

## *Abréviations*

|   |  |
|---|--|
| °C : degré Celsius.                                       | <b>LDH:</b> le lactate déshydrogénase                                  |
| °D : degré dornic   | <b>LMA:</b> Laboratoire de Microbiologie Appliquée (Université d'Oran) |
| <b>µg:</b> microgrammes                                   | <b>Mal:</b> Maltose  |
| <b>ADH:</b> arginine dihydrolase.                         | <b>Man:</b> Mannitol   |
| <b>ADN:</b> acide désoxyribonucléique.                    | <b>Mb:</b> Méga base.  |
| <b>ADNr /ARNr :</b> ADN ou ARN ribosomal.                 | <b>Mél:</b> Melibiose  |
| <b>Ara:</b> Arabinose                                     | <b>mg:</b> milligramme.  |
| <b>ARN :</b> Acide Ribonucléique                          | <b>min:</b> minute   |
| <b>ATCC:</b> American Type Culture Collection.            | <b>MRS 5, 4:</b> milieu MRS à pH 5,4                                   |
| <b>B:</b> <i>Bacillus</i> .                               | <b>MRS:</b> Milieu de Man, Rogosa and Sharpe(1960)                     |
| <b>Cel:</b> Cellobiose                                    | <b>MRS-BCP:</b> Milieu MRS additionné de Pourpre de Bromocrésol.       |
| <b>CO<sub>2</sub> :</b> Dioxyde de carbone                | <b>mM:</b> milli-molaire   |
| <b>Do:</b> densité optique.                               | <b>nm:</b> nanomètre.  |
| <b>Fru:</b> Fructose                                      | <b>Nip+:</b> produit la nisine   |
| <b>G+C:</b> le ratio guanine + cytosine.                  | <b>pH:</b> potentiel d'hydrogène                                       |
| <b>Gal:</b> Galactose                                     | <b>PM:</b> poids moléculaire   |
| <b>h:</b> heure   | <b>Raf:</b> Raffinose  |
| <b>KDa:</b> Kilodalton                                    | <b>Rib:</b> Ribose   |
| <b>Kpb:</b> Kilo paire de base                            | <b><i>S. aureus</i> :</b> <i>Staphylococcus aureus</i>                 |
| <b>L :</b> <i>Listeria</i> .                              | <b>Sac:</b> Saccharose   |
| <b>Lac:</b> Lactose                                       | <b>Subsp. :</b> sous-espèce  |
| <b>Lb:</b> <i>Lactobacillus</i>                           | <b>ufc :</b> unité formant colonie                                     |
| <b>LbG:</b> <i>Lactobacillus</i> isolée du lait de chèvre |  |

## Table des matières

|  |           |
|--|-----------|
| Liste des tableaux .....   |           |
| Liste des figures.....   |           |
| Abreviations.....  |           |
| <b>Introduction</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b>  |           |
| <b>1. Le lait de chèvre :</b> .....  | <b>3</b>  |
| 1.1 Définition générale du lait : .....  | 3         |
| 1.2 Les différents composants du lait : .....                                      | 4         |
| 1.2.1 L'eau : .....  | 4         |
| 1.2.2 Les glucides : .....   | 4         |
| 1.2.3 Les protéines : .....  | 4         |
| 1.2.4 Les Lipides : .....  | 5         |
| 1.2.5 Les minéraux : .....   | 5         |
| 1.2.6 Les Vitamines : .....  | 6         |
| 1.2.7 Les nucléotides: .....   | 6         |
| 1.3 La microflore du lait: .....   | 7         |
| <b>2. Les races caprines Algériennes:</b> .....                                    | <b>8</b>  |
| <b>3. Les souches lactiques des différentes races de chèvre:</b> .....             | <b>10</b> |
| <b>4. L'intérêt du lait de chèvre:</b> .....                                       | <b>10</b> |
| <b>5. Les anomalies de la qualité du lait de chèvre :</b> .....                    | <b>11</b> |
| <b>6. Les bactéries lactiques :</b> .....  | <b>12</b> |
| 6.1 Définition : .....   | 12        |
| 6.2 Propriétés générales : .....   | 12        |
| 6.3 Origine des bactéries lactiques : .....  | 13        |
| 6.4 Génétique des bactéries lactiques .....  | 14        |
| 6.5 Classification des bactéries lactiques : .....                                 | 14        |
| 6.5.1 Classification classique : .....   | 14        |
| a) Les caractères morphologiques : .....   | 15        |
| b) Les caractères physiologiques et biochimiques : .....                           | 15        |
| c) Les caractères immunologiques : .....   | 15        |
| d) Les caractères structuraux : .....  | 16        |
| <b>7. Exigences nutritionnelles des bactéries lactiques :</b> .....                | <b>16</b> |
| 7.1 Exigence en vitamines : .....  | 16        |
| 7.2 Exigences en sources azotées : .....   | 16        |
| 7.3 Influence des cations: .....   | 16        |
| <b>8. L'intérêt des bactéries lactiques:</b> .....                                 | <b>17</b> |
| 8.1 L'aspect Médical: les probiotique: .....                                       | 17        |
| 8.2 L'aspect technologique : les levains .....                                     | 18        |
| <b>9. Critères de sélection de souches pour l'élaboration des ferments :</b> ..... | <b>22</b> |
| 9.1 Activité acidifiante : .....   | 22        |
| 9.2 Activité protéolytique : .....   | 22        |
| 9.3 Pouvoir aromatisant et pouvoir gazeux : .....                                  | 23        |
| 9.4 Résistance aux bactériophages : .....  | 23        |
| 9.5 Activité bactériostatique : production de bactériocines : .....                | 23        |
| 9.6 Résistance aux antibiotiques : .....   | 23        |
| <b>10. Les lactobacilles :</b> .....   | <b>24</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Caractéristiques générales :</b>  | <b>24</b> |
| 10.1 Sous genre <i>Lactobacillus</i> homofermentaires : <i>Streptobacterium</i>  | 24        |
| 10.2 Sous genre <i>Lactobacillus</i> hétérofermentaires : <i>Betabacterium</i> . | 24        |
| 10.3 Sous genre lactobacilles obligatoirement homofermentaires :                 | 25        |
| <b>11. Utilisation des lactobacilles en industrie laitière :</b>                 | <b>27</b> |
| <b>12. Composés antimicrobiens produits par les bactéries lactiques :</b>        | <b>28</b> |
| 12.1 Acides organiques :   | 29        |
| 12.2 Acides gras :   | 31        |
| 12.3 Peroxyde d'hydrogène :  | 31        |
| 12.4 Dioxyde de carbone (CO <sub>2</sub> ) :                                     | 32        |
| 12.5 Composants aromatiques :  | 33        |
| 12.5.1 Diacétyle :   | 33        |
| 12.5.2 Acétaldéhyde  | 33        |
| 12.5.3 Reutéline :   | 34        |
| <b>13. Les interactions entre les souches de bactéries lactiques :</b>           | <b>34</b> |
| 13.1 Les phénomènes d'antagonisme :  | 35        |
| 13.2 Les phénomènes de stimulation :   | 36        |
| <b>14. Les causes de la contamination du lait :</b>                              | <b>37</b> |
| <b>15. Présentation des souches pathogènes</b>                                   | <b>38</b> |
| 15.1 <i>Staphylococcus aureus</i> :  | 38        |
| 15.2 <i>Escherichia coli</i> :   | 39        |
| 15.3 <i>Salmonella</i> :   | 40        |
| 15.4 <i>Bacillus</i> :   | 41        |
| <b>16. Propriétés inhibitrices des bactéries lactiques :</b>                     | <b>42</b> |
| 16.1 Choix de microorganismes :  | 42        |
| 16.1.1 Résistance aux conditions rencontrées au cours du transit digestif :      | 42        |
| 16.1.2 Colonisation du tractus digestif et adhésion aux cellules intestinales :  | 42        |
| 16.2 Activités antimicrobiennes :  | 43        |
| 16.3 Viabilité et stabilité des microorganismes :                                | 43        |
| <b>17. Définition des interactions :</b>   | <b>43</b> |
| 17.1 Les acides organiques :   | 44        |
| 17.2 Le peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) :                  | 46        |
| 17.3 Le dioxyde de carbone (CO <sub>2</sub> ) :                                  | 46        |
| 17.4 Le diacétyl (C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> ) :               | 47        |
| 17.5 La reutéline :  | 47        |
| <b>18. Bactériocines :</b>   | <b>47</b> |
| 18.1 Classification des bactériocines  | 48        |
| 18.2 Bactériocines de <i>Lactobacillus plantarum</i> :                           | 50        |
| 18.3 Mode d'action des bactériocines   | 50        |
| 18.3.1 Les lantibiotiques :  | 50        |
| 18.3.2 Les bactériocines de classe II :  | 51        |
| 18.3.3 Les bactériocines de classe III   | 51        |
| <b>19. Biopréservation des produits laitiers :</b>                               | <b>53</b> |
| <b>20. Model type de bacteriocine : La nisine</b>                                | <b>54</b> |
| <b>21. Possibilité d'utilisation dans les produits laitiers :</b>                | <b>58</b> |

## MATERIELS ET METHODES

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Provenances des échantillons :</b>   | <b>59</b> |
| <b>2. Provenance des bactéries pathogènes :</b>  | <b>59</b> |
| <b>3. Isolement des bactéries lactiques:</b>   | <b>59</b> |
| 3.1 Préparation des suspensions de dilution  | 60        |
| 3.2 Purification des isolats de bactéries lactiques  | 60        |
| 3.3 Conservation des isolats   | 60        |
| 3.3.1 La conservation à court terme :  | 60        |
| 3.3.2 La conservation à long terme :   | 60        |
| <b>4. Tests d'orientation pour l'identification des bactéries lactiques :</b>  | <b>61</b> |
| - De la mobilité, du test de catalase et du type fermentaire.  | 61        |
| 4.1 Identification des souches de bactéries lactiques :  | 61        |
| 4.1.1 Étude macroscopique :  | 61        |
| 4.1.2 Étude microscopique:   | 61        |
| 4.1.3 Coloration de Gram :   | 62        |
| 4.2 Critères physiologiques  | 62        |
| 4.2.1 Test du NaCl et du pH :  | 62        |
| 4.2.2 Test des températures de croissance et de thermorésistance :   | 62        |
| 4.3 Critères biochimiques  | 62        |
| 4.3.1 Test de la catalase :  | 62        |
| 4.3.2 Etude du métabolisme azoté (recherche de l'arginine déshydrogénase (ADH)) :  | 63        |
| 4.4 Etude du profil fermentaires :   | 63        |
| 4.5 Identification de l'espèce par galerie API 50 CHL:   | 65        |
| 4.6 Caractérisation technologique :  | 66        |
| 4.6.1 Etude de la thermorésistance :   | 66        |
| 4.6.2 Production des composés aromatiques :  | 66        |
| 4.6.3 Production de dextrane :   | 66        |
| 4.6.4 Utilisation du citrate en présence de sucre fermentescible (glucose):  | 66        |
| 4.6.5 Etude de l'activité protéolytique :  | 66        |
| <b>5. Mise en évidence des inhibitions inter bactériennes :</b>  | <b>67</b> |
| 5.1 La méthode directe :   | 67        |
| 5.2 La méthode indirecte :   | 67        |
| <b>6. Mise en évidence de la nature de l'agent inhibiteur :</b>  | <b>67</b> |
| 6.1 Inhibition due à la production d'acides organiques:  | 68        |
| 6.2 Inhibition due au peroxyde d'hydrogène:  | 68        |
| 6.3 Recherche de substances inhibitrices de nature protéique:  | 68        |
| 6.4 Recherche de phages lysogènes  | 69        |
| <b>7. Dosage de l'acidité dornic:</b>  | <b>69</b> |
| <b>8. L'étude du l'effet du pH sur l'évolution de la croissance et d'acidité de <i>Lactobacillus plantarum</i> (Lb.58 et Lb.68):</b> | <b>70</b> |
| <b>9. Mesure de la croissance :</b>  | <b>70</b> |
| <b>10. L'étude du l'évolution de la croissance et d'acidité des deux souches au dépend du sucre et l'acide aminé du milieu:</b>      | <b>73</b> |
| <b>11. La détermination de la sensibilité aux antibiotiques:</b>   | <b>73</b> |
| <b>12. Effet de l'extrait brut de <i>Lb. plantarum</i> (Lb.58) sur la croissance de <i>S. aureus</i> :</b>                           | <b>75</b> |
| <b>RESULTATS ET DISCUSIONS</b>   |           |
| <b>1. Dénombrement et isolement des bactéries lactiques du lait cru de chèvre :</b>  | <b>76</b> |
| <b>2. Recherche des souches lactiques productrices de substances antimicrobiennes:</b>   | <b>76</b> |
| <b>3. Résultats de l'identification des isolats :</b>  | <b>77</b> |

|            |   |            |
|------------|---|------------|
| 3.1        | Le type fermentaire: _____  | 79         |
| 3.2        | Le test de l'ADH : _____  | 79         |
| 3.3        | Croissance à 15 et 45°C et la thermorésistance : _____  | 80         |
| 3.4        | Profil fermentaire : _____  | 80         |
| <b>4.</b>  | <b>La mise en évidence d'interaction entre bactéries lactiques en milieu tamponné :</b> _____   | <b>83</b>  |
| 4.1        | Production de substance antimicrobienne : _____   | 83         |
| 4.2        | Inhibitions entre les bactéries lactiques : _____   | 84         |
| <b>5.</b>  | <b>Recherche de la nature de l'agent inhibiteur :</b> _____   | <b>84</b>  |
| 5.1        | Effet de la production d'acides : _____   | 85         |
| 5.2        | Production de peroxyde d'hydrogène : _____  | 86         |
| 5.3        | La production de phage lysogène: _____  | 87         |
| 5.4        | L'effet des enzymes protéolytiques sur la substance inhibitrice: _____  | 88         |
| <b>6.</b>  | <b>Identification par galerie API 50 CHL :</b> _____  | <b>91</b>  |
| <b>7.</b>  | <b>Les souches tests :</b> _____  | <b>94</b>  |
| <b>8.</b>  | <b>Apptitudes technologiques des souches :</b> _____  | <b>95</b>  |
| <b>9.</b>  | <b>L'action des lactobacilles sur la croissance de <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Bacillus sp.</i> et <i>E. coli</i> sur milieu solide non tamponnée et tamponnée :</b> _____     | <b>96</b>  |
| <b>10.</b> | <b>Interactions bactériennes :</b> _____  | <b>98</b>  |
| 10.1       | L'antagonisme bactérien des souches <i>Lactobacillus plantarum</i> (Lb.58, Lb.68) : _____   | 98         |
| 10.1.1     | Inhibition des souches <i>Staphylococcus aureus</i> : _____   | 98         |
| a)         | Inhibition de la souche <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 par les souches <i>Lactobacillus plantarum</i> (Lb.58 et Lb.68): _____  | 98         |
| b)         | Inhibition de la souche <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 par les souches <i>Lactobacillus plantarum</i> (58 et 68): _____  | 99         |
| c)         | Inhibition de la souche <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300 par les souches <i>Lactobacillus plantarum</i> (Lb.58 et Lb.68): _____  | 99         |
| 10.1.2     | Inhibition de la souche <i>Listeria ivanovii</i> ATCC 19119 : _____   | 99         |
| 10.1.3     | Inhibition de la souche <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922: _____   | 100        |
| 10.1.4     | Inhibition de la souche <i>Klebsiella pneumoniae</i> : _____  | 100        |
| 10.1.5     | Inhibition de la souche <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> : _____  | 100        |
| 10.1.6     | Inhibition de la souche <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : _____   | 100        |
| 10.1.7     | Inhibition de la souche <i>Salmonella enterica</i> : _____  | 101        |
| 10.1.8     | Inhibition de la souche <i>Bacillus sp.</i> : _____   | 101        |
| 10.1.9     | Inhibition de la souche <i>Lactobacillus plantarum</i> Lb.58: _____   | 101        |
| 10.1.10    | Inhibition de la souche <i>Lactobacillus plantarum</i> Lb.68: _____   | 101        |
| <b>11.</b> | <b>Cinétique d'évolution de l'acidité (pH et D°) et Etude du pouvoir coagulant du lait écrémé de <i>Lactobacillus plantarum</i> a différentes températures d'incubation :</b> _____ | <b>101</b> |
| <b>12.</b> | <b>Cinétique de croissance dans le milieu MRS à différentes températures d'incubation:</b> _____  | <b>105</b> |
| <b>13.</b> | <b>Résultats de la cinétique de croissance de <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) en culture pure et mixte à 37°C :</b> _____   | <b>116</b> |
| <b>14.</b> | <b>Effet de l'extrait brut de <i>Lactobacillus plantarum</i> sur la croissance de <i>Staphylococcus aureus</i> :</b> _____  | <b>118</b> |
| <b>15.</b> | <b>Détermination des profils de sensibilité aux antibiotiques des lactobacilles étudiés :</b> _____   | <b>120</b> |
|            | <b>Discussion générale</b> _____  | <b>123</b> |
|            | <b>Conclusion Générale</b> _____  | <b>131</b> |
|            | <b>Bibliographie</b> _____  | <b>133</b> |
|            | <b>Annexe</b> _____   | <b>161</b> |

## INTRODUCTION

En Algérie il y a une spécialisation des zones agroécologiques en matière d'élevage. L'élevage bovin reste cantonné dans le Nord du pays avec quelques incursions dans les autres régions. Les parcours steppiques sont le domaine de prédilection de l'élevage ovin et caprin avec plus de 24 millions de têtes qui y vivent entraînant une surexploitation de ces pâturages. Les ovins prédominent et représentent 80 % de l'effectif global (19,3 millions de têtes) avec plus de 10 millions de brebis. L'élevage caprin vient en seconde position (4,7 millions de têtes) (14 %) comprenant 50 % de chèvres. Il se trouve concentré essentiellement dans les zones montagneuses, les hauts plateaux et les régions arides (Badis, 2004; Badis *et al.*, 2004a; Badis *et al.*, 2004b; Badis *et al.*, 2006 et Guessas, 2007).

La recherche sur les bactéries lactiques, qui ont un rôle dominant dans la production de beaucoup de produits laitier fermentés, a continué à avancer à une vitesse très impressionnante vers la fin du 20<sup>ème</sup> siècle, la capacité de manipuler et de contrôler ces microorganismes a atteint maintenant un niveau considérable (Caplice et Fitzgerald., 1999).

Depuis l'époque de Louis Pasteur et Robert Koch, il y a eu un besoin essentiel d'identification scientifique pour contrôler les micro-organismes 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; Bolotin *et al.*, 2001; Bourel *et al.*, 2001; Axelsson, 2004; Marroki *et al.*, 2010 et Djadouni et Kihal., 2012). 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.

La caractérisation des BL a favorisée le développement de souches bactériennes définies, connues sous le nom de levains ou de culture starter. Elles remplacent de plus en plus les

mélanges non définis traditionnellement employées en industrie laitière (Crow *et al.*, 1993; Desmazeaud et Cogan., 1996 et Fitzsimmons *et al.*, 1999).

Les ferments lactiques jouent un rôle technologique fondamental en transformation laitière et la recherche de nouvelles souches possédant des activités biologiques particulières sont en pleine expansion dans le secteur de l'industrie laitière (Bredholt *et al.*, 2001; Brillet *et al.*, 2005; Drici *et al.*, 2009 et Boumahira *et al.*, 2011).

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 Lücke, 1989; Budde *et al.*, 2003; Jacobsen *et al.*, 2003; Vermeiren *et al.*, 2004; Guessas, 2007 et Saidi, 2007 ).

A l'intérieur d'équipes de recherche structurées et multidisciplinaires, les chercheurs s'intéressent particulièrement à la production de bactériocine, agents antimicrobiens naturels, et de polysaccharides exo-cellulaires par les bactéries lactiques. Ces derniers travaillent sur l'isolement et la caractérisation génétique et moléculaire des souches sur la production de bio-ingrédients alimentaires par fermentation de milieux laitiers et sur l'exploitation des souches en transformation laitière (Deegan *et al.*, 2006).

