérofermentaires, acétoïne négatif, produisent le CO₂ à partir de citrate.



Figure n°14 : Type fermentaire des isolats (*Leuconostoc*) sur milieu MRS liquide glucosé contenant la cloche de Durham. Incubées à 30°C/24h.

A : les isolats de lait de chèvre. B : Les isolats de lait de chamelle

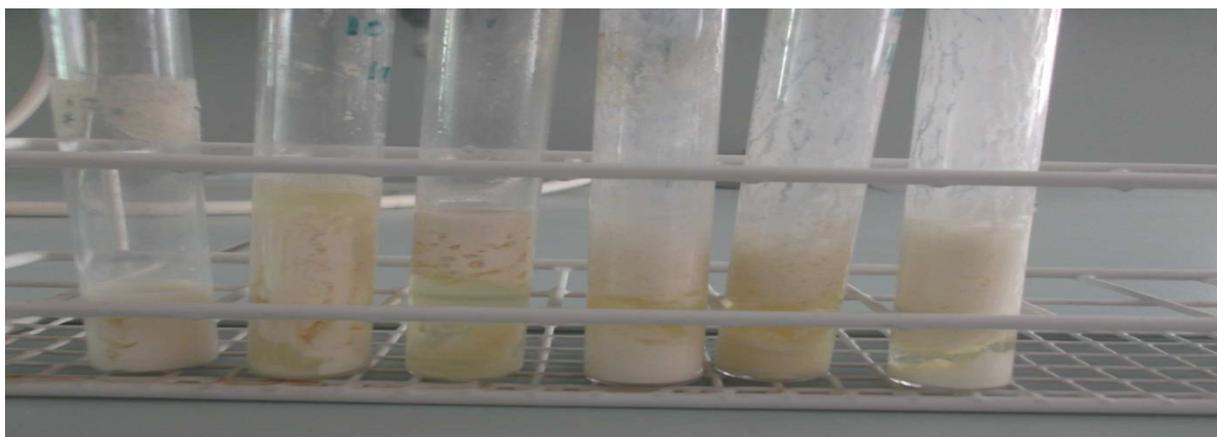


Figure n°15 : Type fermentaire des isolats (*Leuconostoc*) sur milieu lait UHT.

A : Les isolats de lait de chèvre. B : Les isolats de lait de chamelle

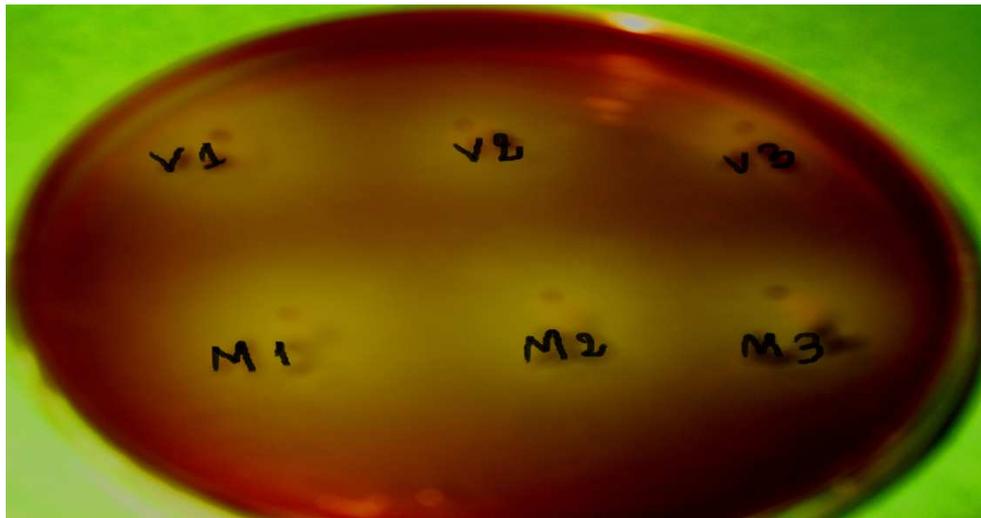


Figure n°16 : La couleur jaune indique l'absence l'ADH chez *Leuconostoc* (Test de l'hydrolyse de l'arginine). Souches (M) isolats de lait de chèvre et (V) isolats de lait de chamelle.



Figure n° 17: L'aspect de colonies productrices de dextrane par les souches M 3 et V3 sur milieu MSE.

A : Les isolats de lait de chèvre. **B** : Les isolats de lait de chamelle.

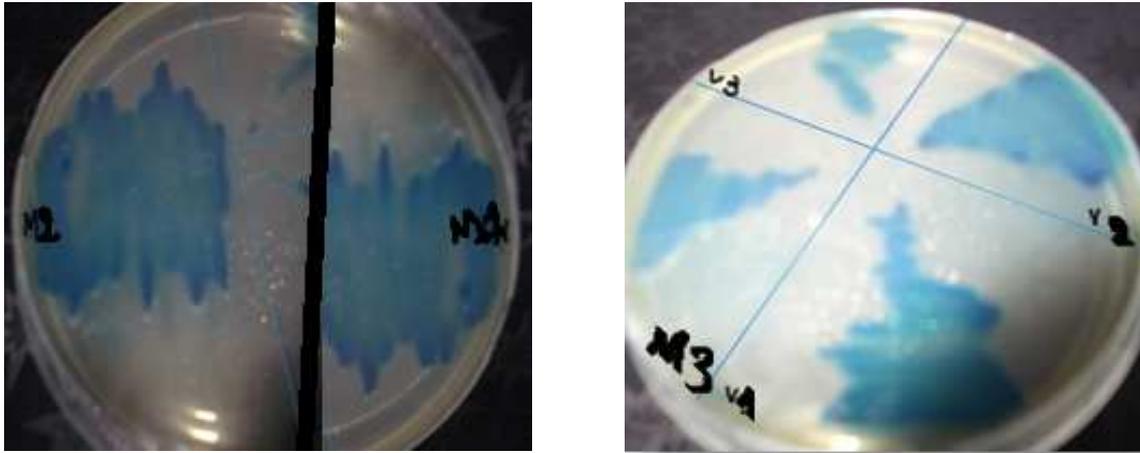


Figure n° 18 : l'utilisation de citrate révèle par les colonies bleues sur le milieu KMK de nos isolas

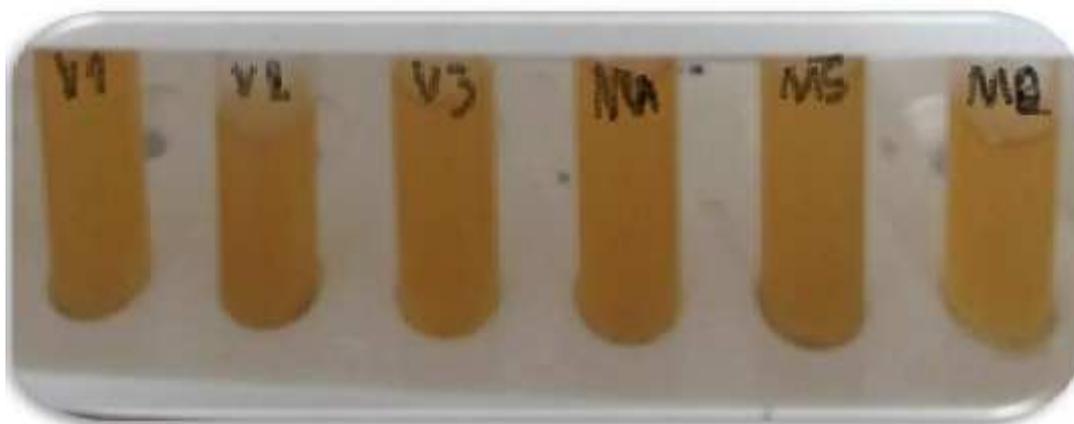


Figure n°19 : test de production d'acétoïne

V1, V2, V3 : Les isolats de lait de chamelle. Milieu jaune =>absence d'acétoïne =>test du VP négatif pour nos isolas lactique

M1, M2, M3 : Les isolats de lait de chèvre. Milieu jaune =>absence d'acétoïne =>test du VP négatif pour nos isolas lactique Tested .