La production d'acides organiques et d'autres composés antimicrobiens, telles que les bactériocines, jouent un rôle majeur dans la conservation des produits laitiers fermentés et contribuent à l'inhibition des germes contaminants (Benhammouche, 2005; Guessas *et al.*, 2006 et Saidi, 2007).

Nous poursuivons les travaux de recherche déjà entamés par l'équipe du laboratoire de microbiologie appliquée du département de biologie faculté des sciences de l'université d'Oran. La recherche des bactéries lactiques productrices de substances antimicrobiennes isolées du lait cru de chèvre d'Algérie est un axe que nous avons choisi pour enrichir la collection du laboratoire LMA et pour comprendre les mécanismes d'action des ces bactéries bactériocinogènes en milieu artificiel du laboratoire et dans le milieu naturel le lait.

Notre objectif consiste à la recherche de nouvelles souches de bactéries lactiques du genre *Lactobacillus* capable de produire des substances antimicrobiennes à partir du lait cru de chèvre de la région ouest Algérien. L'intérêt de cette étude est donc l'isolement des souches de bactéries lactiques productrices de substances antimicrobiennes type bactériocine et de pouvoir identifier correctement l'agent et la substance active.

## 1. Le lait de chèvre :

Le lait de chèvre est blanc mât, due à l'absence de B-carotène. Contrairement au lait de vache, il a une odeur assez neutre. Parfois en fin de lactation, une odeur caprine apparait et après stockage au froid pour acquérir une saveur caractéristique (Goursaud, 1985).

- ❖ Sa composition chimique varie selon l'espèce, condition d'environnement, et stade de lactation (Kihal *et al.*, 1999).
- ❖ La composition chimique joue un rôle important sur son aptitude à l'acidification par les ferments lactiques et notamment l'influence des sels minéraux (Masle et Morgan, 2001).
- ❖ La densité du lait de chèvre est comparable à celle du lait de vache : avec une densité moyenne de 1031,05 à 15°C. Le point de congélation du lait de chèvre est environ 0,04 °C inférieur à celui de la vache (Bonassi *et al.*, 1998), le lait de chèvre présente une très grande conductivité électrique par rapport a celui de la vache.
- ❖ Le contenu en azote non protéique dans le lait de chèvre est plus élevé par rapport au lait de vache, le contenu des protéines coagulables et caséines est faible 70,9% comparé à 77,8% (Grappin *et al.*, 1981).
- ❖ Les caséines représentent la partie la plus importante des protéines du lait, elles constituent environ 70% des matières azotés coagulables et sont représentées sous forme de micelles (Corcy, 1991).
- ❖ Dans la majorité du lait de mammifères, le lactose représente la principale forme de glucides, qui sont présents sous forme de glycoprotéines et de glycolipides ayant des propriétés fonctionnelles spécifiques (Chakroun *et al.*, 1998).
- ❖ Le lait de chèvre est faible en éléments minéraux de (5 à 8 mg/100). Certains de ces éléments son important sur le plan technologique (calcium et phosphate de calcium) en particulier dans les phénomènes de coagulation, les équilibres salins, dans la stabilité du lait à la chaleur et dans l'aptitude à l'ultrafiltration (Le Men, 1985).

### 1.1 Définition générale du lait :

Le lait est un liquide physiologique complexe sécrété par les mammifères et destiné à l'alimentation du jeune animal naissant. L'origine de ses constituants est à la fois la synthèse réalisée au sein des cellules mammaires, à partir d'éléments sanguins tels que les acides gras et triglycérides, les protéines provenant d'acides aminés et le lactose provenant du glucose et de la filtration sélective de certains composants sanguins (sels minéraux). L'une des caractéristiques nutritionnelles majeures du lait est qu'il représente la source unique de nutriments qui doit satisfaire des besoins importants de croissance de l'organisme. L'intérêt provient de la qualité des ses protéines, de ses lipides et de ses vitamines, en particulier, sa



richesse en calcium. La composition du lait varie beaucoup d'une espèce à l'autre et reflète les besoins nutritionnels spécifiques de chaque espèce. Il existe, cependant ; des similitudes dans la composition des laits d'une même espèce (Mahé, 1996).

## 1.2 Les différents composants du lait :

La composition du lait varie d'une espèce animale à une autre le tableau 1 donne la composition chimique des différents mammifères.

**Tableau 1:** Composants de lait de différentes espèces (Alais, 1984 et Amiot *et al.*, 2002)

| Eléments en g/l         | Vache   | Chèvre | Brebis | Chamelle |
|-------------------------|---------|--------|--------|----------|
| Eau                     | 900-910 | 900    | 860    | 902      |
| Extrait sec total (EST) | 125-135 | 140    | 190    | 140      |
| Matières grasses        | 35-45   | 45-50  | 70-75  | 46       |
| Matières protéiques     | 30-36   | 35-40  | 55-60  | 36       |
| Caséines                | 27-30   | 30-35  | 45-50  | 28       |
| Protéines solubles      | 4-5     | 6-8    | 8-10   | 8        |
| Matières minérales      | 7.5-8.2 | 8-10   | 10-12  | 7.2      |
| Lactose                 | 40-50   | 40-45  | 45-50  | 50       |

### 1.2.1 L'eau :

Elle forme une solution vraie avec les glucides, les minéraux, une solution colloïdale avec les protéines hydrophiles, une suspension colloïdale avec les micelles de caséines et une émulsion avec les matières grasses. Le lait de chèvre est constitué de 87% d'eau (Amiot *et al.*, 2002).

### 1.2.2 Les glucides :

Le lactose est le glucide le plus important du lait, d'autres glucides peuvent provenir de l'hydrolyse du lactose (glucose, galactose). Certains glucides peuvent se combiner aux protéines, formant des glycoprotéines ou peuvent se trouver sous forme libre (Amiot *et al.*, 2002).

### 1.2.3 Les protéines :

On les classe en deux catégories, d'après leur solubilité dans l'eau :

- les caséines : ( $\alpha$ -S1B,  $\alpha$ -S2A,  $\beta$ -A2, K) qui sont en suspension colloïdale se regroupent sous forme de micelles.
- Les protéines de sérum : (bêta-lactoglobuline, alpha-lactalbumine) qui se retrouvent sous forme d'une solution colloïdale.

L'analyse de la composition en acide aminé des protéines du lait de chèvre faite par le chercheur Mahé en 1996, a révélé que la concentration d'Acide glutamique est la plus élevée (209 mg/g). En revanche celle de la Cystéine elle est de 9 mg/g.

**Tableau 2:** Composition en acides aminés des protéines du lait de chèvre (Mahé, 1996)

| Acides aminés    | Quantités mg/g |
|------------------|----------------|
| Histidine        | 26             |
| Isoleucine       | 48             |
| Leucine          | 96             |
| Lysine           | 80             |
| Méthionine       | 25             |
| Cystéine         | 09             |
| Phénylalanine    | 47             |
| Tyrosine         | 38             |
| Thréonine        | 49             |
| Tryptophane      | 49             |
| Valine           | 61             |
| Glycine          | 18             |
| Arginine         | 29             |
| Proline          | 106            |
| Acide aspartique | 75             |
| Acide glutamique | 209            |
| Alanine          | 34             |
| Sérine           | 49             |

#### 1.2.4 Les Lipides :

Les lipides du lait se composent principalement de triglycérides, de phospholipides et forment une émulsion.

Le lait de chèvre est pauvre en carotène et donc, peu coloré par rapport aux autres laits, il est plus riche en acides gras à 10 atomes de carbone et présente un pourcentage plus élevé de petits globules gras que le lait de vache, il ne contient pas d'agglutinines et présente une activité lipasique plus faible que le lait de vache (Chilliard, 1987).

**Tableau 3:** Composition en lipides des laits de différentes espèces (Chilliard, 1987).

| Composants (%)        | chèvre | vache | Humain |
|-----------------------|--------|-------|--------|
| Triglycérides         | 95     | 98    | 97     |
| Glycérides partielles | 3      | 0.5   | 1      |
| Cholestérol           | 0.4    | 0.3   | 0.6    |
| Phospholipides        | 1      | 0.9   | 1.1    |
| Acides gras libres    | 0.6    | 0.4   | 0.5    |

#### 1.2.5 Les minéraux :

Ils prennent la forme de sel, de base et d'acide mais les deux formes principales sont les sels ionisés solubles dans le sérum et les micelles. Les éléments basiques majeurs comme le calcium, le potassium, le magnésium et le sodium forment des sels avec les constituants acides que sont les protéines, les citrates, les phosphates et les chlorures, en outre le calcium, le magnésium, les citrates et les phosphates se trouvent sous forme colloïdale dans les micelles de caséines (Amiot *et al.*, 2002).

**Tableau 4:** Composition moyenne du lait en éléments minéraux majeurs de différentes espèces (Gueguen, 1996).

| Composants mg/l | Chèvre | humain | vache | brebis |
|-----------------|--------|--------|-------|--------|
| Calcium         | 1260   | 320    | 1200  | 1950   |
| Phosphore       | 970    | 150    | 920   | 1500   |
| Potassium       | 1900   | 550    | 1500  | 1400   |
| Sodium          | 380    | 200    | 450   | 460    |
| Chlore          | 1600   | 450    | 1100  | 1100   |
| Magnésium       | 130    | 40     | 110   | 180    |

**Tableau 5:** Composition moyenne du lait en principaux oligo-éléments indispensables aux différentes espèces (Gueguen, 1996).

| Composants µg/l | chèvre | humain | vache | brebis |
|-----------------|--------|--------|-------|--------|
| Zinc            | 3400   | 3000   | 3800  | 5000   |
| Fer             | 550    | 600    | 460   | 700    |
| Cuivre          | 300    | 360    | 220   | 400    |
| Manganèse       | 80     | 30     | 60    | 90     |
| Iode            | 80     | 80     | 70    | 100    |
| Sélénium        | 20     | 20     | 30    | 30     |

### 1.2.6 Les Vitamines :

Elles sont réparties en deux classes : les vitamines hydrosolubles et les vitamines liposolubles. En remarque que le lait de chèvre est pauvre en carotène et B9 acide folique (Amiot *et al.*, 2002).

**Tableau 6:** Composition vitaminique du lait de différentes espèces (Jaubert, 1996).

| Composants pour 100 g          | chèvre | vache | Humain |
|--------------------------------|--------|-------|--------|
| <b>Vitamines liposolubles</b>  |        |       |        |
| A rétinol mg                   | 0.040  | 0.035 | 0.060  |
| Carotène mg                    | 0      | 0.021 | 0.025  |
| Vit D µg                       | 0.06   | 0.08  | 0.055  |
| E tocophérol mg                | 0.04   | 0.11  | 0.23   |
| <b>Vitamines hydrosolubles</b> |        |       |        |
| B1 thiamine mg                 | 0.05   | 0.04  | 0.02   |
| B2 riboflavine mg              | 0.14   | 0.17  | 0.035  |
| B3 niacine mg                  | 0.27   | 0.09  | 0.16   |
| B5 acide pantothénique mg      | 0.31   | 0.34  | 0.18   |
| B6 pyridoxine mg               | 0.05   | 0.04  | 0.01   |
| B8 biotine µg                  | 2      | 2     | 0.7    |
| B9 acide folique µg            | 1      | 5.3   | 5.2    |
| B12 cobalamine µg              | 0.06   | 0.35  | 0.04   |
| Acide ascorbique mg            | 1.3    | 1     | 4      |

### 1.2.7 Les nucléotides:

Indépendamment de l'espèce, la composition en nucléotides du lait dépend du stade de lactation, les concentrations les plus élevées sont dans le colostrum et maximales de deux jours après la mise bas. Le lait de chèvre se caractérise par la part prépondérante des dérivés d'uridine (Jaubert, 1996).

**Tableau 7:** concentration en nucléotides du lait de différentes espèces en  $\mu\text{mol}/100\text{ml}$  (Jaubert, 1996).

| Nucléotides    | Chèvre |        | vache |        | humain |        |
|----------------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|
|                | 1-2 j  | 2 mois | 1-2 j | 2 mois | 2 j    | 1 mois |
| AMP            | 4,7    | 6,7    | 6,2   | 2      | 4      | 2,1    |
| GMP            |        |        |       |        | 0,3    | 0,2    |
| CMP            | 6,5    | 5,4    | 5,3   | 1,9    | 5,5    | 2      |
| UMP            | 53,8   | 19,2   | 39    | 14,5   | 1,7    | 1,1    |
| UDPG           | 60,7   | 19,6   | 36,2  |        | 1,4    | 0,9    |
| UDPG a         | 58     | 17,2   | 32    |        | 1,4    | 1      |
| Acide orthique | 6,3    | 10,2   | 7,4   | 26,8   |        |        |

### 1.3 La microflore du lait:

Les micro-organismes du lait sont répartis en deux grandes classes :

- ❖ La microflore indigène ou originelle: ensemble des micro-organismes retrouvés dans le lait à la sortie du pis, ces micro-organismes dépendent de l'alimentation, de la race et d'autres facteurs. Les genres dominants en sont principalement des micro-organismes mésophiles (*Micrococcus* sp., *Lactobacillus*, *Streptococcus* ou *Lactococcus* et les bactéries à Gram négatif) (Lamontagne *et al.*, 2002).
  - ❖ La microflore contaminante: Ensemble des micro-organismes ajoutés au lait de la récolte jusqu'à la consommation, elle peut se composer d'une flore d'altération qui causera des défauts sensoriels ou qui réduira la durée de conservation des produits et d'une flore pathogène, capable de provoquer des malaises chez les personnes qui consomment ces produits laitiers (Lamontagne *et al.*, 2002).
- 1- La microflore d'altération: Responsable de diverses dégradations du produit au niveau du goût, de l'arôme, de l'apparence ou de la texture. Par exemple, texture visqueuse à la surface du fromage, présence de longs filaments dans le lait, caillage du lait, production de mauvaises odeurs (soufrée, ammoniacale, fruitée et atypique) dues à certaines activités métaboliques telles que la protéolyse ou la lipolyse et gazéification du lait provoquant des trous involontaires ou des gonflements durant l'affinage du fromage. Tout ceci réduit la vie de tablette du produit laitier. Les principaux micro-organismes d'altération sont: *Pseudomonas* sp., *Proteus* sp., coliformes, principalement *E. coli*, *Enterobacter*, les sporulés, tels que *Bacillus* sp., *Clostridium* et certaines levures et moisissures.
  - 2- La microflore pathogène: sa présence dans le lait est due à l'animal, à l'environnement ou à l'homme. Les bactéries pathogènes sont responsables des affections liées à la santé des manipulateurs et des consommateurs.

On en retrouve deux genres :

- Les bactéries infectieuses: qui doivent être vivantes dans l'aliment lors de sa consommation pour agir. Une fois ingérées, elles dérèglent le système digestif. Apparaissent alors divers symptômes connus, tels que la diarrhée, les vomissements, les maux de tête et même la mort, dans certains cas extrêmes. Il s'agit de *Salmonella* sp., *E. coli* 0157 :H7, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Brucella* et *Campylobacter* sp. (Lamontagne *et al.*, 2002).
- Les bactéries toxinogènes: qui produisent une toxine dans l'aliment et c'est cette toxine qui rend le consommateur malade. Il n'est donc pas suffisant de détruire la bactérie pour éviter l'incidence de la maladie. De plus certaines toxines sont très résistantes aux traitements thermiques, tels que la pasteurisation et même la stérilisation, dans certains cas. Il s'agit de *Staphylococcus* sp. et *Clostridium botulinum* (Lamontagne *et al.*, 2002).

## 2. Les races caprines Algériennes:

Le cheptel caprin en Algérie est estimé à environ 2,5 millions de têtes, il est concentré généralement dans les zones difficiles et les régions défavorisées de l'ensemble du territoire : steppes, régions montagneuses et oasis. Il peut être aussi présent dans les exploitations agricoles de régions plus favorables comme les hautes plaines, les plaines intérieures et les piémonts des montagnes du Nord du pays (Abdelguerfi, 2003).

L'élevage caprin, en Algérie, vient en seconde position, après l'élevage ovin, et représente 13% du cheptel total, avec 50% de chèvres (Nedjraoui, 2002).

Quatre races principales sont recensées :

- **La chèvre Arabia**: race domestique localisée dans la région de Laghouat subdivisée en deux sous types, l'un sédentaire et l'autre, transhumant, comparativement au type transhumant, le type sédentaire possède des poils plus longs , 14 à 21cm contre 10 à 17cm pour le type transhumant.



**Figure 1** : Morphologie de la race de chèvre Arabia.

- **La chèvre Makatia:** localisée dans les hauts plateaux et le Nord de l'Algérie, elle est utilisée principalement pour la production de lait et de viande, appréciée aussi pour sa peau, c'est une race de grande taille et de couleurs variées.



**Figure 2:** Morphologie de la race de chèvre Makatia.

- **La chèvre Kabyle:** de petite taille, elle peuple abondamment les massifs montagneux, de la Kabylie, des Aurès et du Dahra. Son poil est long, de couleur généralement brun-foncé, parfois noire, la tête de profil courbée est surmontée de cornes.



**Figure 3:** Morphologie de la race de chèvre Kabyle.

- **La chèvre du M'zab:** chèvre principalement laitière, appelée également Touggourt, elle est originaire de M'tili, dans la région de Ghardaïa mais peut toutefois être trouvée dans toute la partie septentrionale du Sahara. L'animal est de taille moyenne (65cm), son corp allongé, droit et rectiligne, sa tête est fine et cornée, alors que sa robe présente trois couleurs, le chamois dominant, le blanc et le noir (Abdelguerfi, 2003).



**Figure 4:** Morphologie de la race de chèvre du M'zab

### 3. Les souches lactiques des différentes races de chèvre:

Les premiers travaux sur les bactéries lactiques ont été réalisés par Badis et collaborateurs en 2004. Ils ont montré que le lait cru de chèvre présente un écosystème favorable au développement de 6 genres de bactéries lactiques (Tableau 8 et 9). Les espèces de *Lactobacillus* et de *Lactococcus* dominent cette microflore lactique (Badis *et al.*, 2004a; Badis *et al.*, 2004b; Badis *et al.*, 2005; Badis *et al.*, 2006).

**Tableau 8:** Les souches lactiques de la race Arabia (Badis *et al.*, 2005)

| <i>Lactobacillus</i>                        | <i>Streptococcus</i>              | <i>Lactococcus</i>                             | <i>Leuconostoc</i>                                 | <i>Weissella</i>                   | <i>Pediococcus</i>     |
|---|-----------------------------------|--|--|------------------------------------|------------------------|
| <i>Lb. helveticus</i>                       | <i>Streptococcus thermophilus</i> | <i>Lc. lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> | <i>Ln. lactis</i>                                  | <i>Weissella paramesenteroides</i> | <i>P. damnosus</i>     |
| <i>Lb. plantarum</i>                        |                                   | <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>         | <i>Ln. Pseudo-mesenteroides</i>                    |                                    | <i>P. acidilactici</i> |
| <i>Lb. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>    |                                   | <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>       | <i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> |                                    | <i>P. parvulus</i>     |
| <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> |                                   | <i>Lc. plantarum</i>                           | <i>Ln. amylibiosum</i>                             |                                    |                        |
| <i>Lb. brevis</i>                           |                                   |  |  |                                    |                        |
| <i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i>        |                                   |  |  |                                    |                        |
| <i>Lb. acidophilus</i>                      |                                   |  |  |                                    |                        |
| <i>Lb. animalis</i>                         |                                   |  |  |                                    |                        |
| <i>Lb. amylophilus</i>                      |                                   |  |  |                                    |                        |

**Tableau 9:** Les souches lactiques de la race kabyle (Badis *et al.*, 2005).

| <i>Lactobacillus</i>                           | <i>Streptococcus</i>              | <i>Lactococcus</i>                       | <i>Leuconostoc</i>                              | <i>Weissella</i>                   | <i>Pediococcus</i> |
|--|-----------------------------------|--|---|------------------------------------|--------------------|
| <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgarius</i> | <i>Streptococcus thermophilus</i> | <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>   | <i>Ln. lactis</i>                               | <i>Weissella paramesenteroides</i> | <i>P. damnosus</i> |
| <i>Lb. helveticus</i>                          |                                   | <i>Lc. subsp. Hordniae</i>               | <i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> |                                    |                    |
| <i>Lb. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>       |                                   | <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> |   |                                    |                    |
| <i>Lb. brevis</i>                              |                                   | <i>Lc. Plantarum</i>                     |   |                                    |                    |
| <i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i>           |                                   | <i>Lc. Graviae</i>                       |   |                                    |                    |
|  |                                   | <i>Lc. Raffinolactis</i>                 |   |                                    |                    |

### 4. L'intérêt du lait de chèvre:

La chèvre, de par son origine, son anatomie, sa physiologie et ses caractéristiques comportementales représente une ressource sous-estimée qui en même temps a un grand potentiel pour une augmentation de la production du lait (Seifu, 2007).