4.1.1.3. Identification de l'espèce :

L'identification est complétée avec l'étude de la fermentation des hydrate de carbone par les souches isolées .

La fermentation des sucres par les souches isolées et leur identification ont été présentées dans le tableau et la figure suivante:



Figure n°20 :résultats de la dégradation des hydrate de carbone par les souches isolées

M1,M2,M3 les isolats de lait de chèvre

V1,V2,V3 les isolats de lait de chamelle

Tableau n°04 : résultats de la dégradation des hydrate de carbone par les 6 souches isolées

Souches	Arabinose	Glucose	Fructose	Saccharose	Sucrose	Mannitol	Xylose	Mannose	Cellubiose	Lactose	Dextrose	Maltose
V1	+	+	+/-	+	+	-	-	+/-	+	+	+	+
V2	+	+	+/-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
V3	+	+	+/-	+	+	-	-	+	-	+	-	+
M1	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
M2	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
M3	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+

Les souches de *Leuconostoc* généralement sont capables de fermenter la plupart des sucres ,mais ne fermentent pas l'inositol .

Les souches M1 ,M2,M3 ont le même profil fermentaire ; elles fermentent les mêmes sucres et présentent un résultat négatif avec les mêmes sucres aussi.

V1, V2, V3 ont le même profil fermentaire sauf que V1 et V 3 ne fermentent pas le mannitol, V3 ne fermente pas le cellulose et V 3 ne fermente pas le dextrose.

Si en comparant les souches M1,2,3 avec V1,2 ,3 on trouve une différence du profil fermentaire au niveau de plusieurs sucres.

Remarque : l'isolement d'un seul est genre est due à la méthode utilisée ainsi les critères morphologiques et biochimiques utilisées pour l'identification des genres et espèce.

4.1.2 . Résultats de l'activité antibactérienne :

Les souches isolées du lait cru de chèvre et de chémele ont été testées pour leur capacité à inhiber les bactéries pathogènes tel que *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *salmonella* ATCC 25983.

Notre choix s'est donc porté sur une technique largement décrite dans la littérature notamment celle de Fleming et *al.*, (1975) qui nous a permis de faire une première sélection de souches lactiques antimicrobienne ; les résultats d'interaction obtenues, révèlent la présence d'une zone claire autour des souches de bactéries lactiques de nos collections ensemencées en touche.

Les résultats de l'interaction entre les souches lactiques et les bactéries pathogènes. *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *salmonella* ATCC 25983 sont mentionnés dans les figures suivantes .

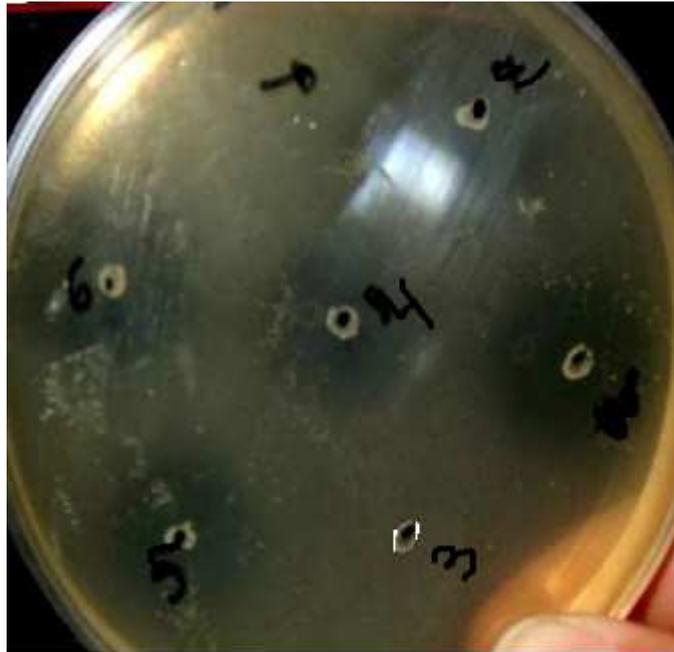


Figure n°21 : inhibitions obtenues par la méthode de Fleming (1975) des souches M1, M2, M3 (M1,M2,M3 les isolats de lait de chèvre « *Leuconostoc mesenteroides* subsp *dixtranicum* ») et V1,V2,V3 les isolats de lait de chamelle « *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides* » contre E.coli .



Figure n°22 : inhibitions obtenues par la méthode de Fleming (1975) des souches M1, M2, M3 (M1,M2,M3 les isolats de lait de chèvre « *Leuconostoc mesenteroides* subsp *dixtranicum* ») et V1,V2,V3 les isolats de lait de chamelle « *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides* » contre *Staphylocoque* .

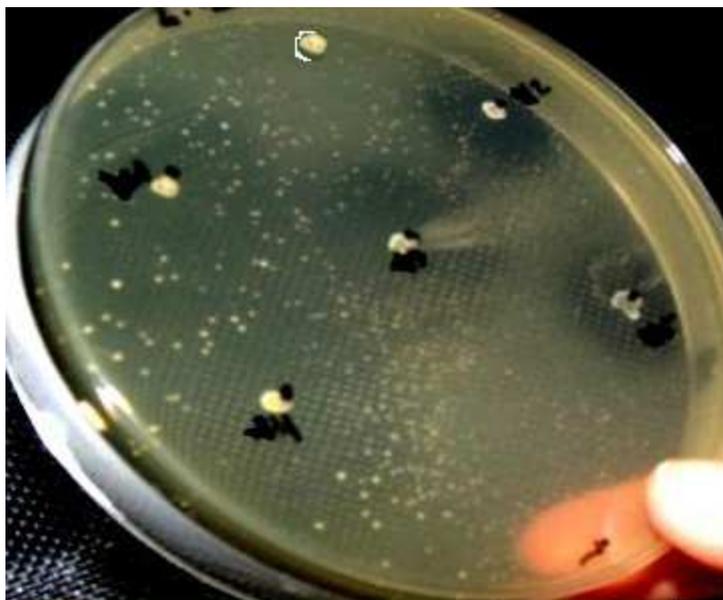


Figure n °23 : inhibitions obtenues par la méthode de Fleming (1975) des souches M1, M2, M3 (M1,M2,M3 les isolats de lait de chèvre « *Leuconostoc mesenteroides subsp dixtranicum*) et V1,V2,V3 les isolats de lait de chamelle « *Leuconostoc mesenteroides subsp mesenteroides* » contre *Salmonella* .

Tableau N :05: Diamètres des zones d’inhibition (mm) suite à la diffusion sur puits engélose.

Souches indicatrices	V1	V2	V3	M1	M2	M3
E .coli	14	10	00	16	16	20
Staphylococcus aureus	12	13	00	14	14	16
Salmonella	08	10	10	09	09	00

4.2. Discussion

4.2.1. Isolement et identification des souches :

Six souches de bactéries lactiques ont été isolées du lait cru de vache et du lait de chèvre, elles ont été cultivées et isolées sur milieu MRS, M17, Eliket et MSE du fait des exigences nutritionnelles des bactéries lactiques, les milieux de cultures doivent être très riches en sucres, en matières azotées et surtout en facteurs de croissance. (Pilet M-Fet *al.*, 2005).

La présence de divers germes de BL dans le lait cru (lait de chèvre, lait de chamelle) était prévisible car des bactéries lactiques ont été trouvées dans la microflore de tous les laits étudiés.

L'étude des principaux caractères morphologiques, biochimiques et physiologiques ont montré une diversité de germes et d'espèces isolées à partir du lait cru de chèvre et de chamelle.

Les espèces des bactéries lactiques détectées dépendent essentiellement de la nature du lait cru et de conditions d'analyses, (Saidi *et al.*, 2002).

Les résultats d'identification de cette étude montrent une présence majoritaire de coques par rapport aux bâtonnets. La même constatation a été mentionnée par Bekhouche F, Boulahrouf A (2005) et Kacem *et al.*, (2002). Ces coques sont représentées par les *Leuconostoc*; dans d'autres travaux il a été isolé *Leuconostoc mesenteroides* à partir d'échantillon de lait cru de vache (Bekhouche et Boulahrouf, 2005), du lait camelin (Khdid *et al.*, 2009) et différentes parties du chèvre africain (Olaoye et Onilude, 2009).

Les souches de *Leuconostoc* développées sur milieu MSE (Mayeux *et al.*, 1962) forment des colonies brillantes, transparentes, gluantes (1 à 5 mm) ne devenant muqueuses qu'après séjour à la température de laboratoire à cause de la production de dextrane (Larrent G.M. *et al.*, 1997), sur milieu MRS solides révélées des petites colonies ponctiformes de couleur blanchâtre à pourtour régulier de 1 mm de

diamètre ,l'observation après coloration de G ,indique qu'il S'agit des coques ovoïdes G+ en paires ou en chainettes (Novel .G ,1993) selon Garvie (1986) les corps cellulaires des *Leuconostoc* peuvent être sphériques mais souvent lenticulaire ,surtout lorsqu'elles sont cultivées sur milieu gélosé .

Les *Leuconostocs* fermentent le glucose avec production de gaz (CO₂),donc hétérofermentaires,ces souches produisent aussi du CO₂ à partir du citrate ,ne produisent pas l'acétoïne ,n'hydrolysant pas l'arginine ,développant à 37°C,présence de croissance à 6,5% NaCl,la plupart des souches hydrolyse l'esculine (Larpent G .M et al . ,1997 ; Novel G,1993 ;Larpent J-P.,1996 ;OgierJ-C.et al.,2008 ;Badis A.et *al.*,2004).

Ces espèces sont mésophiles et caractérisées par la production ,à partir du citrate du lait ,de diacétyle (Novel G.,1993).La production de CO₂ par *Leuconostoc* provient de l'hétérofermentation du lactose et de l'utilisation de citrate (Bourel G .et *al.*,2001). Certaines souches ne produisent pas de CO₂ à partir du citrate (souches atypique) ,le test de dégradation des carbohydrate soit par les galeries classiques soit par les galeries API50 CHL est indispensable pour identifier l'espèce et même la sous-espèce .Les souches au vu de vleurs profils de fermentation sont différentes.

A partir de test de sucre on confirme que toutes les souches isolées du lait cru (chamelle,chèvre) appartiennent au genre de *Leuconostoc* .

Ces souches sont identifiées *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides* et *Leuconostoc mesenteroides* subsp *dixtranicum* .

Les souches **V1,V2,V3** isolées à partir de lait de chamelle sont identifiées *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides* par la dégradation de l'arabinose, cellubiose,mannitol(Devoyod J.J. *et al.*, 1988 ; Bjökroth J. et Holzapfel W., 2006 ; Milliere J. B., *et al.*,1989) .

les souches M1,M2,M3, isolées à partir de lait de chèvre sont identifiées *Leuconostoc mesenteroides* subsp *dixtranicum* ;elles se distinguent aisément de *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides* parce qu'elles ne fermentent ni l'arabinose,ni

cellulose, ni mannitol . . (Holzapfel W., 2006 ; Milliere J.B., *et al.*, 1989).

Remarque : il est difficile d'identifier l'espèce ou sous-espèce par la méthode classique.

4.2.2 : l'activité antibactérienne :

La deuxième étape a permis de recenser des souches possédant l'activité antibactérienne intéressante.

Les bactéries lactiques métabolisent le lactose en acide lactique, abaissant ainsi le Ph et créant un environnement défavorable au développement des bactéries pathogènes et micro-organismes d'altération.

L'inhibition des micro-organismes pathogènes et la flore de contamination des aliments sont un souci important en ce qui concerne la transformation des produits alimentaires ; les micro-organismes pathogènes d'importance particulière en produits laitiers, incluent *Listéria monocytogène*, *E. Coli*, *Staphylococcus aureus*.

Un total de 6 souches bactériennes avec des effets antagoniques sur *E. coli*, des Staphylocoques et *Salmonella* a été détecté ; cette interaction positive indique l'inhibition de la croissance des trois bactéries pathogènes testés (*E. Coli*, *Staphylococcus aureus* et *Salmonella*) et montre une activité antagonique, qui est traduite par l'apparition des zones d'inhibition. (Fleming *et al.*, 1975 ; Barefoot et Kaenhammer, 1983 ; Tbak *et al.*, 2007).

Vaughan *et al.*, (1994) démontrent la capacité des bactéries isolées de lait de chèvre à inhiber des staphylocoques, des bactéries lactiques démontrant une activité antibactérienne ont portant été isolées de plusieurs produits tel que les viandes, produits laitiers, et divers aliments (Castro *et al.*, 2010 et Lumia *et al.*, 2007).

La majorité des leuconostocs présentent un potentiel à inhiber la croissance des bactéries ciblées ; au sein de ces bactéries les deux souches M2, M3 (*Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides*) possèdent un potentiel (14, 16, 20 mm) vis-à-vis *E. coli*, *Staphylococcus aureus*.

Des résultats sont démontrés par Guy et hying (2006) ayant trouvé que parmi les souches isolées à partir de joetgal aliment fermenté coréen ; les souches (*Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides* présentent des inhibitions contre *S.aureus* avec un diamètre de 22 mm .

Gonzalez et al.,(2007) ont démontré que les souches de leuconostoc qui ont été isolées a partir de « genestoso » un fromage fabriqué à partir du mélange des laits de chèvre, vache et brebis en Espagne avaient une activité antibactérienne contre *S.aureus* ,*L.monocytogenes* et *E.faecalis* .

Conclusion

Conclusion

Les bactéries lactiques sont utilisées dans la fermentation et la bio conservation des aliments grâce à la production des acides organiques et d'autres substances antibactériennes tel que les bactériocines en inhibant certaines souches pathogènes.

Dans le but de mettre en évidence l'effet inhibiteur de ces bactéries, nous avons essayé quelques souches de bactéries lactique à partir de lait cru de lait de chamelle et lait de chèvre selon les tests utilisés on a conclu sur un seul genre *Leuconostoc*, un test de dégradation des hydrates de carbonnes nous a permis d'identifier deux espèces ; leuco *nostoc mesenteroides subsp dixtranicum* et *Leuconostoc mesenteroides subsp dixtranicum* .

Les souches testées ont été testé pour leur effet antibactérien à l'encontre de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Escherichia coli* ATCC 25922 et salmonella ATCC 25983 .l'interaction de nos souches lactiques et les bactéries pathogènes a donné des résultats positifs pour presque de toutes les souches observés par des zones d'inhibition .

Les méthodes utilisées ont permis d'isoler un nombre faible et un seul genre de bacteries lactiques , plusieurs facteurs ont influencés les résultats tel que (la contamination ,le temps)

Concernent l'activité antimicrobienne ,on a utilisé la méthode par touche de Fleming pour chercher les souches indicatrices , cette méthode doit etre suivre par d'autres techniques por bien évaluer l'activité anitibactérienne des souches lactiques ainsi de savoir le type des subctances antimicrobiennes secrétéesc par ces souches .

Ces observations ouvrent des perspectives fuuturs :

Il serait intéressant de faire une caractérisation plus poussée et une purification

des substances inhibitrices produites par les souches de *Leuconostoc*

mesenteroides Ln.

- Des études plus approfondies doivent être menées pour purifier, caractériser l'agent inhibiteur.
- L'enjeu à long terme, surtout pour l'agro-industrie et de trouver un moyen

naturel de diminuer l'utilisation des conservateurs.