Des efforts pour le développement du cheptel bovin sont déployés, mais ce n'est pas le cas pour les autres espèces laitières, chèvres, brebis, chèvres, pourtant mieux adaptées à nos conditions agro-climatiques (Ramet, 1993).

Par ailleurs, le lait de chèvre possède une qualité nutritionnelle importante : sa digestibilité, Haenlein et Caccese (1984) ont suggéré que le fort pouvoir tampon du lait de chèvre serait utile dans le traitement des ulcères gastriques, Haenlein (1993) a démontré que les protéines

du lait de chèvre sont digérées plus facilement et ses acides aminés sont absorbés de façon plus efficace que ceux du lait de vache, Haenlein (1998) a relevé que le lait de chèvre, une fois acidifié, pourrait former un caillé plus doux et plus friable, donc, il peut être attaqué plus facilement et plus rapidement par les protéases de l'estomac, il peut présenter un avantage pour les gens souffrant de désordres gastro-intestinaux et d'ulcères.

Jeannes (1980) a démontré que le lait de chèvre contenait une concentration adéquate d'acides gras essentiels pour les enfants comme le lait de vache, mais dans des quantités légèrement supérieures pour certains spécimens. Juarez et Ramnos (1986) ont mis en évidence le fait que le lait de chèvre a de plus grandes quantités de petites molécules grasses que le lait de vache, de son côté, Devendra (1975-1980) a souligné l'existence dans le lait de chèvre d'acides gras à chaînes de courtes et moyennes longueurs (4 à 12 carbones), dans une proportion élevée (20%) par rapport au lait de vache qui n'en contient que 10 à 20%. Ceci peut contribuer à une meilleure digestibilité car les lipases attaquent les liaisons des acides gras à courte chaîne plus facilement qu'elles ne le font avec des chaînes longues, comme l'a décrit Jenness (1980).

De plus, Park (1994) a indiqué que les acides gras sont largement utilisés dans le traitement des patients souffrant de désordres divers liés à l'absorption, grâce à leur capacité métabolique unique à fournir de l'énergie, un cholestérol sanguin plus bas, à inhiber et limiter le dépôt de cholestérol dans les tissus et entraîner la dissolution des cholestérols.

Haenlein (1988) a démontré que le lait de chèvre convient à l'enfant qui lui procure vitamines A et niacine et il lui fournit également une grande quantité de thiamine et de riboflavine (Seifu, 2007).

## **5. Les anomalies de la qualité du lait de chèvre :**

- **Anomalies d'origine physiologique :**

Les principales anomalies d'origine physiologique concernent la présence de colostrum ou de laits de fin de lactation. Les laits qui se caractérisent, en particulier, par une concentration anormale d'éléments par ailleurs normaux, présentent des risques qui sont essentiellement de nature technologique et ne constituent pas des produits dangereux pour le consommateur (Perrin, 1996).

- **Anomalies d'origine pathologique :**

Un certain nombre de germes infectieux peuvent être transmis par le lait : *Brucella*, bacille de la tuberculose, *Chlamydia*, *Coxiella* (fièvre Q), *Salmonella*, *Listeria*, *Staphylocoques* (mammites). D'autres anomalies peuvent être d'origine chimique: dues à la présence d'antibiotiques, d'antiseptiques ou de pesticides (Perrin, 1996).



## 6. Les bactéries lactiques :

### 6.1 Définition :

Avant le vingtième siècle, le terme bactéries lactiques (*Lactic acid bacteria*) a été utilisé pour signifier les organismes du lait acidifié (*Milk-souring organisms*). Significativement, la première culture pure de ces bactéries était celle de *Bacterium lactis* (probablement *Lactococcus lactis*), obtenu par Lister (1873). Des progrès importants dans la classification de ces bactéries ont été apparus quand les similarités entre les bactéries du lait acidifié et les autres bactéries productrices d'acide lactique étaient reconnues (Axelsson, 2004).

Les bactéries lactiques sont généralement associées aux habitats riches en nutriments, comme divers produits alimentaires (lait, viande, boisson, végétaux), mais d'autres sont aussi membres de la flore normale de la bouche, l'intestin et le vagin des mammifères (Salminen, 2004 et Carina Audisio *et al.*, 2010). La monographie d'*Orla-Jensen* (1919) constitue la référence pour l'étude des bactéries lactiques. Orla Jensen utilise les caractéristiques suivantes comme base de classification: morphologie (cocci ou bâtonnets, formation tétrade), mode de fermentation du glucose (homo ou hétérofermentation), la croissance à certaines températures cardinales (ex: 10°C et 45°C), les types de sucres utilisés. Ces caractéristiques sont toujours très importantes dans la classification des bactéries lactiques (Stiles et Holzapfel, 1997; Carr *et al.*, 2002 et Axelsson, 2004).

### 6.2 Propriétés générales :

D'une façon générale le groupe se compose de bactéries sous forme, de coques ou de bâtonnets à Gram positifs, non sporulant, et produisent l'acide lactique comme produit final principal pendant la fermentation des carbohydrates (Kandler, 1983).

Les BL sont, selon la voie qu'elles empruntent pour fermenter les hexoses, Homofermentaires ou hétérofermentaires.

La voie de la glycolyse (Embden-Meyerhof-Parnas), ayant pour produit final principal l'acide lactique ou la voie 6-phosphogluconate/phosphokétolase (6-pg/pk) (Schleifer et Ludwig, 1995) Ayant pour résultat l'acide lactique, l'anhydride carbonique et l'éthanol (acide acétique).

Cependant, quelques espèces sont considérées comme hétérofermentaires facultatifs. Concernant la fermentation des hexoses, ces espèces sont homofermentaires, mais dans certaines conditions (par exemple si la source disponible de carbone est un pentose), elles induisent la voie 6-pg/pk, ayant pour résultat la fermentation hétérolactique (Axelsson, 2004 et Jozala *et al.*, 2005).

Les BL sont trouvées dans diverses niches écologiques, tel que le lait, ainsi que certaines nourritures, la bouche, les régions gastro-intestinales et urogénitales des humains et des animaux (Lopez-Diaz *et al.*, 2000; Navarro *et al.*, 2000; El Shafei *et al.*, 2000 et Mathara *et al.*, 2004). Elles constituent aussi la flore microbienne dominante responsable de la fermentation des céréales et des plantes fourragères ensilées (Carr *et al.*, 2002 et Kotelnikova et Gelfand, 2002). Même si elles se développent dans une variété d'habitats, elles exigent des carbohydrates fermentescibles, des acides aminés, des acides gras, des sels et des vitamines pour leur croissance (Shihata et Shah, 2000; Björkroth et Holzappel, 2003 et Hammes et Hertel, 2003).

Les souches sont généralement faiblement protéolytiques et lipolytiques et exigent des acides aminés, des purines, des pyrimidines et des vitamines pour leur croissance (Stamer, 1976; Cogan et Hill, 1993 et Jay, 1996).

Les bactéries lactiques utilisées dans les fermentations laitières peuvent être divisées en deux groupes sur la base de leur croissance optimale (Bissonnette *et al.*, 2000). Les bactéries mésophiles avec une température optimum de croissance entre 20°C et 30°C et les thermophiles entre 30°C et 45°C. Alors que la majorité de souches se développent à pH 4,0-4,5, certaines sont en activités à pH 9,6 et d'autres à pH 3,2 (Jozala *et al.*, 2005).

L'acide lactique produit peut être sous deux formes stéréoisomériques, L moins fréquemment, D ou un mélange des deux (Who, 1974).

### **6.3 Origine des bactéries lactiques :**

Les bactéries lactiques ont été isolées dans de nombreux milieux naturels végétaux, animaux et humains ; certains espèces semblent adaptées à un environnement spécifique et ne semblent guère se retrouver ailleurs que dans leur habitat naturel. Grâce à leur souplesse d'adaptation physiologique, les BL peuvent coloniser des milieux très différents du point de vue physico-chimique et biologique (de Roissard et Luquet, 1994).

Selon Desmazeaud (1992), les espèces du genre *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Leuconostoc* se rencontrent plutôt chez les hommes, ainsi que chez les animaux. Dans le domaine laitier, elles existent en quantité considérable, les espèces du genre *Lactobacillus* sont encore plus répandues dans la nature, par exemple, on les trouve sur les végétaux ou elles assurent l'acidification de l'ensilage, on les trouve aussi dans l'intestin des animaux et de l'homme. Elles sont également isolées des cavités naturelles de l'organisme (cavités buccales et vaginales) (de Roissard et Luquet, 1995).

#### 6.4 Génétique des bactéries lactiques

Le matériel génétique des bactéries lactiques est organisé en deux structures: le chromosome, long filament d'ADN très replié sur lui-même, et les plasmides, petites molécules circulaires d'ADN indépendantes du chromosome, pouvant se répliquer de façon autonome. Les plasmides peuvent être perdus spontanément par la bactérie dans les conditions de milieu défavorables (température élevée, privation nutritionnelles) ou éliminés par des traitements chimiques. Cette possibilité de perdre spontanément des plasmides explique l'instabilité des propriétés technologiques, due à l'apparition de variantes ayant perdu certains gènes et donc certaines fonctions métaboliques. Ainsi, la perte du plasmide codant pour la protéase de paroi rend les bactéries peu protéolytiques, et entraîne une croissance ralentie des germes et une acidification faible du lait.

D'autres caractères technologiques sont également codés par des gènes portés par des plasmides: la capacité à utiliser le lactose, le métabolisme de précurseurs d'arômes, la production de la nisine chez certaines souches, des résistances aux bactériophages (Stackebrandt et Teuber, 1988 et Kandler et Weiss, 1986).

#### 6.5 Classification des bactéries lactiques :

Le groupe des bactéries lactiques a été systématiquement, ensuite plusieurs travaux dans ce domaine ont été repris par (Orla-Jensen, 1919; collin *et al.*, 1987; collin *et al.*, 1993; Davies et Law, 1984; Gilliland, 1995; Stiles et Hotzappel, 1997; Sneath *et al.*, 1986; Leveau et Bouix, 1983 et cité dans de Roissard et Luquet, 1994) dont le classement est complété par la classification moderne qui a permis de distinguer différents genres.

##### 6.5.1 Classification classique :

Orla-Jensen (1991), a proposé une classification fondée sur les caractères morphologique, biochimique et physiologique (Température de croissance, mode de fermentation du glucose et la forme de l'acide lactique produit). Il a travaillé sur le genre *Lactobacillus* avec sa structuration en *Thermobacterium*, *Streptobacterium* et *Bétabacterium* correspondant aux trois groupes actuels des Lactobacilles. Homofermentaires strictes, hétérofermentaires facultatifs et hétérofermentaires strictes.

Les groupes des homofermentaires sont formés de trois sous-groupes:

- *Streptobacterium*.
- *Thermobacterium*.

Les groupes des hétérofermentaires sont formés également de trois sous-groupes :

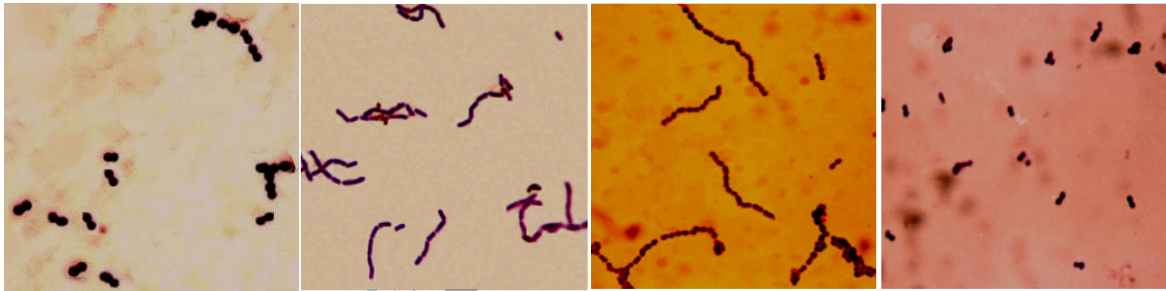
- *Bifidobacterium*.
- *Betabacterium*.

- *Betacoccus* (Gournier Château et Larpent, 1994).

Selon Sneath *et al.*, (1986), les bactéries lactiques sont regroupées suivant une taxonomie basée sur :

**a) Les caractères morphologiques :**

- La forme : des cellules microbiennes représentent souvent un caractère distinctif de l'espace et du genre bactériens (coques ou bâtonnets).



**Figure 5:** différente forme microscopique de bactéries lactiques obtenues au laboratoire de microbiologie appliquée de l'université d'Oran par Saidi (2005). De gauche – droite, Diplocoques (*Leuconostoc* sp.), (*Lactobacillus* sp.), streptocoques et diplocoques (*Lactococcus lactis* sp.)

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

**b) Les 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 de Roissard, 1994).

**c) Les caractères immunologiques :**

La réaction immunologique se traduit par l'agglutination des cellules bactériennes ou par la précipitation à l'interface antigène-antisérum (de Roissard et Luquet, 1994).

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.

**d) Les caractères structuraux :**

- 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 chimiotaxonomiques réalisées sur les bactéries ont contribué de façon fondamentale à expliquer les relations génétiques intra et inter spécifiques.

**7. Exigences nutritionnelles des bactéries lactiques :**

Les bactéries lactique sont très exigeantes du point de vue nutritionnelle Elles requièrent plusieurs substrats complexes azotés, phosphatés et soufrés mais aussi des facteurs de croissances comme les vitamines et les cations (Desmazeaud, 1983).

**7.1 Exigence en vitamines :**

Vis-à-vis des vitamines, toutes les espèces de lactobacilles présentent une exigence absolue pour le pantothénate de calcium (Vitamine B5) et la riboflavine (vitamine B2) (Sauf pour *Lb. reissii* qui nécessite la thiamine -vitamine B1 et l'acide folique), de plus *Lb. lactis*, *Lb. bulgaricus* et *Lb. acidophiles* exigent la cobalamine (vitamine B12), *Lb. helveticus* exige la pyridoxine (Vitamine B6), *Lb. acidophiles* l'acide folique, *Lb. casei* la pyridoxine et l'acide folique. Les lactocoques ont une exigence en niacine et en acide pantothénique Les streptocoques thermophiles ont une exigence absolue en acide pantothéniques et en riboflavine leur croissances est stimulées par la thiamine et la niacine la biotine et la pyridoxine (Luquet et de Roissard, 1994).

**7.2 Exigences en sources azotées :**

Chez certaines souches des lactocoques, la production d'acide dans le lait peut être stimulée par le mélange, adénine, guanine, uracile et xanthine Dans les milieux synthétiques, les lactobacilles exigent la présence d'adénine, de cytosine, de désoxyguanosine, de guanine, de thymidine et d'uracile (Law et Kolstad, 1988).

**7.3 Influence des cations:**

La supplémentation du lait avec 1 à 2,1 mM en ions  $Mg^{++}$  permet la stimulation de la croissance de ce thermophiles et *Lactococcus lactis* et un meilleur taux du servie, cet ion serait indispensable pour la croissance de *Lb. helveticus* et essentiel pour celle de *Lb. lactis* et *Lb. delbrueckii*.

Le manganèse à lui aussi des effets biologiques importants chez les bactéries lactiques le manganèse est nécessaire à :

- La structure et fonctionnement des enzymes, dont l'ARN polymérase.
- La détoxification des cellules mises en présence de l'oxygène.
- Le potassium joue un rôle important dans la régulation du pH intracellulaire Cet ion est exigée pour la croissance de *Lb. helvertcus*, *En. faecalis* et *Lb. casei*.
- Le sodium, quant à lui, exerce un effet sélectif sur les différentes espèces de bactéries lactiques (Luquet et de Roissard ; 1994).

## 8. L'intérêt des bactéries lactiques:

### 8.1 L'aspect Médical: les probiotique:

Ce sont Metchnikoff et Tissier qui ont été les premiers à avancer dans leurs travaux des propositions scientifiques au sujet de l'utilisation probiotique des bactéries (Lilly et Stillwell, 1965).

L'expression « probiotique » dérive de deux mots grecs ; « pro » et « bios » qui signifient en faveur de la vie, ce sont des préparations microbiennes vivantes utilisées comme additifs alimentaires et qui ont une action bénéfique sur l'hôte en améliorant la digestion et l'hygiène intestinale. Chez les animaux d'élevage, ces produits favorisant le mécanisme biologique naturel peuvent être une bonne alternative à l'emploi des antibiotiques qui ont été longtemps utilisés pour améliorer les performances zootechniques et sanitaires de ces animaux mais dont l'une des conséquences néfastes a été l'apparition de l'antibiorésistance.

Chez l'homme, ces bactéries jouent un rôle inhibiteur contre les bactéries pathogènes et améliorent la digestion.

L'effet bénéfique est du à plusieurs mécanismes :

- ❖ La production d'acides organiques (acide lactique, acétique), de peroxyde d'hydrogène, et de bactériocines limitent le développement des entérobactéries.
- ❖ Certaines souches ont la capacité de déconjuguer les sels biliaries qui sont alors plus inhibiteurs sur le développement des bactéries pathogènes que les formes conjuguées.
- ❖ Les souches peuvent inhiber l'implantation des germes pathogènes par compétition.
- ❖ pour l'adhésion aux cellules intestinales, ce qui permet une colonisation rapide et dirigée du tube digestif.
- ❖ Ces bactéries peuvent réduire l'absorption de substances toxiques (ammoniac, amines, indole) et peuvent ainsi diminuer les biotransformations des sels biliaries et des acides gras en produits toxiques.

- ❖ Les probiotiques peuvent également produire des métabolites susceptibles de neutraliser « in situ » certaines toxines bactériennes.
- ❖ Les probiotiques peuvent stimuler l'activité enzymatique de micro-organismes endogènes permettant ainsi une meilleure assimilation des aliments.
- ❖ Ils peuvent stimuler les cellules du système immunitaire et favoriser la production d'anticorps qui inhibent ainsi les bactéries pathogènes à la surface des muqueuses intestinales.
- ❖ Certaines souches peuvent posséder une activité anti-cancérogène dont les propriétés peuvent se répartir en deux catégories :
  - 1- la prévention de l'initiation d'un cancer, soit en détruisant des substances Pré-cancérogènes présentes dans l'organisme, soit en inhibant les bactéries présentes dans le tractus digestif, productrices d'enzymes catalysant la conversion de substances cancérogènes.
  - 2- la suppression de cellules tumorales, soit directement, soit de façon Indirecte, en favorisant l'activité des macrophages qui sont impliqués dans la destruction des cellules tumorales.
- ❖ Les Lactobacilles excrètent la beta-galactosidase, souvent déficiente dans le tractus digestif de l'hôte et facilite donc la digestion du lactose (Larpent, 1997).

## 8.2 L'aspect technologique : les levains

- Acidification par production d'acide lactique.
- Texturation par libération d'exopolysaccharides (yaourts).
- Production d'arômes (acétaldéhyde) (fromages).
- Amélioration des propriétés digestives (*Bifidobacterium*) (Branger *et al.*, 2007).