- Cependant toute méthode *in vitro* doit être complètement validée *in vivo* avec des expériences sur des animaux afin de s'assurer de son applicabilité et de déterminer ses limites.

Références bibliographique

Références bibliographiques

A

- Abdi R., Sheikh-Zeinoddin M. et Soleimani-Zad S.**, 2006. Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated From Traditional Iranian Lighvan Cheese, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9(1): 99-103
- Ahmad Faris Mohd Adnan, Irene K.P. Tan**, 2007. Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potential. *Bioresource Technology.*, 98: 1380-1385
- Allison G. E., Fremaux C., Klaenhammer T.R.**, 1994. Expansion of bacteriocin activity and host range upon complementation of two peptides encoded within the lactacin F operon. *J. Bacteriol.*, 176: 2235-2241
- Allouche F.N., Hellal A., Laraba A.**, 2010. Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. *Nature et Technologie.*, 3: 13-20
- Ammor Mohammed Salim**, 2004. Ecosystème microbien d'un atelier fermier de salaison : Identification et propriétés des bactéries lactiques. Thèse de Doctorat en physico-chimie et qualité des bioproduits. Université de Rennes 1-France.
- Ammor M.Salim, Tauveron Grégoire, Dufour Eric, Chevallier Isabelle**, 2006. 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.*, 17: 454-461
- Axelsson Lars**, 2004. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology **In** Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects. Salminen S., Wright A.v., Ouwehand A. 3^e Ed., Marcel Dekker, pp: 1-66
- Axelsson L.T., Chung T.C., Dobrogosz W.Z., Lendgren S.**, 1989. Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Micro. Eco. Health Dis.*, 2: 131-136
- Ayad Eman H.E., Omran Nadia, El-Soda Morsi**, 2006. Characterisation of lactic acid bacteria isolated from artisanal Egyptian Ras cheese. *Lait.*, 86: 317-331

B

- Badis A., Guetarni D., Moussa Boudjema B., Henni D.E., Kihal M.**, 2004. Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiology*, 21: 579-588
- Barefoot S.F., Klaenhammer T.R.**, 1983. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol*, 45(6) :1808-1815
- Barefoot S.F., Kleanhammer T.R.**, 1984. Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin, lactacin b. Antimicrobial. *Agents chemother.*, 26: 328-334.
- Benkerroum N., Misbah M., Sandine W.E., et A. Tantaoui Elaraki**, 1993. Development and Use of a Selective Medium for Isolation of *Leuconostoc* spp. from Vegetables and Dairy Productst. *Appl Environ Microbiol*, 59(2) : 607-609
- Bensalah Farid**, 2006. Identification et caractérisation moléculaire des bactéries lactiques basées sur les techniques d'amplification de séquences spécifiques d'ADN par la méthode PCR. Thèse de Doctorat en Biologie Moléculaire et Génétique. Université d'Oran Es-Senia
- Bekhouche F. et Boulahrouf A.**, 2005. Etudes quantitative et qualitative des bactéries lactiques de lait cru produits par des vaches locales appartenant a six stations d'élevage de Constantine. *Sciences & Technologie.*, 23: 38-45
- Bey F.**, 2009. Etude de l'interaction antagoniste entre *Lactobacillus* sp. et quelques souches d'entérobactéries. Mémoire de Magistère en Microbiologie Alimentaire et Industrielle. Université d'Oran Es-Senia
- Bjökroth J., Holzapfel W.**, 2006. Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. *Prokaryotes.*, 4: 267-319
- Bottazzi V.**, 1988. An introduction to rod-shaped lactic bacteria, *Biochimie*, 70: 303-315
- Boubekri Karima, Ohta Yoshiyuki**, 1995. Identification of Lactic Acid Bacteria from Algerian Traditional Cheese, El-Klila, *J. Sci Food Agric*, 70: 501-505
- Bourel G., Henini S., Krantar K., Oraby M., Diviès C., Garmyn D.**, 2001. Métabolisme sucre-citrate chez *Leuconostoc mesenteroides*. *Lait* 81 : 75-82
- Brul S., Coote P.**, 1999. Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms. *Int. J. Food Microbiol.*, 50(1-2): 1-17.

C

Caplice E., Fitzgerald G., 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 50(1-2) : 131-149

Carr Frank J., Chill Don, and Maida Nino, 2002. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28(4): 281–370

Castro M.P., Palavecino N.Z., Herman C., Garro O.A., Campos C.A., 2010. Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: Characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. *Meat Science.*, doi:[10.1016/j.meatsci.2010.11.006](https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.11.006)

Cenatiempo Y., Berjeaud J.M., Biet F., Fremaux C., Hechard Y., Robichon D., 1996.

Bactériocines de bactéries lactiques: données récentes sur leur structure, leur mode d'action et leurs déterminants génétiques. *Lait.*, 76 : 169-177

Chen H., Hoover D.G., 2003. Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety.*, 2: 83-100

Cheriguene Abderrahim, 2008. Caractérisation et Etude du Potentiel Technologique des Bactéries Lactiques isolées à Partir du Lait de Chèvre de l'Ouest Algérien. Thèse de Doctorat en Microbiologie Alimentaire et Industrielle. Université d'Oran Es-Senia

Collins M.D., Farrow J.A.E., Phillips B.A., Fergus S. et Jones D., 1987. Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola*, and some catalase-negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus, *Carnobacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 37: 310-316.

Corsy J.C., 1991. La chèvre. Ed. *La maison rustique*, Paris. pp: 7-21

Curk M.C., Boeufgras J.M., Decaris B., Gavini F., Kersters K., Larpent J.P., Le

Bourgeois P., Renault P., De Roissart H., Rouvier C., 1994. Méthodes d'identification des bactéries lactiques **In** Bactéries lactiques. De Roissart H., Luquet F.M. Tome 1, Loric. pp: 141-160

D

Dalache Fatiha, 2006. Effet inhibiteurs des bactéries lactiques. Bactériocines de *Lactococcus* et d'*Enterococcus*: mise en évidence d'un support plasmidique. Thèse de Doctorat en Microbiologie moléculaire et génétique. Université d'Oran Es-Senia

Dellaglio F., De Roissart H., Torriani S., Curk M.C., Janssens D., 1994. Caractéristiques générales des bactéries lactiques **In** Bactéries lactiques. De Roissart H., Luquet F.M. Tome 1, Lrica. pp 25-70

De Man, J., Rogosa, M. et Sharpe, M.E., 1960. A medium for the cultivation of *Lactobacilli*, *J. Appl. Bacteriol.*, 23:130-135

De Martinis E.C.P., Públio M.R.P., Santarosa P.R., Freitas F.Z., 2001. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum packaged Brazilian meat and meat products. *Brazilian Journal of Microbiology.*, 32: 32-37

- De Roissart H.** 1986. Bactéries lactiques **In** Ecosystème microbien d'un atelier fermier de salaison identification et propriétés des bactéries lactiques. Thèse de doctorat. Université de Rennes-France.
- Desmazeaud Michel**, 1998. Bactéries lactiques et qualité des fromages. Laboratoire de recherches laitières, INRA Jouy-en-Josas. France.
- Desmazeaud M.J. et De Roissart H.**, 1994. Métabolisme général des bactéries lactiques. **In** Bactéries lactiques. De Roissart H., Luquet F.M. Tome 1, Lrica. pp : 169-207
- Devoyod J.J. et Poullain F.**, 1988. Les Leuconostocs Propriétés: leur rôle en technologie laitière, *Le Lait*, 68 (3) : 249-280
- De Vuyst Luc, Leroy Frédéric**, 2007. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications. *J. Mol. Microbiol Biotechnol.*, 13: 194-199
- Dicks L.M.T., Van Vuuren H.J.J.**, 1987. A modification of the hot-tube method for the detection of carbon dioxide produced by heterofermentative *Lactobacillus* strains. *J. Microbiol. Meth.*, 6: 273-275
- Diop Bakar M., Dubois-Dauphin R., Tine E., Ngom A., Destain J., Thonart P.**, 2007. Bacteriocin producers from traditional food products., *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 11(4): 275-281
- Dortu Carine**, 2008. Isolement d'une bactérie lactique produisant de la sakacin G et utilisation sur des matrices alimentaires. Thèse de Doctorat en sciences agronomiques et ingénierie biologique. Université de Gembloux.
- Dortu Carine, Thonart Philippe**, 2009. Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 13(1): 143-154
- Doumandji A., Hellal A., Saidi N.**, 2010. Purification de la bactériocine a partir de *Lactobacillus acidophilus* 11, *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.*, 4: 25-47
- Drider D., Fimland G., Héchard Y., Mc Mullen L.M., Prevost H.**, 2006. The continuing story of class IIa bacteriocin. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 70 (2): 564-582
- E**
- Elliker P.R., Anderson A.W., Hannesson G.**, 1956. An agar culture medium for lactic streptococci and lactobacilli. *J. Dairy. Sci.* , 39:1611-1612
- Eom H.-J., Seo D.M., Han N.S.**, 2007. Selection of psychrotrophic *Leuconostoc* spp. producing highly active dextransucrase from lactate fermented vegetables. *Int .J. Food Microbiol.*, 117: 61-67