Ils possèdent un pouvoir inhibiteur vis-à-vis des micro-organismes pathogènes ou d'altération (Larpent, 1997), Leur rôle dans la production des fromages est d'abord la fermentation du lactose en acide lactique et donc l'acidification du lait pour obtenir le caillé (à partir d'un pH inférieur à 4.6). D'autre part, les espèces de *Lactobacillus* comme *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus thermophilus* sont pour la plupart, des espèces homofermentaires. Du fait de leur métabolisme particulièrement diversifié, elles participent de façon plus importante que les streptocoques lactiques à la production d'arômes. Leur rôle est essentiel au cours de l'affinage des fromages car leur concentration au cours de cette étape est forte par rapport à leur concentration dans le lait et le caillé (Leyral et Vierling, 2007).

**Tableau 10:** Rôle de quelques espèces de *Lactobacillus* utilisés en industrie (Lamontagne *et al.*, 2002).

| Espèces                | Emploi en industrie               | Rôle   |
|------------------------|-----------------------------------|--|
| <i>Lb. bulgaricus</i>  | Yogourt – fromage (mozzarella...) | Acidification en cours de production protéolyse en cours de maturation libération du galactose pour le brunissement production d'arômes et de polysaccharides (yogourt). |
| <i>Lb. helveticus</i>  | Fromages (suisse, mozzarella...)  | Acidification en cours de production prévention de l'amertume (peptidase).   |
| <i>Lb. casei</i>       | Yogourt - fromage (cheddar...)    | Un peu d'acidification en cours de production contribution au caractère probiotique.   |
| <i>Lb. acidophilus</i> | Yogourt- lait acidophile          | Acidification en cours de production contribution au caractère probiotique.  |
| <i>Lb. kefir</i>       | Kéfir                             | Acidification en cours de production   |

En industrie, on utilise les levains. Comme les bactéries doivent se multiplier et atteindre des populations de l'ordre de  $10^5$  à  $10^6$  cellules/ml pour déclencher le processus fermentaire désiré, on ajoute le levain, ce qui évite l'attente de la phase de multiplication et prévient le développement d'autres micro-organismes d'altération (Montel, 2005).

Ces levains sont généralement des cultures mixtes et non des cultures pures, à cause des bactériophages. Deux types de ferments sont disponibles :

- ❖ Ferments mixtes : mélanges non déterminés, provenant généralement de cultures repiquées de façon traditionnelle, moins sensibles aux phages mais plus difficiles à uniformiser.
- ❖ Ferments définis : souches mélangées dans des proportions précises, il convient de connaître, outre les caractéristiques de chaque souche, les interactions positives (comme l'association *Streptococcus thermophilus*/*Lb. bulgaricus* dans le yogourt) et négatives pour cause d'antagonisme (Lamontagne *et al.*, 2002).

**Tableau 11:** Critères technologiques de sélection des bactéries lactiques fournis par les fiches techniques (Lamontagne *et al.*, 2002).

| Propriétés de fermentation   | Résistance/sensibilité  | autres                                     |
|--|---|--|
| Dilution des sucres (homo /hétérofermentation)                                       | Bactériophages  | Nomenclature                               |
| Ermentation du citrate/production d'arômes   | NaCl  | Comportement symbiotique (cultures mixtes) |
| Production de gaz  | Température (cuisson)   | Coût                                       |
| Vitesse d'acidification  | Phosphates (milieux de culture)                                   | Qualité microbiologique                    |
| Activité protéolytique et peptidolytique   | pH inhibiteur (suracidification lors de l'entreposage du yogourt) |  |
| Production de saccharides  | Oxygène   |  |
| Production de bactériocines ou d'autres inhibiteurs de micro-organismes indésirables |   |  |
| Acidité titrable ou pH indiquant la fin de la fermentation                           |   |  |



Les ferments lactiques du genre *Lactococcus* et *Leuconostoc* sont mésophiles (leur croissance optimale se situe entre 25°C et 45°C), un certain nombre de cultures (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus thermophilus* et *Bifidobacterium*) sont dites thermophiles car leur température optimale de croissance se situe entre 37°C et 47°C.

Connaître la caractéristique du comportement d'une culture selon la température est cruciale en technologie laitière. La température sert à contrôler les vitesses d'acidification et constitue un outil important dans la gestion de l'équilibre des flores (Lamontagne *et al.*, 2002).

Un inconvénient des bactéries lactiques, au niveau industriel, est d'ordre génétique ; à l'exception des Streptocoques thermophiles, elles possèdent des protéinases liées aux parois qui les rendent capables d'utiliser les oligopeptides et les protéines du lait. La température, le pH et la concentration en ions calcium interviennent pour réguler la liaison de la protéinase à la paroi cellulaire. Les gènes des protéinases ne sont pas situés sur le chromosome bactérien mais sur des petits fragments d'ADN ou plasmides, qui peuvent être perdus quand les cellules se divisent en cours de croissance, d'où une instabilité d'autant plus forte que d'autres caractères technologiques sont aussi codés par des gènes portés par des plasmides (hydrolyse du lactose, métabolisme du citrate...etc). Pour l'avenir, il faut stabiliser ces caractères d'acidification, de protéolyse ou de production de composés d'arômes par intégration dans le chromosome bactérien des gènes portés par les plasmides (Martinet et Houdebine, 1993).

En dépit des progrès récents en technologie et des concepts d'assurance-qualité, l'application des pratiques d'hygiène dans les ateliers de production de certains produits alimentaires en Afrique s'est montrée insuffisante pour assurer l'absence des bactéries d'altération et pathogènes dans le produit final.

Cette problématique a donc incité les chercheurs à développer de nouvelles technologies, notamment celles qui utilisent des agents biologiques pour réduire les contaminations. Les bactéries lactiques productrices de bactériocines représentent un modèle de choix pour réaliser cet objectif (Thonart *et al.*, 2009).

**Tableau 12:** Principales utilisations des bactéries lactiques en agroalimentaires (Caplice et Fitzgerald 1999 et Ross *et al.*, 2002).

| Produits                              | Pays                           | Microorganismes  | Substrats                             |
|---------------------------------------|--------------------------------|--|---------------------------------------|
| <b>Pain</b>                           |                                |  |                                       |
| Pain                                  | International                  | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , autres levures, et BL.   | Blé, riz et autres céréales           |
| San Francisco                         |                                | <i>Lb. sanfrancisco</i>  | Farine de blé                         |
| <b>Produits végétaux</b>              |                                |  |                                       |
| Bongkrek                              | Indonésie                      | <i>Rhizopus oligosporus</i>  | Noix de coco                          |
| Gari                                  | Afrique de l'ouest             | <i>Corynebacterium manihot</i> , autres levures, et BL ( <i>Lb. plantarum</i> , <i>Streptococcus spp.</i> )  | Racines de manioc                     |
| Idli                                  | Sud de l'Inde                  | BL ( <i>Ln. mesenteroides</i> , <i>E. faecalis</i> )<br><i>Torulopsis</i> , <i>Candida</i> , <i>Trichosporon pullulans</i>   | Riz et black gram dhal                |
| Kenkey                                | Ghana                          | Inconnu  | Mais                                  |
| Kimchi                                | Corée                          | BL   | Choux, végétaux, noix                 |
| Mahewu                                | Afrique du sud                 | BL   | Mais                                  |
| Ogi                                   | Nigeria                        | BL, <i>Cephalosporium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium spp.</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida mycoderma</i> , <i>C. valida</i> , ou <i>C. vini</i> | Mais                                  |
| Sauce de soja                         | Japon, Chine, Philippines      | <i>Aspergillus oryzae</i> ou <i>A. soyae</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>  | Soja et blé                           |
| Tempeh                                | Indonésie                      | <i>Rhizopus oligosporus</i>  | Soja                                  |
| Nan                                   | Inde                           | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , BL.  | Farine                                |
| Olives                                | Méditerranée                   | <i>Ln. mesenteroides</i> , <i>Lb. plantarum</i>  | Olives vertes                         |
| Choucroute                            | Europe                         | <i>Lc. lactis</i> , <i>Ln. mesenteroides</i> , <i>Lb. (brevis, plantarum, curvatus, sake)</i>  | Choux                                 |
| Sauce de soja                         |                                | <i>Lactobacillus sp.</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> et <i>soyae</i> et <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>  | Soja et blé                           |
| Légumes                               |                                | <i>Enterococcus (mundtii, faecium)</i> , <i>Lactococcus (cremoris, lactis)</i> ,   | légumes                               |
| Pickles                               |                                | <i>Pediococcus</i> , <i>Lb. plantarum</i>  | Concombres                            |
| Bière                                 |                                | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , BL   | Orge, houblon                         |
| Vin                                   |                                | <i>Oenococcus oenos</i>  | Raisin                                |
| Sake                                  |                                | <i>Lb. sake</i> , <i>Lb. homohiochi</i> , <i>Ln. mesenteroides</i>   | Riz                                   |
| <b>Produits laitiers</b>              |                                |  |                                       |
| Fromages                              | International                  | <i>Lc. lactis</i> , <i>Sc. thermophilus</i> , <i>Lb. shermanii</i> et <i>Lb. bulgaricus</i> , <i>Propionibacterium shermanii</i> , <i>Penicillium spp.</i>                                     | Lait de vache, chèvre ou brebis       |
| Lait fermenté cheddar                 |                                | <i>Lb. acidophilus</i>   | Lait de vache                         |
| Suisse                                |                                | <i>Lc. (cremoris, lactis)</i> et <i>Leuconostoc</i>  | Lait                                  |
| Yoghurt                               | International                  | <i>Lb. (delbrueckii, bulgaricus, helveticus)</i>   | Lait                                  |
| Képhir                                |                                | <i>S. thermophilus</i> , <i>Lb. bulgaricus</i>   | Lait                                  |
|                                       |                                | <i>Lactococcus</i> , levure, <i>Lb. kefir</i> (et autres)  | Lait de vache, de jument ou de chèvre |
| <b>Produits carnés et de la pêche</b> |                                |  |                                       |
| Viandes et Saucisses fermentées       | Europe (Sud et Centre, U.S.A.) | BL ( <i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> ), <i>Staphylococcus</i> , autres BL  | Viandes de bœuf, porc et volailles    |
| Poissons                              |                                | <i>Lb. (plantarum, casei)</i> , <i>Cb. (piscicola, et divergens)</i>   | Poisson                               |
| Izushi                                | Asie                           | <i>Ln. mesenteroides</i> , <i>Lb. plantarum</i>  | Poisson, riz, légumes                 |

Traditionnellement, les fermiers et les bergers ont fait le fromage à partir du lait cru de vaches, de chèvres ou de brebis sur une petite échelle, en utilisant les bactéries lactiques naturelles. Des cultures de ces bactéries ont été produites en incubant le lait ou petit lait à partir de la veille dans des conditions spécifiques. Aujourd'hui, cette manière traditionnelle de produire le fromage est toujours présente dans beaucoup de pays européens méditerranéens et méridionaux; ces fromages sont généralement appelés «artisanaux» (Cogan *et al.*, 1997). Il n'est pas étonnant de découvrir que les produits fermentés traditionnels des pays subtropicaux hébergent principalement des bactéries thermophiles, tandis que les produits avec les bactéries mésophiles proviennent des pays européens nordiques (Wouters *et al.*, 2002). Elles ont été traditionnellement employées en tant que biopréservateur des produits alimentaires. La biopréservation se rapporte à la durée de conservation prolongée et la sécurité augmentée des nourritures obtenues en employant la flore microbienne normale ou supplémentaire et leurs produits antimicrobiens.

L'utilisation des procédés de fermentation a augmenté durant ces dernières années et inclus maintenant beaucoup de types d'alimentation que ce soit pour les humains ou les animaux (Ross *et al.*, 2002 et Schnürer et Magnusson, 2005).

## **9. Critères de sélection de souches pour l'élaboration des ferments :**

Cette sélection s'effectue selon des critères technologiques, les principales fonctions des ferments étant la production d'acide de gaz et d'arome, la protéolyse, la lipolyse et l'inhibition de bactérie indésirables. La caractérisation technologique se fait donc sur les critères suivants :

### **9.1 Activité acidifiante :**

L'acidification et le rôle principal des bactéries utilisées comme ferments celle-ci a différents buts :

- La coagulation du lait (en facilitant l'action de l'enzyme de la présure) et l'augmentation de la synérèse du caillé.
- La participation aux propriétés rhéologiques du produit final.
- L'inhibition de la croissance des bactéries nuisibles (Larsen et Anon, 1989 et 1990).

### **9.2 Activité protéolytique :**

Les bactéries lactiques possèdent des protéinases, des peptidasesnécessaire à la dégradation des protéines du lait en peptides et acides aminés. Ceux- ci peuvent alors être transformés en alcools et en acides. Cette activité protéolytique intervient de ce fait sur le rendement fromager, la texture et la saveur typique du fromage et par conséquent sur les caractéristiques du produit final (Chahbal *et al.*, 1991 et 1993).

Dans les fromages, l'activité des enzymes protéolytiques des bactéries lactiques est fondamentale car elle va participer à la formation du goût ou des arômes : la protéolyse due aux bactéries lactiques va surtout conduire à des peptides courts et à des acides aminés libres. Ces derniers sont des précurseurs pour de nombreux produits d'arômes. En effet, la méthionine peut conduire à des composés soufrés caractéristiques. Ceci après leur dégradation par la flore d'affinage (Schirch *et al.*, 1985 et Ott *et al.*, 1997).

### **9.3 Pouvoir aromatisant et pouvoir gazeux :**

Certaines bactéries lactiques sont capables de produire des composés d'arômes qui participent aux qualités organoleptiques des fromages. La plupart des composés d'arôme sont issus du métabolisme du citrate : l'acétoïne et le diacétyl sont les plus importants (Tamime, 1990).

### **9.4 Résistance aux bactériophages :**

Les phages, virus des bactéries, sont des parasites obligatoires. Ils constituent l'une des principales causes de perturbation de l'acidification du lait par les bactéries lactiques. Il est nécessaire que les bactéries lactiques composant les ferments ne soient pas toutes sensibles aux mêmes phages pour diminuer les risques d'accidents de fabrication.

### **9.5 Activité bactériostatique : production de bactériocines :**

Les bactériocines, telles que la nisine ou la pédiocine, sont des molécules de nature protéique dont l'action bactériostatique est spécifique de quelques espèces bactériennes. Ces substances, élaborées par certaines bactéries, inhibent ainsi la croissance de différentes souches de bactéries pathogènes (*Listeria et Clostridium*), contribuant aussi à la préservation de l'équilibre microbien et organoleptique du fromage. Les bactéries lactiques produisent des substances antimicrobiennes de nature protéique appelées bactériocines. Cette caractéristique est utilisée industriellement pour la destruction des bactéries indésirables et pathogènes dans la fabrication d'aliments comme la nisine produite par les lactocoques dirigée contre *Bacillus* et *Clostridium*, la plantaricine et la sakacine produites toutes les deux par les lactobacilles actives sur *E. coli*, *Listeria* et certaines levures (Nes *et al.*, 1996).

### **9.6 Résistance aux antibiotiques :**

La présence d'antibiotiques dans le lait (pénicilline, vancomycine...etc) peut être due au traitement des immunités. La plupart des bactéries y sont sensibles. Mais, de plus en plus on voit l'émergence de souches résistantes à ces antibiotiques, surtout dans le genre *Enterococcus*. Il n'est pas souhaitable de sélectionner, dans la composition des ferments, des souches résistantes aux antibiotiques, car, ingérées par l'homme, elles sont susceptibles de transférer ces caractères aux autres bactéries du tube digestif. De plus, l'augmentation de l'ingestion d'antibiotiques par l'homme peut entraîner des risques d'allergies.

Enfin, des bactéries résistantes aux antibiotiques peuvent avoir, en plus, perdu certaines de leurs caractéristiques originelles.

## 10. Les lactobacilles :

### Caractéristiques générales :

Les bactéries du genre *Lactobacillus* ont des aspects variés allant du bacille long et fin au coccobacille en passant par la forme bâtonnet court ou légèrement flexueux. Ils sont Gram positif, non sporulés, fréquemment associés en chaînettes et habituellement immobiles. Les lactobacilles se montrent généralement plus résistants au stress acide que les lactocoques (Siegumfeldt *et al.*, 2000). Cette différence pourrait s'expliquer par un pH optimal plus faible pour l'enzyme chargée de réguler le pH intracellulaire (translocation de protons par une ATPase) chez les lactobacilles (Nannen *et al.*, 1991). Le métabolisme des sucres chez *Lactobacillus* est hétéro- ou homofermentaire.

#### 10.1 Sous genre *Lactobacillus* homofermentaires : *Streptobacterium*

- ***Lactobacillus casei*** : Les cellules de cette espèce sont des bâtonnets courts, soit isolés ou par paires, soit assemblés en plus ou moins longues chaînes (jusqu'à 100 éléments). Ils troublent les milieux de façon homogène, le sédiment étant volumineux; de l'acide L (+) Lactique est formée, cette espace contient deux variétés : *Lactobacillus casei var- casei* : espace type *Lactobacillus casei var- fusiformis*. La morphologie est variable : Les cellules sont en parties cylindriques, partie fusiformes, leur donnant une forme de citron. Les cellules sont isolées ou en courtes chaînettes.

- ***Lactobacillus plantarum*** : ce sont des bâtonnets courts, coccoïdes, isolés ou en paires, qui forment les isomères de l'acide lactiques DL.

- ***Lactobacillus coryniformis*** : Les cellules sont courtes, généralement quelque fois longues de 8 $\mu$ , isolées ou groupées en courtes chaînes (8 éléments); elles ont tendance à se grouper en amas. On distingue deux variétés : *Lb. coryniformis var. coryniformis* et *Lb coryniformis var. torquens*.

#### 10.2 Sous genre *Lactobacillus* hétérofermentaires : *Betabacterium*.

Ce sous genre comprend l'ensemble des *Lactobacillus* isolés en brasserie comme *Lb. pastorianus*.

Clicours.COM

*Lactobacillus brevis* : ils sont présentent sous la forme de bâtonnets assez allongés (quelques fois leur longueur atteint 100 $\mu$ ), isolés ou en paires, présentant des formes en V caractéristiques, ne forment pas de chaînes. Cette espèce fermente vigoureusement avec dégagement de CO<sub>2</sub>, le glucose, le maltose et l'arabinose, elle forme l'acide DL lactique.

**Tableau 13:** Classification des lactobacilles (Kandler et Weiss in : Sneath *et al.*, 1986)

| Les groupes | Caractéristiques   | Les complexes          | Exemple : espèces et sous-espèces   |
|-------------|--|------------------------|---|
| Groupe I    | Homofermentaires strict fermentent les hexoses par voie E.M.P, ne fermentent ni gluconate ni les pentoses. | <i>Lb. delbrueckii</i> | Trois sous-espèces :<br><i>delbrueckii, lactis, bulgaricus</i>  |
|             |  | <i>Lb. acidophilus</i> | <i>Lb. acidophilus, Lb. heverticus Lb. amylovorus, Lb. crispatus, Lb. gassaeri, Lb. gallinarum, Lb. johnsonii</i>                               |
|             |  | Autres espèces         | <i>Lb. intestinalis, Lb. jonsonii, Lb. aviarius, Lb. hamsteri Lb. kefiranofaciens, Lb. mali, Lb. acetotolerans, Lb. ruminus, Lb. vitulinus.</i> |
| Groupe II   | Hétérofermentaires facultatifs, fermentent les hexoses par E.M.P et les pentoses                           | <i>Lb. plantarum</i>   | <i>Lb. plantarum, Lb. pentosus et Lb. agilis</i>  |
|             |  | <i>Lb. casei</i>       | <i>Lb. casei, Lb. paracasei, Lb. rhamnosus.</i>   |
|             |  | <i>Lb. bavaricus</i>   | <i>Lb. bavaricus, Lb. curvatus, Lb. sake</i>  |
|             |  | Autres espèces         | <i>Lb. uli, Lb. graminis.</i>   |
| Groupe III  | Hétérofermentaires stricts fermentent les hexoses et les pentoses.   | <i>Lb. fermentum</i>   | <i>Lb. fermentum, Lb. cellobiosis, Lb. reuteri et Lb. vavaginalis.</i>  |
|             |  | <i>Lb. brevis</i>      | <i>Lb. brevis, Lb. buchneri, Lb. kefir Lb. hilgardii, Lb. collinoides Lb. oris, Lb. sanfrancisco Lb. malfermentans.</i>                         |
|             |  | Autres espèces         | <i>Lb. fructivorans, Lb. suebicus, Lb. bifermentans (seule espèce capable, selon le pH, de dégrader le glucose en acide acétique).</i>          |

*Lactobacillus buchneri* : c'est une espèce caractérisée par son polymorphisme marqué: les cellules sont isolées, ou en paires, ou en courtes chainettes, les dimensions sont très variables, elles forment l'acide lactique.