Ennahar S., Deschamps N., Richard J., 2000. Natural variation in susceptibility of *Listeria* strains to class IIa bacteriocins. *Current Microbiol.*, 41: 1-4

Erdoúrul Ozlem, Erbüfür Feryal, 2006. Isolation and Characterization of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei* from Various Foods. *Turk. J. Biol.*, 30: 39-44

F

Facklam R., Elliot J.A., 1995. Identification, Classification, and Clinical Relevance of Catalase-Negative, Gram-Positive Cocci, Excluding the Streptococci and Enterococci. *Clinical Microbiol. Reviews.*, 8: 479-495

Fimland G., Axelsson L., Brurberg M.B., Nes I.F., Eijsink V.G., Nissen-Meyer J., 2000. A C-Terminal disulfide bridge in pediocin-like bacteriocins renders bacteriocin activity less temperature dependent and is a major determinant of the antimicrobial spectrum. *J. bacterial.*, 182: 2643-2648

Fleming H.P., Etechells J. L., Costilow R. N., 1975. Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber Brines. *Appl Microbiol.*, 30(6): 1040-1042

Franciosi Elena, Settanni Luca, Cavazza Agostino, Poznanski Elisa, 2009. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. *International Dairy Journal.*, 19: 3-11

Franz Charles M.A.P. et Holzapfel Wilhelm. H., 2004. The Genus *Enterococcus*: Biotechnological and Safety Issues In Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects. Salminen S., Wright A.v., Ouwehand A. 3^e Ed., Marcel Dekker, pp: 199-230

Fujitoshi Yanagida, Yi-sheng Chen, Takashi Shinohara, 2006. Searching for bacteriocin-producing lactic acid bacteria in soil. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 52: 21-28

G

Galvez A., Abriouel H., Lopez R.L., Ben Oma N., 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 120(1-2): 51-70

Garvie E.I., 1986. Gram positive cocci - Genus *Leuconostoc*. In: *Bergeys' Manual*, 9th edit., the Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp: 1071-1075

Ghali H., Allaoui A., Destain J., Benkerroum N., Thonart P., 2006. Bacteriocin activity by *Lb. curvatus* CWBI-B28 to inactivate *L. monocytogenes* in cold-smoked salmon during 4 degrees C storage. *J. Food Prot.*, 69: 1066-1071

Giraffa G., Carminati D., Neviani E., 1997. Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. *J. Food Prot.*, 60: 732-737

- Gonzalez L., Sandoval H., Sacristan N., Castro J.M., Fresno J.M., Tornadijo M.E., 2007.** Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. *Food Control.*, 18: 716-722
- Gratia A., 1925.** C R Seanc Soc Biol 93:1040-1041, In Mayr-Harting and others. 1972.
- Gravesen A., Ramnath M., Rechinger K. B, Andersen N., Jansch L., Hechard Y., Hastings J.W., Knochel S., 2002.** High-level resistance to class IIa bacteriocins is associated with one general mechanism in *Listeria monocytogenes*. *Microbiology.*, 148: 2361-2369
- Guessas Bettache., 2006.** Les potentialities métaboliques des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre dans le biocontrôle de *Staphylococcus aureus*. Thèse de Doctorat en microbiologie appliquée. Université d'Oran Es-Senia
- Guillouard Isabelle, Lim Eng-Mong, Guchte Maarten Van, Grimaldi Christine, Penaud Stéphanie, Maguin Emmanuelle, 2004.** Tolérance et réponse adaptative au stress acide chez *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Lait.*, 84: 1-6
- Guinane C.M., Cotter P.D., Hill C., Ross P., 2005 .**A review-Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota of food. *J. Appl. Microbiol.*, 98: 1316-1325
- Gurira O.Z., Buys E.M., 2005.** Characterization and antimicrobial activity of *Pediococcus* species isolated from South African farm-style cheese. *Food Microbiology.*, 22: 159-168
- Gyu Sung Cho, Hyung Ki Do, 2006.** Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from a Traditional Jeotgal Product in Korea. *Ocean Science Journal.*, Vol. 41(2): 113-119

H

- Hammes W.P., Hertel C., 2006.** The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. *Prokaryotes.*, 4: 320-403
- Hardie J.M., Whiley R.A., 1995.** The genus *Streptococcus* **In** The Genera of Lactic acid Bacteria. B.J.B. Wood, and W.H. Holzapel Eds., Vol 2., Aspen Publishers, Gaithersburg, MD.
- Harrigan W.F., McCance M.E., 1976.** Eds., Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology. *Academic Press*, Orlando.

Hemme Denis, Foucaud-Scheunemann Catherine, 2004. *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy Journal.*, 14: 467-494

Hittu Gupta, Ravinder Kumar Malik, 2007. Incidence of virulence in bacteriocin-producing enterococcal isolates. *Lait.*, 87: 587-601

Ho Thi Nguyet Thu, 2008. Étude de la flore lactique du Nem Chua, produit carné fermenté cru traditionnel du sud Vietnam et maîtrise du processus de fermentation par ajout de souches lactiques sélectionnées spécifiques du produit. Thèse de Doctorat en Sciences des Aliments et Nutrition. Université Bordeaux 1- France

Holzappel W.H., 2002. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *Int. J. Food Microbiology.*, 75: 197-212

Hugas M., Garriga M., Aymerich T., Monfort J.M., 1993. Biochemical characterization of lactobacilli from dry fermented sausages. *Inter. J. Food Microbiol.*, 18 (2): 107-113.

Hwanhlem N., Buradaleng S., Wattanachant S., Benjakul S., Tani A., Maneerat S., 2011. Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented fish (Plasom) and production of Plasom from selected strains. *Food Control.*, 22: 401-407

J

IDF: International Dairy Federation, 1990. The composition of ewe's goat's milk *Ed. Doc*, pp 220

Izquierdo E., Wagner C., Marchioni E., Aoude-Werner D., Ennahar S., 2009. Enterocin 96, a novel Class II bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* WHE 96, isolated from Munster cheese. *Appl. Env. Microbiol.*, 75(13): 4273-4276

J

Jacob F., Siminovitch L., Wollman E., 1953. Comparison between the induced biosynthesis of colicine and of bacteriophage and between their mode of action. *Ann. Inst. Pasteur.*, 84(1): 313-318

Joffraud J.-J., Cardinal M., Cornet J., 2006. Effect of bacterial interactions on the spoilage of cold smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology.*, 112: 51-61.