### 10.3 Sous genre lactobacilles obligatoirement homofermentaires :

- **Thermobacterium :**

Les hexoses sont fermentés exclusivement par la voie d'Embden-Meyerhoff en acide lactique, les pentoses et les gluconates ne sont pas assimilés (Apria, 1979).

**Tableau 14** : Principales espèces et sous espèces de lactobacilles utilisées en industrie laitière. (*Lb.* : *Lactobacillus*). (Kandler *et al.*, 1986)

| Espèces  | Fermentation du lactose | Croissance |        |             |
|--|-------------------------|------------|--------|-------------|
|  |                         | A 15°C     | A 45°C |             |
| <i>Lb. helveticus</i>                          | Homofermentaire         | -          | +      | Thermophile |
| <i>Lb. delbruekii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> |                         | -          | +      |             |
| <i>Lb. delbruekii</i> subsp. <i>lactis</i>     |                         | -          | +      |             |
| <i>Lb. acidophilus</i>                         |                         | -          | +      |             |
| <i>Lb. casei</i>                               | Hétérofermentaire       | +          | -      | Mésophile   |
| <i>Lb. plantarum</i>                           |                         | +          | -      |             |
| <i>Lb. kefir</i>                               |                         | +          | -      |             |
| <i>Lb. brevis</i>                              |                         | +          | -      |             |
| <i>Lb. fermentum</i>                           |                         | -          | +      |             |

**Figure 6**: Aspect morphologique de *Lactobacillus acidophilus* (A), *Lactobacillus helveticus* (B) et *Lactobacillus casei*(C) observées au microscope électronique (Gx1250) (Kandler *et al.*, 1986)**Tableau 15**: Caractéristiques physiologiques de quelques espèces de *Lactobacillus* utilisés en industrie (Lamontagne *et al.*, 2002)

| espèces                | pH optimal de croissance | Température optimale de croissance | Température maximale de croissance | Activité de l'eau (Aw) |
|------------------------|--------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------|
| <i>Lb. helveticus</i>  | 5.5 – 6                  | 43 – 46                            | 52                                 | -                      |
| <i>Lb. casei</i>       | -                        | 30 – 37                            | < 45                               | -                      |
| <i>Lb. acidophilus</i> | 5.5 – 6                  | -                                  | -                                  | -                      |
| <i>Lb. bulgaricus</i>  | 5.5 - 6                  | 43 – 46                            | 52                                 | 0.95                   |
| <i>Lb. kefir</i>       | -                        | 30                                 | 45                                 | -                      |

**Tableau 16**: Critères différentiels des trois groupes de *Lactobacillus* (Larpen, 1997)

|                         | <i>Thermobacterium</i> | <i>Streptobacterium</i> | <i>Betabacterium</i> |
|-------------------------|------------------------|-------------------------|----------------------|
| <b>ADH</b>              | -                      | +/-                     | +                    |
| <b>Glucose (gaz)</b>    | -                      | -                       | +                    |
| <b>Glucosides</b>       | +/-                    | +                       | -                    |
| <b>Gluconates (gaz)</b> | -                      | +                       | +                    |
| <b>Aldolase</b>         | +                      | +                       | -                    |
| <b>Pentoses</b>         | -                      | +/-                     | +/-                  |
| <b>Thiamine</b>         | -                      | -                       | +                    |
| <b>Acide lactique</b>   | DL ou L                | D ou DL                 | DL                   |
| <b>G + C %</b>          | 34.7 – 50.8            | 33 – 46.4               | 35 – 53.4            |

## 11. Utilisation des lactobacilles en industrie laitière :

Parmi le genre *Lactobacillus*, la sous espèce *bulgaricus*, indispensable à la préparation du yaourt selon la définition du Codex Alimentarius de 2003, est la plus utilisée en industrie laitière. A titre d'exemple, la production européenne de yaourts a atteint près de 2 millions de tonnes en 1997 pour 6.34 millions de tonnes de fromages (tous types confondus). Pour quelques pays, dont la Finlande, la Suède et la Bulgarie, la proportion de yaourts est supérieure à celle des fromages. En fromagerie, les lactobacilles sont généralement utilisés pour la préparation de pâtes dures ou semi-dures typiques des fromages suisse et italien. Jusque dans les années 80, quelques espèces de *Lactobacillus* étaient considérées comme des contaminants (ou NSLAB pour Non-Starter Lactic Acid Bacteria) (Tab 17). Dans les années 1990, plusieurs auteurs ont démontré que ces espèces participaient à l'affinage des fromages par leur activité protéolytique, et la formation d'arômes qui en résulte (Lane *et al.*, 1996). Cependant, l'arrivée des techniques de traitement du lait de fromagerie, telle que la pasteurisation basse température couplée à la microfiltration, a contribué à une diminution significative dans le lait de ces NSLAB. Cette constatation a incité les producteurs de ferments fromagers à développer et commercialiser de nouvelles cultures, dites auxiliaires, contenant des souches de *Lactobacillus* capables d'accentuer et d'accélérer l'affinage des fromages (El Soda *et al.*, 2000). Les mécanismes enzymatiques impliqués dans l'activité protéolytique des lactobacilles sont moins documentés que ceux de *Lc. lactis* sp. Toutefois, les voies métaboliques empruntées par ces deux genres bactériens semblent relativement proches (Pritchard *et al.*, 1993). La protéolyse est cependant plus prononcée pour les lactobacilles (Marilley *et al.*, 2004). Ces dernières années, de nombreuses études ont été menées sur le caractère probiotique des souches de bactéries lactiques.

La définition d'un probiotique, proposée par Guarner *et al.*, (1998), est la suivante : tout microorganisme vivant qui, une fois ingéré en certaine quantité, exerce des effets bénéfiques sur la santé au-delà des fonctions nutritionnelles de base. Un groupe majeur constitué de 12 espèces de *Lactobacillus* figure parmi les bactéries considérées comme probiotiques (Holzapfel *et al.*, 2001). De nombreux produits alimentaires et préparations contenant des souches probiotiques de *Lactobacillus* sont commercialisés (Tab17). Les souches probiotiques commerciales sont majoritairement véhiculées à travers les produits laitiers (Tab 17).



Différentes raisons peuvent expliquer ce choix pour le consommateur (Heller, 2001):

- les produits laitiers fermentés sont perçus comme bénéfiques pour la santé.
- les consommateurs sont habitués au fait que les produits fermentés contiennent des microorganismes vivants.
- les probiotiques utilisés comme agent de fermentation combinent les images positives probiotique et fermentation.
- l'image bénéfique pour la santé des produits de type yaourt facilite la recommandation d'une consommation quotidienne. D'un point de vue technologique, les procédés utilisés pour la préparation des produits laitiers fermentés sont déjà optimisés pour permettre la croissance des microorganismes nécessaires à la fermentation. Par conséquent, la technologie existante ne nécessite pas de changements majeurs afin de garantir la survie des probiotiques dans le produit.

**Tableau 17:** Utilisations commerciales et effets bénéfiques de quelques souches de *Lactobacillus* probiotique (Prioult, 2003).

| Souches                                       | Produits  | Effets observés chez l'humain  |
|---|---|--|
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> (GG)           | Yaourts à boire<br>Yaourts<br>Capsules                        | Prévention des allergies<br>Traitement des allergies<br>Stimulation de la production d'IL-10,<br>Diminution de l'incidence des diarrhées<br>Diminution des diarrhées à rotavirus |
| <i>Lactobacillus johnsonii</i> (La1)<br>(Lj1) | Yaourts à boire<br>Yaourts                                    | Inhibition du développement<br>d' <i>Helicobacter pylori</i> , Stimulation de<br>l'activité phagocytaire.  |
| <i>Lactobacillus casei</i> (Shirota)          | Yaourts à boire<br>Laits fermentés                            | Augmentation de l'activité des cellules NK,<br>Diminution des diarrhées à rotavirus.   |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i><br>(NCFM)    | Laits fermentés<br>Yaourts<br>Formules infantiles<br>Capsules | Diminution des diarrhées infantiles, Facilite<br>la digestion du lactose   |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> (229v)         | Jus de fruits   | Prévention des maladies cardiovasculaires  |
| <i>Lactobacillus casei</i> (DN-114 001)       | Yaourts à boire   | Stimulation de la production d'IgA<br>Diminution de l'incidence des diarrhées  |

## 12. Composés antimicrobiens produits par les bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques produisent divers composés tels que les acides organiques, le diacétyl, le peroxyde d'hydrogène, le CO<sub>2</sub> et/ou les bactériocine pendant les fermentations lactiques (Talarico et Dobrogosz, 1989; Lindgren et Dobrogosz, 1990; Piard et Desmazeaud, 1991; Anderssen *et al.*, 1998; Sholeva *et al.*, 1998; Ouwehand, 1998; Zhennai, 2000; Oyetayo *et al.*, 2003 et Deegan *et al.*, 2006).

Les mécanismes antimicrobiens spécifiques des bactéries lactiques exploitées dans la biopréservation 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).

Les composés antimicrobiens produits par les BL peuvent empêcher la croissance des bactéries pathogènes; contaminants possibles des produits fermentés (Smith et Palumbo, 1983; Andersson, 1986; Adams et Hall, 1988; Raccach *et al.*, 1989; Berry *et al.*, 1995; Cintas *et al.*, 1998; Gill et Halley, 2003 et Guessas *et al.*, 2006).

### 12.1 Acides organiques :

L'acide lactique est le métabolite principal des BL causant la réduction du pH qui inhibe largement de microorganismes (Eklund, 1989 et Schnürer et 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).

Les BL hétérofermentaires produisent en plus, de l'acide acétique qui possède un plus haut pKa que l'acide lactique, ont donc une proportion plus élevée d'acide non dissocié à un certain pH semblable avec l'acide lactique. Les acides acétiques et propioniques agissent l'un sur l'autre sur les membranes de cellules pour neutraliser le gradient électrochimique de proton, mais l'effet de l'acide acétique et propioniques dépend souvent de la diminution du pH provoqué par l'acide lactique (Eklund, 1989).

L'acide propionique réduit la croissance fongique, particulièrement à un pH inférieur, et affecte les membranes fongiques aux valeurs de pH en dessous de 4,5. L'acide propionique et acétique empêchent également l'assimilation d'acide aminé (Freese *et al.*, 1973 et Eklund, 1989).

L'acide lactique produit pendant la croissance des BL et l'acétate de sodium contenu dans le MRS (de Man *et al.*, 1960), peuvent avoir des effets antifongiques synergiques (Cabo *et al.*, 2002).

De toute façon, les effets inhibiteurs des acides organiques tels que l'acide lactique, acétique et propionique continueront à compliquer des études sur des effets antimicrobiens des BL, à moins que d'autre purification et caractérisation rigoureuses des substances soit appliquée (Magnusson et Schnürer, 2001; Magnusson *et al.*, 2003 et Schnürer et Magnusson, 2005).

La fermentation par les BL est caractérisée par l'accumulation d'acides organiques qui s'accompagne d'une réduction du pH (Gould, 1991 et Podolak *et al.*, 1996).

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

Le pH bas externe cause l'acidification du cytoplasme des cellules, alors que l'acide non dissocié étant lipophile, peut se répandre passivement à travers la membrane (Kashket, 1987).

L'acide non dissocié agit en effondrant le gradient électrochimique de proton, ou en changeant la perméabilité de la membrane des cellules (Smulders *et al.*, 1986 et Earnshaw, 1992).

L'effet inhibiteur spécifique des acides organiques est généralement attribué à leur forme dissociée et non dissociée. Cette forme pénètre librement dans la cellule où elle s'ionise ce qui provoque un abaissement du pH interne et le blocage de certains mécanismes de transport (Parente *et al.*, 1994). Dans le cas de l'acide lactique, les concentrations en acide non dissocié nécessaire pour provoquer une inhibition sont pour les levures, les *Enterobacteriaceae* et les *Micrococaceae* de l'ordre 1 mM; pour les moisissures de 3 mM; et pour les *Bacillaceae* de 4 Mm (Baird-Parker, 1980 et Adams et Hall, 1988).

L'acide lactique est le métabolite principal de la fermentation des BL où il est en équilibre avec ses formes dissociée et non dissociées, et l'ampleur de la dissociation dépend du pH. A pH bas, une grande quantité d'acide lactique est sous la forme non dissociée, et elle est toxique à beaucoup de bactéries, champignons et levures (Podolak *et al.*, 1996).

Cependant, le comportement des différents micro-organismes vis-à-vis de l'acide lactique varient considérablement. L'acide lactique à pH 5,0, a un effet inhibiteur contre les bactéries sporulées mais il est inefficace contre les levures et les champignons (Woolford, 1975).

L'antagonisme est censé résulter de l'action des acides sur la membrane cytoplasmique bactérienne qui interfère l'entretien du potentiel de membrane et empêche le transport actif (Sheu *et al.*, 1972; Eklund, 1989 et de Vuyst et Vandamme, 1994 a), et peut être négocié par l'acide dissocié et non dissocié (Cherrington *et al.*, 1991).

Les stéréoisomères de l'acide lactique diffèrent également dans l'activité antimicrobienne, l'acide lactique L étant plus inhibiteur que l'isomère D (Benthin et Villadsen, 1995).

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

L'acide acétique est fortement inhibiteur pour les nombreux microorganismes et la présence simultanée d'acide lactique pourrait avoir un léger effet de synergie. L'acide acétique également agit en synergie avec l'acide lactique; l'acide lactique diminue le pH du milieu, augmentant de ce fait la toxicité de l'acide acétique (Adams et Hall, 1988).

Les bactéries nocives et pathogènes ne peuvent pas se développer dans un environnement acide. Ainsi le pH minimum de croissance peut varier d'une bactérie à une autre. Dans les produits fermentés, la baisse du pH dépend de la concentration en substrat fermentescible. Elle est limitée par le pouvoir tampon du milieu et par le pH minimum toléré par les ferments.

Le pH atteint dans certains de ces produits (yaourt, pH:4; saucisson sec, pH 4,5 à 5,3) suffit à éliminer certains contaminants (Huang *et al.*, 1986).

Les acides acétiques et propioniques produits par les BL par les voies hétérofermentaires, peuvent agir sur les membranes, et causent l'acidification intracellulaire et la dénaturation des protéines (Huang *et al.*, 1986).

Ils ont un effet antimicrobien plus fort que l'acide lactique dus à leurs valeurs plus élevées de pKa (acide lactique 3,08, acide acétique 4,75, et acide propioniques 4,87), et un pourcentage plus élevé d'acides non dissociés à un pH donné (Earnshaw, 1992).

L'acide acétique est plus inhibiteur que l'acide lactique et l'acide citrique envers *Listeria monocytogenes* (Richards *et al.*, 1995), et envers la croissance et la germination de *Bacillus cereus* (Wong et Chen, 1988).

### 12.2 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<sup>+</sup>, et l'activité antifongique des acides gras dépend de la composition, de la concentration, et du pH du milieu (Gould, 1991).

### 12.3 Peroxyde d'hydrogène :

En général, les bactéries lactiques sont capables de transformer l'oxygène moléculaire (O<sub>2</sub>) en super oxyde excité (O<sub>2</sub>\*), en peroxyde (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ou en eau (H<sub>2</sub>O). 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).

Le peroxyde d'hydrogène est produit par les BL en présence de l'oxygène sous l'action de la flavoprotéine oxydase du nicotinamide adénine hydroxyperoxydase dinucléotide (NADH).

L'effet antimicrobien de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut résulter de l'oxydation des groupes sulfhydryliques 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).

$H_2O_2$  peut également agir comme précurseur pour la production de radicaux libres bactéricides tels que le superoxide ( $O_2^-$ ) et radicaux d'hydroxyle ( $OH$ ) qui peuvent endommager l'ADN (Byczkowski et Gessner, 1988).

Dans le lait cru,  $H_2O_2$  active le système de lactoperoxydase produisant le hypothiocyanate ( $OSCN^-$ , des oxyacides plus élevés ( $O_2SCN^-$  et  $O_3SCN^-$  et produits intermédiaires d'oxydation qui sont inhibiteurs à une gamme étendue de bactéries à Gram<sup>+</sup> et à Gram<sup>-</sup> (Reiter et Härnuly, 1984 et Conner, 1993).  $H_2O_2$  peut s'accumuler et devenir inhibiteur pour quelques microorganismes (Condon, 1987). Cette accumulation résulte d'un déséquilibre entre les moyens de synthèse et de dégradation.

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

La production de  $H_2O_2$  par *Lactobacillus* et *Lactococcus* inhibe la croissance de *Staphylococcus aureus*, de *Pseudomonas sp.* et de divers microorganismes psychrotrophes (Davidson *et al.*, 1983). L'inhibition est négociée par l'effet d'oxydation fort sur des lipides de membrane et des protéines cellulaires (Morris, 1976 et Lindgren et Dobrogosz, 1990).

Le peroxyde d'hydrogène peut également activer le système lactoperoxydase du lait frais avec la formation de l'hypothiocyanate et d'autres agents antimicrobiens (Reiter et Härnuly, 1984; Pruitt *et al.*, 1986 et Condon, 1987).

La quantité de peroxyde d'hydrogène produite par les bactéries lactiques dépend en grande partie de la souche et la disponibilité de l'oxygène (Helander *et al.*, 1997).

#### **12.4 Dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) :**

Il est principalement produit par les BL hétérofermentaires. Le mécanisme précis de son action antimicrobienne est toujours inconnu. Cependant, le  $CO_2$  peut jouer un rôle antimicrobien en créant un environnement anaérobique, qui empêche les décarboxylations enzymatiques, et l'accumulation de  $CO_2$  dans le milieu peut causer un dysfonctionnement de la perméabilité (Eklund, 1984).

Le  $CO_2$  peut aussi empêcher la croissance de beaucoup de microorganismes de détérioration, particulièrement les bactéries psychrotrophes à Gram<sup>-</sup> (Farber, 1991 et Hotchkiss *et al.*, 1999). Le degré d'inhibition par le  $CO_2$  varie considérablement selon les espèces. Un taux de  $CO_2$  de 10% pourrait diminuer la population bactérienne de 50% (Wagner et Moberg, 1989), et entre 20 et 50%, il a une forte activité antifongique (Lindgren et Dobrogosz, 1990).

## 12.5 Composants aromatiques :

Certaines bactéries lactiques sont capables de produire des composés d'arômes qui participent aux qualités organoleptiques des fromages. La plupart des composés d'arôme sont issus du métabolisme du citrate: l'acétoïne et le diacétyl sont les plus importants.

### 12.5.1 Diacétyl :

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 de l'arôme et de la saveur du beurre et de quelques autres produits laitiers fermentés. Les niveaux sensoriels acceptables du diacétyl sont de 2 à 7 µg/ml (Earnshaw, 1992).

Beaucoup de bactéries lactiques comprenant des souches de *Leuconostoc*, de *Lactococcus*, de *Pediococcus* et de *Lactobacillus* peuvent produire le diacétyl bien que la production soit réprimée par la fermentation des hexoses (Cogan, 1986). Son utilisation pratique en tant que conservateur est limitée.

Cependant, le diacétyl peut agir synergiquement avec d'autres facteurs antimicrobiens (Jay, 1992) et contribuer aux systèmes combinés de conservation en nourritures fermentées. Les bactéries à Gram<sup>-</sup> sont plus sensibles au diacétyl que les bactéries à Gram<sup>+</sup>; 200 µg/ml et 300 µg/ml respectivement (Jay, 1982). Une concentration de 344 µg/ml a empêché la croissance des souches de *Listeria*, *Salmonella*, *Yersinia* et *Escherichia coli*. L'effet antimicrobien du diacétyl a été connu depuis les années 30. Il empêche la croissance des bactéries à Gram<sup>-</sup> en affectant l'utilisation de l'arginine (Jay, 1986).

Le diacétyl a été démontré pour être un antimicrobien efficace contre un éventail de bactéries Gram négatives et Gram positives, bien que les bactéries lactiques soient généralement résistantes (Gill et Halley, 2003). Les quantités de diacétyl produites par *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* varient de 0,07 à 3,72 ppm (Burrow *et al.*, 1970).

### 12.5.2 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).

Les quantités d'acétaldéhyde produites par les lactocoques oscillent entre 2,60 et 6,50 mg/ml (Bottazzi et Dellaglio, 1967). La contribution de l'acétaldéhyde à la biopréservation est mineure puisque le seuil de saveur est beaucoup inférieur aux niveaux qui sont considérés nécessaires à l'inhibition des microorganismes (Kulshrestha et Marth, 1974).

### 12.5.3 Reutérine :

La reutérine est produite par *Lactobacillus reuteri*, une espèce hétérofermentaire dont la niche écologique est l'appareil gastro-intestinal des humains et des animaux (Axelsson *et al.*, 1989). La reutérine est formée pendant la croissance anaérobie de *Lb. reuteri* par l'action de la glycérol déshydratase (Fig. 7) qui catalyse la conversion du glycérol en reutérine (Talarico *et al.*, 1988). La reutérine est produite pendant la phase stationnaire de *Lactobacillus reuteri* dans un milieu contenant du glucose et du glycérol ou du glyceraldéhyde. Elle a été chimiquement identifiée pour être le 3-hydroxypropanal ( $\alpha$ -hydroxypropionaldéhyde), un composé fortement soluble à pH neutre qui est en équilibre avec ses formes dimères monomériques et cycliques hydratées (Axelsson *et al.*, 1989, Talarico et Dobrogosz, 1989).

La reutérine montre un large spectre d'activité antimicrobienne contre certaines bactéries à Gram<sup>+</sup> et à Gram<sup>-</sup>. Les organismes de détérioration sensibles à la reutérine comprennent *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Candida*, et *Trypanosoma* (Axelsson *et al.*, 1989).

### 13. Les interactions entre les souches de bactéries lactiques :

Lorsque les bactéries lactiques sont utilisées en cultures mixtes pour la fermentation du lait, des interactions entre les différentes souches se manifestent. Ces interactions sont généralement classées en deux groupes : l'antagonisme et la stimulation. Les points suivants ne se veulent pas une liste exhaustive des interactions rencontrées lors de la fabrication fromagère mais un résumé des principales observations résultant de l'association de bactéries lactiques dans un même levain (Grattepanche, 2005).

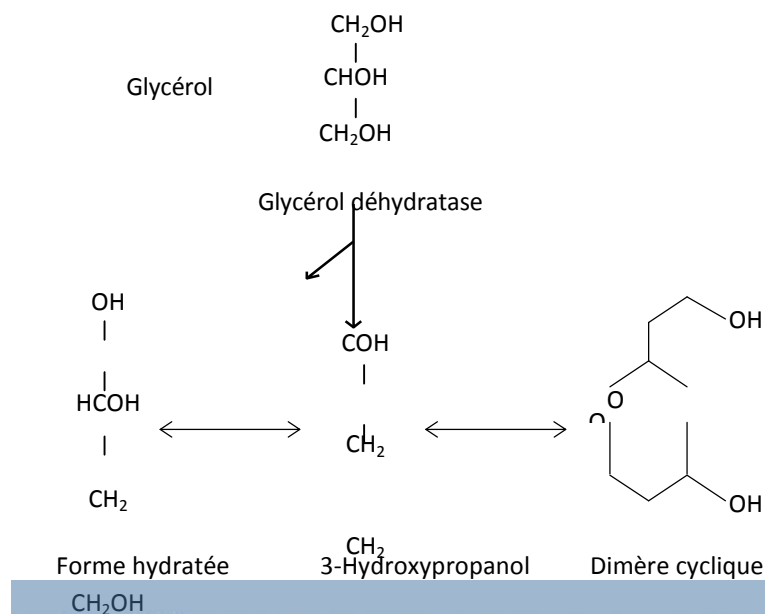


Figure 7 : Voie de biosynthèse de la reutérine (Talarico *et al.*, 1988).

### 13.1 Les phénomènes d'antagonisme :

La fermentation est historiquement utilisée comme un mode de conservation des aliments. Durant la fermentation du lait, différents agents antimicrobiens ayant la capacité d'inhiber le développement de bactéries pathogènes et/ou d'une flore de dégradation de l'aliment sont produits par les bactéries lactiques. Cependant, lorsqu'ils atteignent une certaine concentration, ces composés peuvent interrompre la croissance des souches productrices, il s'agit d'autoinhibition, et/ou des autres souches constituant le levain.

Ces interactions négatives faisant intervenir la production de substances inhibitrices sont connues sous le nom d'amensalisme. C'est notamment le cas des acides organiques issus des mécanismes homofermentaire et hétérofermentaire des bactéries lactiques.

L'inhibition peut aussi résulter de la production de peroxyde d'hydrogène car contrairement à d'autres genres bactériens, les bactéries lactiques sont dépourvues de catalase capable de dégrader ce composé toxique. L'action inhibitrice du peroxyde d'hydrogène peut être renforcée par le système lactoperoxydase-thiocyanate présent naturellement dans le lait (Gilliland, 1985).

Le thiocyanate est oxydé, en présence d' $H_2O_2$ , en un composé bactériostatique pour les bactéries Gram positif. Les bactériocines, produites par quelques souches de bactéries lactiques, sont également des agents inhibiteurs très puissants dont le spectre d'activité s'étend de souches phylogénétiquement proches de la souche productrice à des espèces génétiquement plus éloignées. Pour assurer leur développement dans le lait, les lactocoques possèdent un système protéolytique capable de dégrader les caséines en acides aminés. Comme nous l'avons vu précédemment, ils existent deux types de protéinases PI et PIII. En culture mixte dans le lait, la population bactérienne possédant la protéinase de type PIII domine sur le type PI.

Ce déséquilibre résulterait d'une inhibition de la synthèse de l'enzyme PI ou d'un phénomène de compétition pour les peptides relâchés par les deux types d'enzyme au niveau du système de transport des oligopeptides (Opp) (Flambard *et al.*, 1997).



**Tableau 18:** Composés antimicrobiens (LMM) produits par les bactéries lactiques (Yang, 2000).

| Souches   | Milieu                   | Composé antimicrobien                                      | PM (Da)         | Spectre  |
|---|--------------------------|--|-----------------|--|
| <i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i>  | MRS                      | petits antibiotiques, peptides et acides organiques        | <1000           | <i>E. coli</i> et <i>Streptococcus mutans</i>            |
| <i>Lb. acidophilus</i> 2181   | Lait                     | Acidoline  | ~200            | <i>Entérocoques</i>                                      |
| <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> DD14                        | Lait                     | Bulgaricane  | <700            | <i>Spectre large</i>                                     |
| <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> 7994                        | Lait                     | Composé non lactique avec un groupe possibilité aromatique | < 700           | <i>Pseudomonas fragi</i> et <i>Staphylococcus aureus</i> |
| <i>Lb. plantarum</i> VTT E-78076  | MRS                      | composés LMM   | <1000           | <i>Pantoea agglomerans</i>                               |
| <i>Lb. rhamnosus</i> GG   | MRS                      | composé like microcine                                     |                 | <i>Fusarium avenaceum</i>                                |
| <i>Lb. reuteri</i> 1063   | Glycérol                 | 3-Hydroxypropanal, forme hydratée et dimère (reutérine)    | 74<br>92<br>148 | <i>Spectre large</i>                                     |
| <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> DRC-1   | lait                     | composés cationiques                                       | 100 - 300       | <i>Pseudomonas</i> et <i>E. coli</i>                     |
| <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> S1-67/C | Extrait levure + glucose | Composés ninhydrines                                       | <b>385</b>      | <i>Spectre large</i>                                     |

Les phénomènes de compétition constituent la deuxième catégorie des interactions négatives fréquemment rencontrées lors de la fermentation du lait par une culture mixte. Certains nuppiments présents dans le lait en faibles quantités et indispensables à la croissance bactérienne, peuvent être consommés préférentiellement par un groupe microbien aux dépens d'un autre.

C'est le cas notamment des matières azotées nonprotéiques (NPN de l'anglais *Non-Protein-Nitrogen*) regroupant l'urée, des acides aminés, de courts peptides et les bases azotées adénine, guanine, uracile et xanthine.

La concentration en NPN dans le lait ne supporte la croissance que d'une faible densité cellulaire de bactéries lactiques. Juillard *et al.* (1990 et 1991) ont ainsi observé que la croissance d'une souche de lacto-coque dans le lait ayant déjà préalablement servi à la préculture de la souche était inférieure à celle réalisée dans du lait frais. Ce phénomène s'explique par l'épuisement de la fraction azotée de faible poids moléculaire durant la préculture (Juillard *et al.*, 1990).

### 13.2 Les phénomènes de stimulation :

Les phénomènes de stimulation sont divisés en plusieurs catégories. On distingue le commensalisme, lorsqu'une population est stimulée par la production d'une substance

essentielle ou la destruction d'un facteur inhibiteur par une autre population et le mutualisme ou la protocoopération, lorsque l'interaction est positive pour chacune des populations.

Dans le cas du mutualisme, l'interaction est nécessaire à la survie des populations contrairement à la protocoopération où l'interaction présente un caractère facultatif (Choisy *et al.*, 1997).

L'interaction entre les lactobacilles et les streptocoques thermophiles est particulièrement mise à profit pour la fabrication des yaourts. Dans un premier temps, les lactobacilles se développent puis, leurs activités protéolytiques et aminopeptidasique permettent de stimuler la croissance des streptocoques. Ceci se vérifie également pour des souches de lactocoques protéinase positive ( $\text{Prt}^+$ ) et négative ( $\text{Prt}^-$ ) associées en culture mixte. Certains variants de lactocoques présentent une déficience dans leur système protéolytique résultant, notamment, de la perte des plasmides codant en partie pour la protéinase de paroi ( $\text{Prt}^-$ ) et le système de transport Opp (Yu *et al.*, 1996).

En cultures mixtes dans le lait, la croissance des deux variants est similaire tant que la concentration en NPN est suffisante. Dans un second temps, lorsque la source de NPN est épuisée, la croissance du variant  $\text{Prt}^-$  est stimulée, comparativement à une culture pure, par l'activité protéolytique du variant  $\text{Prt}^+$  qui favorise la libération de fractions azotées de faible poids moléculaire utilisables directement par les cellules.

Cependant, l'hydrolyse des caséines par les souches  $\text{Prt}^+$  est trop faible pour assurer une croissance maximale des deux souches. Par conséquent, le développement du variant  $\text{Prt}^+$  se trouve inhibé par compétition pour les oligopeptides avec le variant  $\text{Prt}^-$  (Juillard *et al.*, 1994 et 1996).

L'association des deux types de variant est également profitable pour éviter les défauts d'amertume: les peptides amers générés par les protéinases des souches  $\text{Prt}^+$  pouvant être dégradés par l'activité aminopeptidasique des variants  $\text{Prt}^-$ . De nombreuses études ont également porté sur l'association de *Lactobacillus* NSLAB et de lactocoques afin de développer des arômes durant l'affinage des fromages (El Soda *et al.*, 2000).

#### **14. Les causes de la contamination du lait :**

Le lait peut être contaminé par divers micro-organismes de l'environnement (entérobactéries, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, microcoques, *Corynebactéries*, *Bacillus*) par l'intermédiaire du matériel de traite et de stockage du lait, par le sol, l'herbe ou la litière, des contaminations d'origine fécale peuvent entraîner la présence de *Clostridium*, coliformes et éventuellement d'entérobactéries pathogènes (*Salmonella*, *Yersinia*, *Helicobacter*, *Campylobacter*). Le lait d'animaux malades peut contenir des germes pathogènes pour

l'homme (*Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* qui est un agent de mammite infectieuse, *Brucella* qui est un agent de la fièvre de Malte, *Bacillus anthracis* qui est un agent de la maladie du charbon, *Listeria*) (Leyral et Vierling, 2007).

**Tableau 19:** La microflore du lait cru de vache (Leyral et Vierling, 2007)

| flore constante                                 |   | flore accidentelle  |   |
|---|---|---|---|
| bactéries des canaux galactophores              | bactéries contaminant le lait pendant et après La traite  | bactéries d'origine Fécale  | bactéries présentes sur l'animal malade   |
| <i>Lactobacillus</i><br>Streptocoques lactiques | <i>Pseudomonas</i><br><i>Flavobacterium</i><br>Enterobactéries microcoques<br>Corynebacteries<br><i>Bacillus</i><br><i>Streptococcus faecalis</i><br><i>Clostridium</i> | <i>Clostridium</i><br><br>Coliformes fécaux<br><i>Salmonella</i><br><i>Yersinia</i><br><i>Campylobacter</i> | <i>Streptococcus agalactiae</i><br><br><i>Staphylococcus aureus</i><br><i>Brucella</i><br><i>Listeria</i> |

## 15. Présentation des souches pathogènes

### 15.1 *Staphylococcus aureus* :

La maîtrise de la contamination des produits laitiers par *Staphylococcus aureus* est un enjeu économique et sanitaire pour l'ensemble des filières au lait cru, notamment caprine. La contamination du lait cru par *Staphylococcus aureus* peut être due à :

- un contact du lait avec des porteurs sains (gorge et voies nasales).
- un contact avec une personne symptomatique (furuncles et plaies suppurantes).
- mammite (inflammation de la mamelle d'origine bactérienne) (Lamontagne *et al.*, 2002).

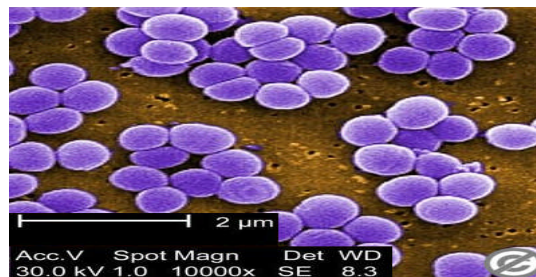
*Staphylococcus aureus* est l'agent principal causant les mammites bovines décrites par Hunter (1984) et caprines décrites par Kalogridou et Vassiliadou (1991) et pose donc un problème. Sanitaire pour l'homme. Valle (1990) a rapporté que 48.8% des souches de *Staphylococcus aureus* isolées du lait de chèvre était toxigène (Seifu, 2007). Des intoxications staphylococciques ont été attribuées au lait de chèvre, au lait en poudre et aux fromages.

Smith (1983) a montré que bien que *Staphylococcus aureus* soit détruit par le biais de la pasteurisation, les entérotoxines produites par les pathogènes pouvaient supporter la pasteurisation et causer ainsi l'intoxication. Park et Humphrey (1986) ont dénombré  $3.3 \times 10^3$  UFC /ml de *Staphylococcus* sp.

Dans le lait de chèvre. Chubb (1985) a détecté des souches coagulases positives dans 40% des échantillons du lait pris de façon aseptique de chèvres de Nouvelle Galles du Sud (Australie) qui ne montraient aucun signe de mammite.

Vassiliadou (1991) a rapporté que 59.1% d'échantillons de lait de chèvre cru en Grèce était positives aux souches. Harvey et Gilmour (1988) ont rapporté que les *Staphylococcus* étaient l'espèce prédominante isolée du lait de chèvre en Irlande du Nord (Seifu, 2007).

Seuls les staphylocoques coagulase positifs sont considérés comme pathogènes. Trois espèces peuvent coaguler le plasma du lapin oxalaté : *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus byicius*, l'espèce *aureus* est elle-même scindée en plusieurs biotypes selon l'origine animale de la souche (Leyral et Vierling, 2007).



**Figure 8 :** Aspect morphologique de la souche de *Staphylococcus aureus* observée au microscope électronique (Leyral et Vierling, 2007)

- **Pouvoirs pathogènes :**

*Staphylococcus aureus* est à l'origine de toxi-infections alimentaires car c'est une bactérie toxigène, elle produit entre autres des toxines thermorésistantes dans les aliments comme le lait cru de chèvre.

### 15.2 *Escherichia coli* :

Les souches d'*Escherichia coli* sont rarement pathogènes, à l'exception de certaines souches qui causent des diarrhées dans les pays en voie de développement, où elles touchent surtout les enfants, ces bactéries infectent également les voyageurs venant de pays industrialisés (Nauciel et Vildé, 2005). *Escherichia coli* est un commensal normal de l'intestin de l'homme et de l'animal (Goubau et Pellegrims, 2000).



**Figure 9:** *Escherichia coli* observés au microscope électronique (Gx10000) (Goubau et Pellegrims, 2000)

- **Mode de transmission :**

La bactérie se répand dans l'environnement par la voie des excréments. La présence d'*E.coli* dans les eaux et les aliments est le témoin d'une contamination fécale. La transmission se fait par voie féco-orale (Goubau et Pellegrims, 2000).

- **Pouvoirs pathogènes :**

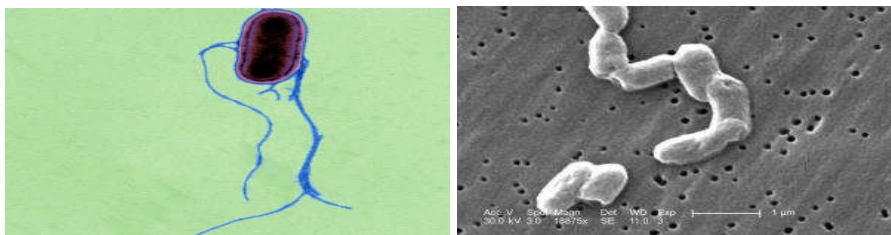
*E.coli* est la bactérie la plus fréquemment impliquée dans les infections urinaires, elle peut provoquer des diarrhées par des mécanismes très divers ainsi que diverses infections communautaires ou nosocomiales, initialement sensible à beaucoup d'antibiotiques, elle a acquis une résistance fréquente, surtout en milieu hospitalier (Nauciel et Vildé, 2005).

Les facteurs de virulence sont des flagelles et des pili qui permettent l'adhésion à la muqueuse intestinale ainsi qu'une capsule qui prévient la phagocytose et les entérotoxines (Goubau et Pellegrims, 2000).

Les colibacilles responsables d'entérites sont subdivisés en quatre catégories, au moins, en fonction du syndrome provoqué et du mécanisme pathogénique.

### 15.3 *Salmonella* :

La salmonellose (gastro-entérite à *Salmonella*) est causée par plus de 2000 sérovars de *Salmonella*, provoquant des symptômes fréquents, dont les douleurs abdominales, diarrhées, qui durent de quelques jours à quelques semaines. La salmonellose la plus fréquente est due à *Salmonella Typhimurium*. (Prescott *et al.*, 2003) Elle est rencontrée dans tous les pays elle est isolée chez l'homme, les animaux et dans l'environnement, elle occupe la première place dans l'étiologie des toxi-infections alimentaires (Avril *et al.*, 1992) .