K

Kacem M., Zadi-Karam H., Karam N-E., 2002. Bactéries lactiques isolées de lait de vaches, de brebis et de chèvre de l'Ouest Algérien. *Renc. Rech. Ruminants*, 9: 375

Kandler O., Weiss N., 1986. Regular, non-sporing gram-positive rods **In** Bergey's Manual of

Systematic Bacteriology. Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G., Williams and Wilkins (Eds), Baltimore, 2: 1208-1234

Karam N-E., Zadi-Karam H., Lazreg L., Dalache F., 2008. Bactériocines de bactéries lactiques: caractérisation d'une bactériocine d'*Enterococcus* BO2. *Renc. Rech. Ruminants.*, 15: 72

Kempler G.M., Mc Kay L.L., 1980. Improved medium for detection of citrate fermenting *Streptococcus lactis* subsp *diacetylactis*. *J. Appl. Environ.Microbiol.*, 39: 926-927

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. *Microbiological Research.*, 164: 81-91

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

Klaenhammer T.R., 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12(1-3): 39-85

Klaenhammer T.R., Fremaux C., Hechard Y., 1994. Activité antimicrobienne des bactéries lactiques **In** Bactéries lactiques. De Roissart H., Luquet F.M. Tome 1, *Lorica*. pp: 353-366

Klaenhammer T. R., Barrangou R., Buck B. L., Azcarate-Peril M. A., Altermann E., 2005. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiology Reviews.*, 29: 393-409.

Klein G., Pack A., Bonaparte C., Reuter G., 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria International. *Journal of Food Microbiology* ., 41: 103-125

König Helmut, Fröhlich Jürgen, 2009. Lactic Acid Bacteria **In** Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine. König H. *et al.* (eds.). Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, pp: 3-29 (URL: <http://link.springer.de/link/service/books>)

ℒ

Labioui H., Elmoualdi L., El Yachioui M., Ouhssine M., 2005. Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.*, 144: 237-250

Lamontagne M., Champagne C.P, Reitz A.J, Moineau S., Gardner N., Lamoureux M., Jean J., Fliss I., 2002. Microbiologie du lait **In** Science et technologie du lait : transformation du lait. Vignola C.L. *Ecole Polytechnique Montreal*, pp: 75-128 (<http://web.google.com/books>)

Lancefield R.C., 1933. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J. Exper. Med.*, 57: 571-595

- Larpent J-P.**, 1996a. Les bactéries lactiques **In** Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentation alimentaires. Bourgeois C.M., Larpent J-P. Tome 2, *Tec & Doc*, Lavoisier, pp: 4-33
- Larpent J-P.**, 1996b. Laits et produits laitiers non fermentés **In** Microbiologie alimentaire : Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Bourgeois C.M., Mesle J.F., Zucca J. Tome 1, *Tec & Doc*, Lavoisier, pp: 272-294
- Larpent J-P., Copin M-P., Germonville A., Jaquet M., Thétas J-L.**, 1997. Microbiologie du lait et des produits laitiers **In** Microbiologie alimentaire Techniques de laboratoire. Larpent J-P. *Tec & Doc*, Lavoisier, pp: 704-805
- Larpent-Gourgaud Monique, Michaux odile, Lrpent J.P, Desmasures Nathalie, Desmazeaud Michel, Mangin Irène, Masson Florence, Montel M.C. et Tailliez Patrick.**, 1997. Les ferments lactiques et bactéries apparentées **In** Microbiologie alimentaire Techniques de laboratoire. Larpent J-P. *Tec & Doc*, Lavoisier, pp: 199-255
- Lasagno M., Beoletto V., Sesma F., Raya R., Font De Valdez G., Eraso A.**, 2002. Selection of bacteriocin producer strains of lactic acid bacteria from a dairy environment. *Microbiologia.*, 25: 37- 44
- Leveau J-Y., Bouix Mrielle, De Roissart H.**, 1991. La flore lactique **In** Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaire. Bourgeois C.M., Leveau J-Y. *Tec & Doc*, Lavoisier, pp: 152-186
- Liebefeld**, 2002. Microbiologie des cultures. Unité de recherche « lait, fromage »
- Lima E.T., Andreatti Filho R.L., Okamoto A.S., Noujaim J.C., Barros M.R., Crocci A.J.**, 2007. Evaluation in vitro of the antagonistic substances produced by *Lactobacillus* spp. isolated from chickens. *Canadian Journal of Veterinary Research.*, 71: 103-107
- Liu S.**, 2003. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 83(2): 115-131.
- Luchansky J.B., Call J.E.**, 2004. Evaluation of nisin-coated cellulose casings for the control of *L. monocytogenes* inoculated onto the surface of commercially prepared frankfurters. *J. Food Protec.*, 67: 1017-1021
- Ludwig W., Schleifer K-H., Whitman W.B.**, 2008. Bergey's taxonomic outlines - Revised Road Map to the Phylum Firmicutes., vol. 3. Disponible http://www.bergeys.org/outlines/Bergeys_Vol_3_Outline. Pdf

M

- Mathot A.G., Beliard E., Thnault D.**, 1996. Propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques **In** Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentation alimentaires. Bourgeois C.M., Larpent J-P. Tome 2, *Tec & Doc*, Lavoisier, pp: 432-450
- Mayeux, J.V., Sandine, W.E., Elliker, P.R.** 1962. A selective medium for detecting *Leuconostoc* in mixed-strain starter cultures. *J. Dairy Science*, 45: 655-656
- McAuliffe O., Hill C.**, 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Rev.*, 25: 285-308
- McAuliffe O., Hill C., Ross R.P.**, 2000. Each peptide of the two-component lantibiotic lactacin 3147 requires a separate modification enzyme for activity. *Microbiology.*, 146: 2147-2154
- McAuliffe O., Ryan M.P., Ross R.P., Hill C., Breeuwer P., Abee T.**, 1998. Lactacin 3147, a broad-spectrum bacteriocin which selectively dissipates the membrane potential. *Appl Environ Microbiol.*, 64(2): 439-445
- Medouakh L., Ait Abdeslam A., Bensoltane A.**, 2010. Antagonistic Activity of *Lactobacillus* Sp. against *Helicobacter pylori*. *International Journal of Microbiological Research.*, 1(3): 80-86
- Metchnikoff E.**, 1908. Prolongation of life: Optimistic studies. *William Heinemann*, London. pp: 161-183
- Metlef S., Dilmi-Bouras A.**, 2009. Effet antagoniste de *Lactococcus lactis*, souches extrémophiles locales, sur des espèces de la flore intestinale résidente. *Revue Nature et Technologie.*, 1: 33-44
- Michel Valérie, Hauwuy Agnès, Chamba J-F**, 2001. La flore microbienne de laits crus de vache : diversité et influence des conditions de production. *Lait.*, 81: 575-592
- Millette M, Dupont C, Archambault D, Lacroix M.**, 2007. Partial characterization of bacteriocins produced by human *Lactococcus lactis* and *Pediococcus acidilactici* isolates. *Journal of Applied Microbiology.*, 102(1): 274-282
- Milliere J.B., Mathot A-G, Schmitt P., Divies C.**, 1989. Phenotypic characterization of *Leuconostoc* species. *Journal of Applied Bacteriology.*, 67: 529-542
- Moëller,V.** 1955. Simplified tests of some amino acid decarboxylases and for the arginine dihydrolase system. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.*, 36: 158-172
- Molinos A. C., López R. L., Abriouel H., Omar N. B., Valdivia E., Gálvez, A.**, 2009. Inhibition of *Salmonella enterica* cells in Deli-Type salad by enterocin AS-48 in combination with other antimicrobials. *Probiotics and Antimicrobial Proteins.*,1(1): 85-90

Moll G.N., Konings W.N., Driessen A.J.M., 1999. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie Van Leeuwenhoek.*, 76: 185-198

Montville T.J., Winkowski K., Ludescher R.D., 1995. Models and mechanisms for bacteriocin action and application. *International Dairy Journal.*, 5: 797-814

Morisset D., Berjeaud J-M., Frère J., Héchard Y., 2005. Bactériocines de bactéries lactiques **In** Bactéries lactiques et probiotiques. Luquet F-M, Corrieu G. *Tec & Doc*, Lavoisier, pp: 113-194