**Figure 10:** Observation au microscope électronique de *Salmonella typhi* et *Salmonella infantis* (Gx10000) (Prescott *et al.*, 2003)

- **Mode de transmission:**

*Salmonella typhi* et *Salmonella paratyphi* infectent essentiellement l'homme et la transmission se fait au contact de malades atteints de la fièvre typhoïde ou des porteurs chroniques asymptomatiques. La contamination se fait par l'ingestion d'eau ou d'aliments souillés par les excréments des malades. La mortalité est élevée à cause du développement par les bactéries de résistances aux antibiotiques.

Les Salmonelles non typhiques comme *Salmonella enteritidis* ou *Salmonella Typhimurium* sont largement disséminés dans la nature et sont associés à un réservoir animal. La contamination se fait essentiellement par des aliments mal conservés ou infectés à partir de réservoirs d'animaux (Rampal, 2000).

**Tableau 20:** Aliments suspectés et agents responsables (Rampal, 2000)

| aliments                  | <i>S. enteritidis</i> | Autres Salmonelles |
|---------------------------|-----------------------|--------------------|
| Lait et produits laitiers | 6.3%                  | 4.4%               |
| Œufs et ovoproduits       | 56.6%                 | 30.4%              |
| Viandes et volailles      | 3.4%                  | 18.5%              |
| Poissons et fruits de mer | 2.9%                  | 7.6%               |
| Autres aliments           | 16%                   | 8.7%               |

#### 15.4 *Bacillus* :

Le genre *Bacillus* renferme des germes telluriques aérobies stricts ou aéro-anaérobies, sporogènes, se présentant sous forme de bâtonnets à Gram positif généralement mobiles. En dehors de *Bacillus anthracis*, les *Bacillus* sont habituellement considérés comme des germes de l'environnement et leur rôle en pathologie humaine est souvent négligé. En réalité, il est actuellement bien établi que certaines espèces du genre *Bacillus* peuvent être responsables chez l'homme de toxi-infections alimentaires ou, plus rarement, d'infections opportunistes. *Bacillus cereus* est le principal germe incriminé, mais d'autres espèces comme *Bacillus licheniformis* ou *Bacillus subtilis* peuvent également être mises en cause (Gaillard, 1989).

**Tableau 21:** Caractères bactériologiques de *Bacillus cereus* (Gaillard, 1989).

| Caractères bactériologiques  |                    |
|--|--------------------|
| Mobilité   | +                  |
| Hémolyse   | +                  |
| Aspect des colonies :<br>atmosphère normale<br>+ 5% de CO <sub>2</sub> | Rugueux<br>Rugueux |
| Pénicilline G (6µg/ml)   | Résistant          |

- **Pouvoir pathogène :**

Les toxi-infections alimentaires à *Bacillus* sont presque exclusivement dues à *B. cereus*. Elles représentent près de 5% de l'ensemble des toxi-infections alimentaires dans certaines statistiques anglo-saxonnes (Gaillard, 1989).

Deux aspects cliniques différents peuvent être observés :

- la première forme, la période d'incubation est de 8 à 16 heures et le symptôme exclusif ou principal est une diarrhée persistant 12 à 14 heures. De nombreux aliments peuvent être à l'origine d'un tel syndrome : viandes, légumes, sauces.... Ect.

- la seconde forme, la période d'incubation n'est que de 1 à 5 heures et les vomissements, cédant en 6 à 24 heures, sont au premier plan. Les intoxications alimentaires provoquées par *B. cereus* ne s'accompagnent pas de fièvre. L'évolution est toujours bénigne et ne nécessite le plus souvent aucun traitement particulier.

Des spores de *B. cereus* peuvent contaminer de nombreux produits : viandes, légumes. En cas de cuisson insuffisante, les spores restent viables et donnent naissance aux formes végétatives de la bactérie. Celles-ci peuvent ainsi se multiplier à une température située entre 15 à 50°C et élaborer leur toxines. Les symptômes diarrhéiques sont liés à la sécrétion d'une entérotoxine, constituée de plusieurs composés protéiques agissant probablement en synergie (Gaillard, 1989).

## **16. Propriétés inhibitrices des bactéries lactiques :**

### **16.1 Choix de microorganismes :**

La première étape essentielle réside dans le choix du microorganisme. Celui-ci doit être exempt de toute pathogénicité (Suvarna et Boby, 2005).

Toutefois ce genre de risque est pratiquement inexistant du fait que les microorganismes probiotiques ont trouvé de nombreuses applications dans l'industrie alimentaire (ces souches sont incorporées dans les yaourts, les dérivés lactés, les boissons, les fromages, les desserts réfrigérés et même dans le lait non fermenté) et ne présentent aucun danger pour l'homme, les animaux ou l'environnement (Bouziane *et al.*, 2004).

#### **16.1.1 Résistance aux conditions rencontrées au cours du transit digestif :**

Les bactéries probiotiques, pour être efficaces doivent parvenir vivantes au site de leur action, à savoir l'intestin, et donc résister aux différents mécanismes de défense de l'hôte. Les bactéries étant administrées par voie orale, il est nécessaire qu'elles franchissent les obstacles majeurs du transit digestif (Chafai, 2006) : Elles doivent résister aux enzymes présents dans la cavité buccale dont la principale est le lysozyme, au pH acide de l'estomac dû à la présence de forte concentration d'acide chlorhydrique, aux sucs pancréatiques et aux concentrations de bile et de mucus présentes dans l'intestin grêle (Malinen, 2002).

Les résultats des essais indiquent que diverses souches de lactobacilles, notamment : *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis* I 23 et *Lactobacillus fermentum* I 24 peuvent montrer une tolérance aux sucs gastriques et biliaires (Pereira *et al.*, 2003).

#### **16.1.2 Colonisation du tractus digestif et adhésion aux cellules intestinales :**

Il est intéressant que les souches probiotiques puissent adhérer aux cellules de la paroi intestinale, ceux-ci facilitant une bonne colonisation du tube digestif par les probiotiques

(Crittenden *et al.*, 2005). D'après les travaux de Sanna *et al.*, (2002), les lactobacilles (*Lb. crispatus* ST1, A33 et 134mi, *Lb. reuteri* CT7 et *Lb. gasseri* CT5) présentent une meilleure affinité aux cellules du jabot Gusils *et al.*, (2002), ont confirmé l'existence de différents déterminants de surface qui pourraient être impliqués dans les interactions entre des lactobacilles (*Lb. animalis*, *Lb. fermentum* et *Lb. fermentum* subsp. *cellobiosus*) et les cellules épithéliales intestinales (Chafai, 2006).

### 16.2 Activités antimicrobiennes :

Les probiotiques doivent essentiellement jouer deux rôles au niveau du tractus digestif : améliorer la digestibilité de la ration alimentaire et maintenir de bonnes conditions sanitaires. L'activité antimicrobienne des lactobacilles (*Lb. acidophilus*, *Lb. plantarum* et *Lb. brevis*) a été prouvé *in vitro* contre deux pathogènes entériques : *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium* (El-Nagger, 2004). L'effet inhibiteur de *Lactobacillus fermentum* sur *Escherichia coli*, sur *Salmonella typhimurium* et sur *Staphylococcus aureus* avait été démontré (Reque *et al.*, 2000).

Il est donc important que ces bactéries soient capables d'inhiber le développement des germes indésirables :

- Soit par la production de substances antagonistes de types bactériocines ou autre tels que les acides organiques et le peroxyde d'hydrogène (Lima *et al.*, 2005).
- Soit en empêchant l'adhésion des germes pathogènes aux cellules de la paroi intestinale; selon Hariharan *et al.*, (2004) l'emploi des probiotiques réduit la colonisation du tractus digestif par *Campylobacter jejuni* (Chafai, 2006).

### 16.3 Viabilité et stabilité des microorganismes :

C'est l'une des critères de sélection la plus importante. Pour que les probiotiques puissent exprimer ces diverses potentialités, il faut qu'elles atteignent leur site d'activité digestive dans les conditions les plus propices à leur efficacité, ce qui suppose qu'elles soient vivantes : cela induit des contraintes technologiques sévères au cours de concentration et de la dessiccation pour une présentation en poudre, et interdit le passage dans une presse à granuler (qui porte la température au dessus de 80°C à moins de faire appel à des enrobages thermorésistants (Klaenhammer, 2000).

## 17. Définition des interactions :

Les produits laitiers, en général, comme le lait fermenté ou les fromages sont les supports d'écosystèmes dont la composition évolue avec le temps. Les facteurs de sélection qui gouvernent cette évolution sont générés par l'activité métabolique des micro-organismes eux-



mêmes. Ceux-ci, à un instant donné, créent à la fois les conditions de leur déclin et celles favorisant l'installation d'autres groupes microbiens :

- ❖ par la production de substances inhibitrices ou au contraire celles de facteurs de croissance.
- ❖ par la modification de facteurs physico-chimiques, dont le pH. (Leyral et Vierling, 2007).

- **Interactions positives: synergie**

Le meilleur exemple en est l'effet coopératif entre deux espèces ; *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* qui jouent un rôle dans l'élaboration du yaourt. Au début de la fermentation, c'est le Streptocoque qui se développe le plus rapidement et produit différents acides (acide pyruvique, acide formique, acide lactique), l'adénine et une très faible quantité de CO<sub>2</sub>. L'abaissement progressif du pH et la présence de ces substances vont petit à petit activer la croissance du Lactobacille qui est plus acidophile. Celui-ci a une activité protéolytique plus importante que celle du Streptocoque et la libération d'acides aminés (valine, histidine, glycine, acide glutamique, leucine, méthionine) et des peptides vont les stimuler. Malheureusement pour le Streptocoque, ces interactions positives ne durent pas très longtemps, dans la mesure où il est beaucoup plus sensible au pH que le Lactobacille, sa croissance va être progressivement inhibée par l'acidité du milieu (Branger *et al.*, 2007).

- **Interactions négatives : inhibition**

L'un des avantages présentés par les bactéries lactiques est l'augmentation de la durée de conservation d'un produit alimentaire par la production de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, la reutéline, le diacétyl et les bactériocines (Dortu et Thonart, 2009).

### 17.1 Les acides organiques :

La production de l'acide lactique et de l'acide acétique et la diminution consécutive du pH sont de loin les plus importants facteurs d'inhibition (Adams et Moss, 2008).

Dans une étude menée par Jinet *et al.*, (1996), il est suggéré que l'inhibition de *Lactobacillus* à l'égard des souches pathogènes de *Salmonella* et de *Escherichia coli* est due à la production d'acides organiques par *Lactobacillus*.

Gudkow (1987) et Taylor, (2005) ont montré qu'*Escherichia coli* est inhibé par l'acide lactique à pH de 5.1.

L'inhibition de *E. coli* par *Lactobacillus* est due à un fort effet bactéricide de l'acide lactique à pH bas.

On admet que la première cause d'inhibition par l'acide lactique des bactéries lactiques est la réduction du pH qui inhibe la croissance de nombreuses bactéries, dont les organismes pathogènes Gram négatifs.

Fayol et Messaoudi (2005) ont observés une complète inhibition de la croissance de *Salmonella Typhimurium* cultivée en association avec différentes souches de *Lactobacillus* (*Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*) qu'ils ont attribué à une diminution du pH. De plus on a observé une inhibition par le biais du pH de l'adhésion de *Salmonella* à l'intestin. Lehto et Salminen (1997) ont conclu que les effets anti-adhésion des lactobacilles sur *Salmonella Typhimurium* étaient dus principalement à la réduction du pH (Pelaez et Martin-Orue, 2009).

Bien que le pH soit le principal facteur d'inhibition, il a également été démontré que les basses valeurs du pH gouvernent l'activité des acides organiques car les formes indissociées sont plus bactéricides (Acheson, 1999).

Les travaux de Holtzapfel *et al.* (1998) ont montré que l'acide indissocié est aisément diffusé à travers la paroi cellulaire bactérienne, réduisant ainsi le niveau du pH intracellulaire et ralentissant les activités métaboliques des bactéries (Taylor, 2005).

On a observé que les acides faibles ont une activité anti-microbienne plus importante à pH bas qu'à pH neutre (Salminen *et al.*, 1998).

En effet, la force d'un acide dépend de son degré de dissociation. Quand le pH est égal au pKa d'un acide, la moitié de l'acide est dissocié, si le pH augmente, la dissociation augmente de même (Adams et Moss, 2008).

A cause de sa constante de dissociation plus élevée, l'acide acétique montre une inhibition plus forte que l'acide lactique à une concentration molaire et à une valeur de pH donnés (Taylor, 2005). La forte activité anti-microbiennes des acides acétique et propionique s'explique en partie par le pKa élevé, comparativement à l'acide lactique, respectivement 4,87, 4,75 et 3,08. A pH 4, par exemple, seulement 11% de l'acide lactique est indissocié contre 85% d'acide acétique et 92% d'acide propionique. En présence d'un mélange d'acides, l'acide lactique contribue principalement à la réduction du pH, alors que les acides propionique et acétique devenus indissociés jouent leur rôle antimicrobiens (Salminen *et al.*, 1998).

Les travaux de Bohatier (1999) sur les taux de croissance des bactéries en fonction de l'acide acétique ont montré qu'il était fortement inhibiteur, il existe une concentration critique d'acide acétique pour laquelle la croissance des bactéries s'arrête et le taux de décès de la culture augmente très vite. Celle-ci dépend de la composition du milieu, le pH correspondant à cette concentration est compris entre 2,25 et 2,28.

Makras *et al.*, (2006) ont observés que l'activité anti-bactérienne de la souche de *Lactobacillus* contre *Salmonella* était due à l'effet de l'acide lactique et d'autres composants inhibiteurs, dont la proportion s'est élevée avec la diminution du pH (Pelaez et Martin-Orue, 2009).

Cependant, en plus de réduire le pH, l'acide lactique a le pouvoir de perméabiliser les membranes, de ce fait, il renforce l'activité des autres substances anti-microbiennes. (Salminen *et al.*, 1998).

Alakoni *et al.*, (2000) ont étudié l'effet de l'acide lactique sur la perméabilité de la membrane externe de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium* in vitro et ont observés qu'il perméabilise la membrane externe des Gram négatifs et ainsi, agit comme amplificateur des effets d'autres substances anti-microbiennes (Pelaez et Martin-Orue, 2009).

### **17.2 Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) :**

En présence d'oxygène, les bactéries lactiques sont capables de produire du peroxyde d'hydrogène par l'action des oxydases, de flavoprotéines et du superoxyde dismutase. Comme les bactéries lactiques ne produisent pas de catalase à cause de l'absence d'une source hème, cela permet l'accumulation du peroxyde d'hydrogène, mais pas dans des quantités significatives, parce qu'il est quand même décomposé par des peroxydases et pseudocatalases. Son effet bactéricide a été attribué à son pouvoir oxydant (Salminen *et al.*, 1998).

En effet, Juven et Pierson (1996) ont démontrés son effet cytotoxique sur la cellule bactérienne qui génère des espèces hautement toxiques, telles que le radical hydroxyle qui est à la base de l'oxydation des biomolécules (Taylor, 2005).

De plus certaines réactions produisant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> font disparaître l'oxygène, créant un environnement anaérobie non favorable à certains micro-organismes (Salminen *et al.*, 1998).

Le peroxyde d'hydrogène confère aux bactéries lactiques un avantage de compétition puisqu'il a été démontré qu'elles sont moins sensibles que d'autres bactéries à ses effets, mais l'effet inhibiteur du peroxyde d'hydrogène reste généralement faible (Adams et Moss, 2008). Le peroxyde d'hydrogène est une substance de préservation utilisée depuis longtemps pour le lait cru, dans des conditions où il peut être difficile de refroidir le lait rapidement. La concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> requise est de 300 à 800 ppm (Guizani, 2007).

### **17.3 Le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) :**

Le dioxyde de carbone est formé principalement durant la fermentation des hexoses par le processus d'hétérofermentation. Sa formation crée un environnement anaérobie et lui-même a une activité anti-microbienne, le mécanisme de cette activité est mal connu, mais il a été

suggéré que les décarboxylations enzymatiques étaient inhibées et que l'accumulation du dioxyde de carbone dans la bicouche lipidique causait un dysfonctionnement de la perméabilité membranaire (Salminen *et al.*, 1998).

#### **17.4 Le diacétyl (C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>) :**

Le diacétyl (2,3-butanédione) a été identifié par Van Niel *et al.*, composant aromatique du beurre, il est produit par les espèces et les souches du genre *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, de même que d'autres micro-organismes (Jay, 1982).

Le diacétyl a des propriétés anti-microbiennes qui sont dirigées contre les levures, les bactéries Gram négatives et les Gram positives non lactiques, ces dernières y sont néanmoins moins sensibles (El Ziney *et al.*, 1998).

Les concentrations nécessaires à l'obtention d'une inhibition sont de l'ordre de 100 ppm et supérieures à celles présentes dans le beurre et susceptibles de provoquer son arôme (2 à 7 ppm) (Caplice et Fitzgerald, 1999).

#### **17.5 La reutéline :**

La reutéline est sécrétée spécifiquement par *Lactobacillus reuteri*, elle a un spectre très large d'activité anti-microbiennes (antibactérien, antifongique, antiviral) (Axelsson *et al.*, 1989). Il a été démontré qu'elle inhibait les sous-unités de liaison des substrats de la ribonucléotide-réductase et de ce fait, qu'elle interférait avec la synthèse de l'ADN (Salminen *et al.*, 1998).

La reutéline est produite comme métabolite intermédiaire pendant la fermentation anaérobie du glycérol (El Ziney *et al.*, 1998).

La reutéline s'accumule dans le microorganisme producteur à haute concentration, elle est excrétée dans le milieu. Sa toxicité contre la cellule productrice limite sa production, certaines espèces comme *Lactobacillus reuteri* y sont plus résistantes (Vollenweider, 2004).

### **18. Bactériocines :**

Les bactériocines sont des composés de synthèse ribosomale produites par les bactéries dans le but d'inhiber la croissance des autres bactéries. Ces composés sont trouvés chez la plupart des espèces bactériennes étudiées jusqu'à aujourd'hui. Mais peu d'entre eux sont largement étudiés. En général, elles ont un spectre d'action restreint, inhibant seulement les bactéries voisines de la souche productrice. Les bactéries à gram<sup>+</sup> n'inhibent pas les bactéries à gram<sup>-</sup> et vice versa (Ouwehand et Vesterlund, 2004).

Habituellement, elles sont de faible poids moléculaire (mais des bactériocines à haut poids moléculaire sont également produites). C'est leur nature protéique et leur spectre d'inhibition étroit qui les distingue des antibiotiques (De Vuyst et Leroy, 2007).

Au cours des deux dernières décennies, la sécurité alimentaire est devenue un problème majeur, et de grands efforts ont été fournis pour identifier des bactériocines qui inhibent la croissance des germes pathogènes et nuisibles. Pour l'utilisation dans l'aliment la bactériocine doit être :

- Stable à la chaleur,
- Stable à l'acidité,
- Résistante aux protéases qui se trouvent dans l'aliment,
- Active pendant une période prolongée,
- En activité au pH de l'alimentation (4,5 à 7,0),
- Avoir un effet bactéricide que bactériostatique,
- Un large éventail d'hôtes, en inhibant plusieurs agents pathogènes et nuisibles (Fox *et al.*, 2000).