N

Nes I.F., Diep D.B., Havarstein L.S., Brurberg M.B., Eijsink V., Holo H., 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.*, 70: 113-128

Nilsen T., Nes I.F., Holo H., 2003. Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG2333. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(5): 2975-2984

Nigmatova K., Morovsky M., Pristas P., Teather R.M., Holo H., Javorsky P., 2007. Production of enterolysin A by rumen *Enterococcus faecalis* strain and occurrence of enlA homologues among ruminal Gram-positive cocci. *J. Appl. Microbiol.*, 102(2): 563-569

Noonpakdee W., Santivarangkna C., Jumriangrit P., Sonomoto K., Panyim S., 2003. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from nham, a traditional Thai fermented sausage. *Int. J. F. Microbiol.*, 81(2): 137-145

Novel G., 1993. Les bactéries lactiques **In** Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel. Leveau J-Y., Bouix M. *Tec & Doc*, Lavoisier, pp : 170-374

O

Ogier J.-C., Casalta E., Farrokh C., Saihi A., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Leuconostoc* genus. *Int J Food Microbiology.*, 126: 286-290

Olaoye O.A., Onilude A.A., 2009. Isolation and Biochemical Profiles of Numerous Strains of Lactic Acid Producing Bacteria from Various Parts of a Domestic West African Goat (*Capra Hircus*). *Australian Journal of Basic and Applied Sciences.*, 3(2): 460-466

Orberg Paulo K., Sandine William E., 1984. Common Occurrence of Plasmid DNA and Vancomycin Resistance in *Leuconostoc* spp, *J. Appl. Environ. Microbiol.*, 48: 1129-1133

Orla-Jensen S., 1919. The Lactic Acid Bacteria. Dairy Bacteriology, Fred Host and Son, Copenhagen

P

- Papagiannin M.**, 2003. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function and applications. *Biotechnol. Adv.*, 21(6): 465-499
- Paul D. Cotter, Colin Hill, Paul Ross R.**, 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology.*, 3: 777-788
- Pellerin P.**, 2001. Mise au point Intérêt nutritionnel de lait de chèvre Connaissances actuelles et perspectives. *Ann Pharm Fr.* 59: 51-62
- Penaud Stéphanie**, 2006. Analyse de la séquence génomique et étude de l'adaptation à l'acidité de *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ATCC11842. Thèse de Doctorat en Agronomie, Institut National Agronomique de Paris-Grignon
- Piard J.C., Desmazeaud M.**, 1992. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria.2. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait* ., 72: 113-142
- Pilet M-F., Magras Catherine et Michel Federighi**, 2005. Bactéries lactiques In Bactériologie alimentaire "compendium d'hygiène des aliments". Federighi M. *Economica*, pp: 219-242
- Ponce A.G., Moreira M.R., del Valle C.E., Roura S.I.**, 2008. Preliminary characterization of bacteriocin-like substances from lactic acid bacteria isolated from organic leafy vegetables. *LWT.*, 41: 432-441
- Pougheon Sandra, Goursaud Jean**, 2001. Le lait: caractéristiques physicochimiques In Lait, nutrition et santé. Debry G. *Tec & Doc*, Lavoisier, pp: 3-42
- Prescott L. M., Harley J. P., Klein D. A.**, 1999. Microbiology, 4th edn. New York: WCB/McGraw-Hill.

R

- Richard C., Canon R., Naghmouchi K., Bertrand D., Prévost H., Drider D.**, 2006. Evidence on correlation between number of disulfide bridge and toxicity of class IIa bacteriocins. *Food Microbiol.*, 23(2): 175-183
- Riley M.A., Wertz J.E.**, 2002. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu. Rev. Microbiol.*, 56: 117-137
- Rink R., Kuipers A., Boef E., Leenhouts K., Driessen A., Moll G.N.**, 2005. Lantibiotic Structures as Guidelines for the Design of Peptides That Can Be Modified by Lantibiotic Enzymes. *Biochemistry.*, 44 (24): 8873-8882

- Saidi N., Guessas B., Bensalah F., Badis A., Hadadji M., Henni D.E, Prevost H. et Kihal M.**, 2002. Caractérisation des Bactéries Lactiques Isolées du Lait Cru de Chèvre des Régions Arides d'Algérie. *Journal Algérien des Régions Arides.*, 01: 01-14
- Salminen S., Isolauri E., Salminen E.**, 1996. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: succesful strains and future challenges. *Anatomie Leeuwenhoek.*, 70: 347-358
- Salminen S., Gorbach S., Yuan-Kun L., Benno Y.**, 2004. Human studies on probiotics: What is scientifically proven today? **In** Lactic Acid bacteria : Microbiological and functional Aspects.Eds salimen S., von Wright A., Ouwerhand A., *New york Dekker M.* pp: 515-530
- Samelis J., Maurogenakis F. et Metaxopoulos J.**, 1994. Characterization of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami, *Inter. J. Food. Microbiol.*, 23: 179-196
- Sandine W.E., Radich P.C., Elliker P.R.**, 1972. Ecology of the lactic streptococci. A review. *J. Milk Food. Techn.*, 35: 176-185
- Savado Aly, Ouattara Cheik A.T., Bassole Imael H. N., Traore S. Alfred**, 2006. Bacteriocins and lactic acid bacteria-a minireview. *African Journal of Biotechnology.*, 5 (9): 678-683
- Schillinger U., Lücke F-K.**, 1987. Identification of lactobacilli from meat and meat products. *Food Microbiology.*, 4: 199-208
- Schillinger U., Lücke F-K.**, 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ . Microbiol.*, 55: 1901-1906
- Schleifer K.H., Stackebrandt E.**, 1983. Molecular systematics of procaryotes. *Annu. Rev. Microbiol.*, 37: 143-187.
- Schleifer K.H., Kraus J., Dvorak C., Kilpper-Bälz R., Collins M.D., Fischer W.**, 1985. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Syst. Appl. Microbial.*, 6: 183-195
- Schleifer K.H. et Kilpper-Bälz R.**, 1987. Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of Streptococci, Enterococci and Lactococci: a review. *Syst. Appl. Microbiol.*, 10: 1-19
- Sharpe M.E.**, 1981. The genus *Lactobacillus* **In** The Procaryotes. A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria. Starr M.P., Stolp H., Truper H.G., Balows A., Schlegel H.G., Springer-Verlag (Eds) Berlin, 1653-1674
- Sherman J.M.**, 1937. The streptococci. *Bacterial. Rev.*, 1: 3 -97

- Sondergaard A.K.**, 2005. Application of probiotics in food. **In** Bacteries lactiques et probiotiques. Luquet Francois-Marie, Corrieu Georges. *Tec & Doc*, Lavoisier, pp: 195-209
- Sneath P.H.A.**, 2001. The Archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria - Bacterial Nomenclature. **In** Bergey's manual of systematic bacteriology. Garrity G.M., Boone D.R., Castenholz R.W. 2^e Ed., 721: 83-88
- Stiles Michael E., Holzapfel Wilhelm H.**, 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Inter. J. Food Microbiol.*, 36: 1-29
- Suma K., Misra M.C., Varadaraj M.C.**, 1998. Plantaricin LP84, a broad spectrum heat-stable bacteriocin of *Lactobacillus plantarum* NCIM 2084 produced in a simple glucose broth medium. *Int. J. Food Microbiol.*, 40: 17-25
- Swenson J. M., Facklam R. R., Thornsberry C.**, 1990. Antimicrobial Susceptibility of Vancomycin-Resistant *Leuconostoc*, *Pediococcus*, and *Lactobacillus* Species, *Antimicrobial Agents And Chemotherapy.*, 34: 543-549

T

- Tabak S., Medouakh L., Adda M., Chekroun A., Krantar K., Bensoltane A.**, 2007. Interaction between *Helicobacter pylori* responsible for diseases gastro-duodenal and Bifidobacteria. *Egypt. J. App. Sci.*, 22: 72-83
- Tabasco R., Rarup T., Janer C., Pelaez C., Requena T.**, 2007. Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp *paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk. *Dairy Journal.*, 23: 250-255
- Tagg J.R., Dajani A.S., Wannamaker L.W.**, 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 40: 722-756
- Tailliez Patrick**, 2001. Mini-revue : les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y a près de 3 milliards d'années. *Lait.*, 81: 1-11
- Terzaghi, B.E., Sandine, W.E.**, 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages, *Appl. Environ. Microbiol.*, 29: 807-813
- Teuber Michael, Geis Arnold**, 2006. The Genus *Lactococcus*. *Prokaryotes* 4: 205-228
- Twomey D., Ryan M., Meaney B., Hill C.**, 2002. Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82: 165-185

V

- Van Belkum M.J., Hayema B.J., Geis A., Kok J., Venema G.,** 1991. Organization and nucleotide sequences of two lactococcal bacteriocin operons. *Appl Environ Microbiol* 57: 492-498
- Van Tieghem P.E.L.,** 1878. Sur la gomme de sucrerie. *Ann. Sei. Nat. Bot.*, 6: 180-202
- Vaughan E.E., Caplice E., Looney R., O'Rourke N., Coveney H., Daly C., Fitzgerald G.F.,** 1994. Isolation from food sources, of lactic acid bacteria that produced antimicrobials. *Journal of Applied Bacteriology.*, 75: 118-123
- Vignolo G., Palacios J., Farias M., Sesma F., Schillinger U., Holzapfel W., Oliver G.,** 2000. Combined effect of bacteriocins on the survival of various *Listeria* species in broth and meat system. *Curr. Microbiol.*, 41: 410-416
- Vollenweider S.,** 2004. 3-hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biotech.*, 64: 16-27

W

- Wheater M.D., Hirsch H., Mattick A.T.R.,** 1951. Possible identity of « lactobacilline » with hydrogen peroxide produced by Lactobacilli. *Nature.*, 170: 623
- Whitehead H.R., Riddet W.,** 1933. Slow development of acidity in cheese manufacture. Investigation of a typical case of “non-acid” milk. *N Z J Agric.*, 46: 225-229

Z

- Zadi Karam H., Karam N-E.,** 2006. Bactéries lactiques du lait de chamelle d'Algérie: mise en évidence de souches de *Lactococcus* résistantes au sel. *Tropicultura.*, 24(3): 153-156
- Zalan Z., Barath A., Halasz A.,** 2005. Influence of growth medium on hydrogen peroxide and bacteriocin production of *Lactobacillus* strains. *Food Technol. Biotech.*, 43(3): 219-225
- Zourari A., Roger S., Chabanet C., Desmazeaud M.,** 1991. Caractérisation de bactéries lactiques thermophiles isolées de yaourts artisanaux grecs. Souches de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. *Lait.*, 71:445

W

Wheater M.D., Hirsch H., Mattick A.T.R., 1951. Possible identity of « lactobacilline » with hydrogen peroxide produced by Lactobacilli. *Nature.*, 170: 623

Whitehead H.R., Riddet W., 1933. Slow development of acidity in cheese manufacture. Investigation of a typical case of “non-acid” milk. *N Z J Agric.*, 46: 225-229

Z

Zadi Karam H., Karam N-E., 2006. Bactéries lactiques du lait de chamelle d’Algérie: mise en évidence de souches de *Lactococcus* résistantes au sel. *Tropicultura.*, 24(3): 153-156

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

Zourari A., Roger S., Chabanet C., Desmazeaud M., 1991. Caractérisation de bactéries lactiques thermophiles isolées de yaourts artisanaux grecs. Souches de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. *Lait.*, 71:445-461

Annexes

Milieux de cultures :

Milieu MRS (Man, Rogosa et Sharpe, 1960)

Peptone	10 g
Extrait de viande	8 g
Extrait de levure	5 g
Acétate de sodium	5 g
Phosphate bipotassique	2 g
Citrate d'ammonium	2 g
Sulfate de magnésium	0.1 g
Sulfate de manganèse	0,05g
Glucose	20 g
Tween 80	1ml
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

Pour les lactobacilles ajuster le pH à 5,4 avec l'acide acétique. Autoclaver 20min à 120°C

Milieu M17 (Terzaghi et Sandine, 1975)

Peptone papainique de soja	5g
Peptone tryptique de caséine	2,5 g
Peptone pepsique de viande	2,5 g
Extrait de levure	2.5 g
Extrait de viande	5 g
Glycérophosphate de sodium	19 g
Sulfate de magnésium	0.25 g
Acide ascorbique	0.5 g
Agar	15g
Eau distillée	950ml

pH 7,1 ± 0.2

50 ml de lactose à 10 % sont ajouté après autoclavage 20min à 120°C

Milieu d'Elliker (Elliker, 1956)

Bactotryptone	20g
Extrait de levure	5g

Gélatine	2.5g
Lactose	5g
Saccharose	5g
Glucose	5g
Acétate de sodium	1.5g
Chlorure de sodium	4g
Acide ascorbique	0.5g
Gélose	20g
Eau distillée	1000 ml

pH 6,5

Autoclavage 20min à 120°C

Milieu Mayeux, Sandine et Elliker – MSE

Tryptone	10 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 bactériologique	15 g
Eau distillée	1000 ml

pH du milieu prêt à l'emploi : 6.9 ± 0.2

Bouillon hypersalé : (Leveau *et al.*, 1991).

Glucose	5g
Extrait de viande	5g
Peptone	15g
NaCl	65g
Eau distillée	1000ml

pH 7,5

Stérilisation 20 min à 120°C , on peut évidemment faire varier la concentration en NaCl de 4%

Milieu de Moëller (Moëller, 1955) :

Peptone	5g
Extrait de viande	5g
Glucose	0,5g
Pridaxal	5mg
Pourpe de bromocrésol	0,1g
Rouge de crésol	5mg
Eau distillée	1000ml

Ajuster le pH à 6,4

Le milieu à l'arginine est obtenu en ajoutant 10g d'arginine. Stériliser 15 min à 120°C.

Milieu gélose esculine :

peptone	10g
Esculine	1g
Citrate de fer ammoniacal	1g
gélose	20g
Eau distillée	1000ml

pH 7, Stérilisation 20 min à 120°C

Milieu Clark et Lubs

Peptone	7g
Phosphate dipotassique	5g
Glucose	5g
Eau distillée	1000ml

pH 7, autoclaver 20 min à 120°C

Milieu Kempler et Mc Kay (1980)

Peptone	10g
Extrait de levure	3g
Glucose	5g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

pH du milieu prêt à l'emploi : 6,6

Le milieu est réparti à raison de 100 ml par flacon, puis autoclavé 15min à 121°C

Au moment de l'emploi on ajoute :

1 ml d'une solution aqueuse de ferricyanide de potassium 10 % (p/v)

1 ml d'une solution aqueuse à 2.5 % (p/v) de citrate ferrique et citrate de sodium (p/p)

Ces solutions sont stérilisées par filtration sur filtre millipore et sont conservées à l'obscurité à 4°C

Milieu de dilution (peptone-sel) :

NaCl	8,5g
Peptone	1g
Eau distillée	1000 ml

Autoclavage durant 15 min à 121°C.

Gélose nutritif (GN) :

Peptone	5g
Extrait de viande	1g
Extrait de levure	2g
NaCl	5g
Agar	15g
Eau distillée	1000 ml
pH 7	

Autoclavage durant 15 min à 121°C.

Milieu lait écrémé :

Lait écrémé	10g
Eau distillée	100 ml

La stérilisation à 110°C pd 10 min

MRS tamponnée à pH 6,1 :

Milieu MRS (Man, Rogosa et Sharpe, 1960)

+

Tampon phosphate :

Phosphate monopotassique	54 g/l
Phosphate disodique	17,8 g/l

Autoclaver 20min à 120°C