### 18.1 Classification des bactériocines

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

- **Classe I. Les lantibiotiques** : peptides de taille inférieure à 5 kDa, stables à la chaleur et qui contiennent des acides aminés inhabituels soufrés formés post-traductionnellement, c'est-à-dire la lanthionine, la  $\beta$ -méthyl lanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine. Ils peuvent être divisés en deux types : la classe IA qui comprend des peptides cationiques hydrophobes allongés contenant jusqu'à 34 acides aminés et la classe IB qui comprend les peptides globulaires chargés négativement ou sans charge nette et contenant jusqu'à 19 acides aminés. Certains lantibiotiques sont par ailleurs constitués de deux peptides agissant ensemble pour avoir une activité comme la lacticin 3147. La nisine, produite par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, est la bactériocine la plus largement étudiée de la classe I (Dortu et Thonart, 2009 et Rajaram *et al.*, 2010).
- **Classe II.** Peptides de taille inférieure à 10 kDa, stables à la chaleur, ne contenant pas d'acides aminés modifiés. Leur point isolélectrique varie entre 8 et 10. Cette classe est divisée en trois sous-classes. Les bactériocines de la sous-classe IIa contiennent entre 27 et 48 acides aminés et ont toutes une partie N-terminale hydrophobe contenant la séquence consensus YGNG ainsi qu'un pont disulfure et

une partie C-terminale moins conservée, hydrophobe ou amphiphile qui détermine la spécificité d'action. Elles ont toutes une activité contre *Listeria monocytogenes*. Certaines bactériocines de cette sous-classe contiennent également un deuxième pont disulfure dans leur domaine C-terminale qui semble être important dans la stabilisation de la structure tertiaire. Il semble par ailleurs qu'il leur conférerait une meilleure activité antimicrobienne, une meilleure résistance à l'exposition à des hautes températures et un spectre d'action plus large. La sous-classe IIb comprend les bactériocines ayant besoin de deux peptides pour avoir une activité. Deux types de bactériocines de classe IIb peuvent être distingués : le type E (*Enhancing*) où la fonction d'un des deux peptides est d'augmenter l'activité de l'autre et le type S (*Synergy*) où les deux peptides sont complémentaires. La sous-classe IIc contient les bactériocines ne pouvant pas être classées dans les autres sous-classes (Dortu et Thonart, 2009).

- **Classe III.** Protéines de taille supérieure à 30 kDa et sensibles à la chaleur. La structure et le mode d'action de ces bactériocines diffèrent complètement des autres bactériocines produites par les bactéries lactiques.
- **Classe IV.** Peptides requérant une partie carbohydratée ou lipidique pour avoir une activité. Aucune bactériocine de cette classe n'a été décrite (Dortu et Thonart, 2009).

Le tableau 22 montre les différentes classes de bactériocines avec leurs descriptions (Ouwehand et Vesterlund, 2004).

**Tableau 22 :** les classes des Bactériocines produites par les bactéries lactiques (Ouwehand et Vesterlund, 2004).

| Classe                           | Sous-classe | Description   |
|----------------------------------|-------------|---|
| <b>Classe I (lantibiotiques)</b> | A (1)       | Allongé, cationique, membrane active, la charge nette est légèrement + ou -.  |
|                                  | A (2)       | Allongé, cationique, membrane active, la charge nette est hautement -.  |
|                                  | B           | Globulaire, inhibe l'activité enzymatique.  |
| <b>Classe II</b>                 |             | Petite (<10 kDa), stabilité à la chaleur modérée. (100°C) à élevée (121°C), les peptides membrane actives ne contiennent pas la lantionine. |
|                                  | IIa         | Peptides <i>Listeria</i> active avec -Y-G-N-G-V-X-C- près de l' amino-terminus.   |
|                                  | IIb         | bactériocines deux-peptides.  |
|                                  | IIc         | bactériocines autres peptides.  |
| <b>Classe III</b>                |             | Grand (>30 kDa) protéines thermolabiles.  |
| <b>Classe IV</b>                 |             | Bactériocines complexes : protéines avec lipides et/ou carbohydrates.   |

## 18.2 Bactériocines de *Lactobacillus plantarum* :

La plupart des bactériocines produites par les lactobacilles, ont une gamme d'activité étroite. *Lb. helveticus* produit helveticine J et lacticine LP27. Helveticine J est une bactériocine.

inhabituelle, car elle est codée par l'ADN chromosomique et active à pH neutre (Joerger et Klaenhammer, 1986).

*Lb. acidophilus* produit de nombreuses bactériocines, y compris lacticines B et F et acidocine J1229 (Muriana et Klaenhammer, 1991) et *Lb. casei* produit la caseicine 80 et *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* produit lacticines A et B (Hoover et Chen, 2005).

Lactoline a été la première documentation d'une protéine à effet antagoniste produite par *Lb. plantarum* (Kodama, 1952). Après, d'autres travaux comme ceux d'Andersson (1986), ont montré que certaines bactériocines *Lb. plantarum* 83 inhibent *S. aureus* et les spheroplastes des bactéries à gram<sup>-</sup> (Hoover et Chen, 2005).

Récemment, un groupe de chercheurs japonais a découvert une nouvelle bactériocine, plantaricin ASM1 produite par *Lactobacillus plantarum* A-1 (Hata *et al.*, 2010). Le tableau VII présente quelques exemples de bactériocines produites par l'espèce *Lactobacillus plantarum*, et leur spectre d'action.

**Tableau 23:** Exemples des bacteriocines produites par *Lactobacillus plantarum*

| Bactériocines  | Souche productrice   | Activité antimicrobienne  |
|--|--|---|
| <b>Classe IIa</b><br>Pediocine PA-1/AcH/SJ-1                           | <i>Lb. plantarum</i> WHE92   | Etendu, <i>L. monocytogenes</i>   |
| <b>Classe IIb</b><br>Plantaricine EF Plantaricine JK<br>Plantaricine S | <i>Lb. plantarum</i> C11<br><i>Lb. plantarum</i> C11<br><i>Lb. plantarum</i> | <i>Leuconostoc</i> spp., <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> , <i>Lb. reuteri</i> , <i>Enterococcus</i> spp., <i>Pediococcus</i> spp., <i>Lactococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp., <i>Micrococcus</i> spp., <i>Propionibacterium</i> spp. et <i>Clostridium tyrobutyricum</i> |
| <b>Classe IIc</b><br>Plantaricin A                                     | <i>Lb. plantarum</i> C-11  | <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Leuconostoc</i> spp., <i>Pediococcus</i> spp. ; <i>Lc. lactis</i> . et <i>E. faecalis</i>  |

## 18.3 Mode d'action des bactériocines

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

### 18.3.1 Les lantibiotiques :

Les lantibiotiques interagissent avec la membrane cellulaire par des interactions électrostatiques ou par liaison à des récepteurs spécifiques tels que le lipide II (un decaprenyl-pyro-phosphoryl- MurNAc-pentapeptides-GlcNAc), un précurseur de peptidoglycane.

Suite à cette liaison, les lantibiotiques peuvent former des pores larges et non spécifiques dans la membrane cytoplasmique, ce qui va causer l'efflux rapide des petits composés cytoplasmiques tels que les ions, les acides aminés, l'ATP, etc. Cette augmentation de la perméabilité membranaire va conduire à la dissipation des deux composantes de la force proton motrice, à la cessation rapide des activités cellulaires et à la mort de la cellule. L'interaction avec le lipide II permet d'augmenter la stabilité des pores formés et de réduire la concentration du lantibiotique nécessaire à la formation des pores, mais peut également conduire à l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire (Dortu et Thonart, 2009). Les lantibiotiques de type A dissipent la force proton-motrice par formation de pores et interfèrent avec la synthèse des peptidoglycanes alors que la plupart des lantibiotiques de type B agissent par inhibition de la synthèse des peptidoglycanes. Néanmoins, certains forment également des pores dans la membrane des cellules cibles. La nisine, un lantibiotique de type IA, interagit avec le lipide II au niveau du MurNAc tandis que la mersacidine, un lantibiotique de type IB, interagit avec le GlcNAc du lipide II (Dortu et Thonart, 2009).

### **18.3.2 Les bactériocines de classe II :**

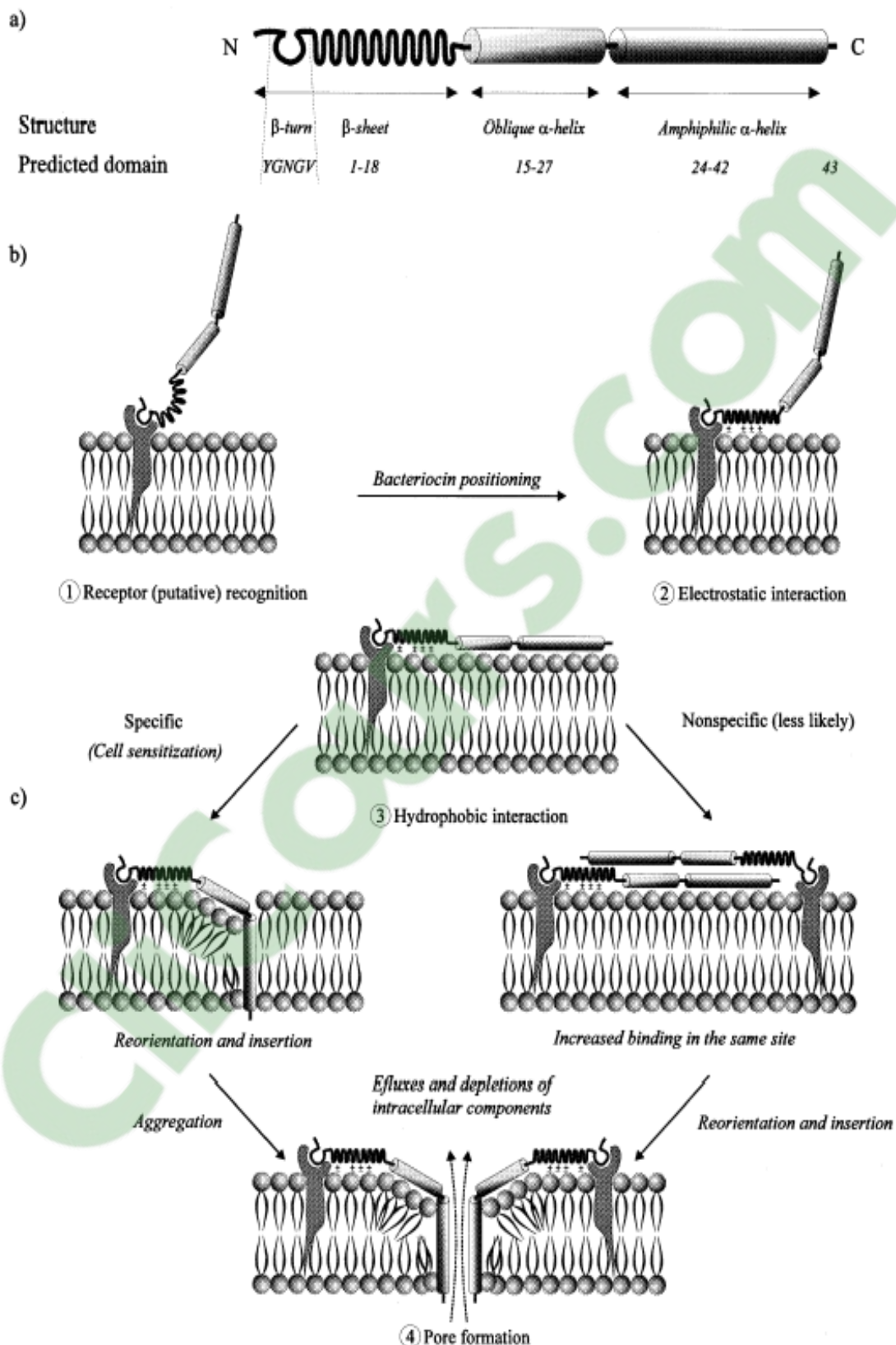
Le mécanisme d'action supposé des bactériocines de classe IIa est l'interaction de la bactériocine avec la membrane ou un récepteur spécifique, la « mannose perméase », pour ensuite former un pore dans la membrane de la cellule, ce qui induit la perméabilisation de la membrane, la dissipation des deux composantes de la force proton motrice et la mort de la cellule. Le mécanisme de formation des pores n'est pas connu, même si l'hypothèse la plus courante est l'association de différentes molécules de la bactériocine (Dortu et Thonart, 2009). La figure 11, montre le mécanisme d'action bactéricide de la pédiocine PA-1/AcH (Naidu *et al.*, 2006).

Les bactériocines de classe IIb ont en général un spectre d'action inhibant une large gamme de bactéries Gram+. Elles forment des pores et rendent la membrane perméable à différentes petites molécules, des cations monovalents ou des anions, ce qui dissipe une ou les deux composantes de la force proton motrice (Dortu et Thonart, 2009).

### **18.3.3 Les bactériocines de classe III**

Le mode d'action de ces bactériocines diffère complètement des bactériocines des autres classes. Par exemple, l'entérolysine A, la zoocine A et la milléricine B agissent par l'hydrolyse des liens peptidiques des peptidoglycanes des cellules sensibles. La zoocine A a un spectre d'action étroit alors que l'entérolysine A et la milléricine B ont un spectre d'action large. L'helvéticine J a un mode d'action bactéricide (Dortu et Thonart, 2009).





**Figure 11:** Modèle d'interaction pour la bactériocine de la classe IIa avec la membrane des cellules ciblées. (a) structure de la bactériocine. (b) positionnement de la bactériocine par des récepteurs (présumés) de reconnaissance, interactions électrostatiques et hydrophobes. (c) attachement de la bactériocine avec le site cible. (d) l'agrégation et la formation des pores hydrophobes (Naidu *et al.*, 2006).

**Tableau 24:** Les principales bactériocines produites par certaines espèces de bactéries lactiques littérature (Dortu et Thonart, 2009).

| Dénomination       | Espèce productrice                               | Espèces sensibles   |
|--------------------|--|---|
| Nisine             | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>   | <i>Lactococcus</i> , bactéries Gram positif (dont <i>Clostridium</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Listeria</i> )  |
| Lacticine 481      | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>   | <i>Lactococcus</i> , <i>Lactobacillus</i><br><i>Leuconostoc</i> , <i>Clostridium</i>  |
| Diplococcine       | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> | Lactocoques   |
| Lactostrepcine (S) | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>   | <i>Lactococcus</i> , Streptocoques hémolytiques,<br><i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Leuconostoc</i> ,<br><i>Clostridium</i> , <i>Listeria</i>  |
| Lactocidine        | <i>Lactococcus fermentum</i>                     | <i>Lactobacillus</i>  |
| Lactocine 27       | <i>Lactobacillus helveticus</i>                  | <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i>  |
| Helveticine        | <i>Lactobacillus helveticus</i>                  | <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus lactis</i>   |
| Lactacine B        | <i>Lactobacillus acidophilus</i> N2              | <i>Lactobacillus leichmanii</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus lactis</i> ,<br><i>Lactobacillus helveticus</i>  |
| Lactacine F        | <i>Lactobacillus acidophilus</i> SS              | Id+ <i>Lactobacillus fermentum</i> +<br><i>Enterococcus faecalis</i>  |
| Plantaricine A     | <i>Lactobacillus plantarum</i>                   | <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>Leuconostoc paramesenteroides</i>  |
| Pediocine A        | <i>Pediococcus pentosaceus</i>                   | <i>Clostridium botulinum</i> , <i>Clostridium sporogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> ,<br><i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> ,<br><i>Leuconostoc</i> , <i>Pediococcus</i> |

## 19. Biopréservation des produits laitiers :

Les espèces de *Listeria monocytogenes* sont responsables de plusieurs intoxications associées avec les produits laitiers, tel que le lait pasteurisé (Flamand *et al.*, 1985) et le fromage (James *et al.*, 1985). La nisine a montré son efficacité contre *L. monocytogenes* dans les produits laitiers. Ferreira et Lund (1996) ont trouvés qu'après inoculation d'une souche résistante à la nisine dans du fromage blanc de longue durée de conservation à pH 4.6 à 4.7, le nombre de *L. monocytogenes* décroît approximativement 1-Log ufc/ml pendant le stockage à 20°C pour 7 jours. L'addition de nisine (2000 IU/g) au fromage blanc augmenterait le taux d'inactivation d'approximativement 3-Log ufc/ml dans 3 jours.

Davies *et al.*, (1997) ont déterminés l'efficacité de la nisine pour contrôler *L. monocytogenes* dans les fromages du type ricotta de plus de 70 jours à 6-8°C. L'addition de la nisine (100 UI/ml) inhibe efficacement la croissance de *L. monocytogenes* pour une période de 8 semaines ou plus (dépendant sur type de fromage). Le fromage témoin contient des niveaux dangereux du microorganisme après 1 à 2 semaines de stockage.

Zottola *et al.*, (1994) utilisent le fromage du cheddar contenant la nisine produite par un lactocoque comme composant du fromage au lait pasteurisé. La durée de vie du fromage au

lait pasteurisé (301 et 387 UI/g de nisine) était considérablement plus grande que celle de l'échantillon témoin de fromage. Dans le fromage en paquet réfrigéré, la nisine (100 et 300 IU/g) a réduit largement le nombre de *L. monocytogenes*, *S. aureus*, et des spores de *C. sporogenes* ayant subi un choc thermique. Un autre problème dans la production fromagère est la fermentation butyrique des *Clostridium*.

La nisine est ajoutée fréquemment aux fromages du lait pasteurisé pour prévenir la germination des spores de *Clostridium*, tel que *Clostridium tyrobutyricum* (Schillinger *et al.*, 1996).

Une application de la lacticine 3147, une bactériocine à large spectre et à deux 2 composants produits par *Lc. lactis* subsp. *lactis* DPC 3147, est le maintien de la qualité du cheddar en réduisant le nombre de bactéries lactiques de la population exogènes aux ferments pendant la maturation (Ross *et al.*, 1999). Le fromage produit avec *Lc. lactis* 3147 DPC4275 transconjugée productrice de lacticine 3147, contient 2 Log ufc/ml de bactéries lactiques exogènes aux ferments que dans l'échantillon témoin après 6 mois de maturation.

De plus, le fromage fabriqué avec 3 souches productrices de lacticine 3147 n'avait aucune bactérie lactique exogène à la culture initiale détectable sur la même période. Dans le fromage blanc la population de *L. monocytogenes* a été réduite de 3-Log ufc/ml sur une période d'une semaine de maturation que lorsqu'il a été fabriqué avec *Lc. lactis* DPC4275; cependant, le nombre de *Listeria* dans l'échantillon témoin fabriqué par culture non productrice de lacticine 3147 restes inchanger ( $10^4$  ufc/g).

La culture transconjugante produisant la lacticine 3147 a aussi été utilisée comme une culture protectrice pour inhiber *Listeria* sur la surface d'un fromage à maturation par les moisissures. La présence de la souche productrice de la lacticine 3147 sur la surface du fromage a réduit le nombre de *L. monocytogenes* de 3-Log ufc/ml (Ross *et al.*, 1999).

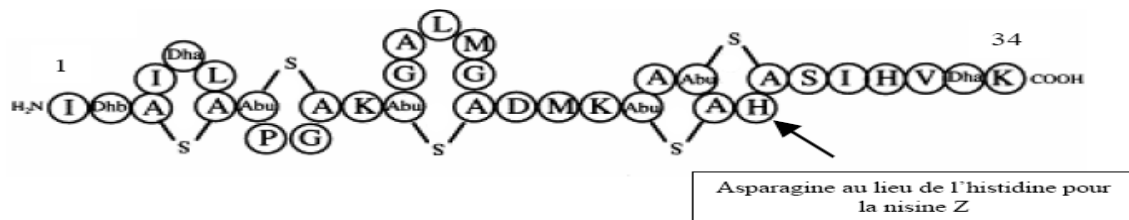
## 20. Model type de bacteriocine : La nisine

La nisine est un agent antimicrobien produit par quelques souches de *Lc. lactis* sp. Elle appartient au groupe des bactériocines définies par Tagg *et al.*, (1976) comme des composés protéiques ayant une activité inhibitrice contre des souches phylogénétiquement proches de la souche productrice. De nombreuses bactériocines répondent à cette définition mais certaines d'entre elles présentent un spectre d'activité plus large s'étendant à des souches plus éloignées. La nisine fut découverte en 1928 par Rogers lorsqu'il s'aperçut qu'un métabolite produit par *Streptococcus lactis* (*Lc. lactis* dans la nouvelle nomenclature) possédait une activité inhibitrice contre d'autres bactéries lactiques. La nisine appartient à la classe I des bactériocines (Klaenhammer, 1993).

Cette classe regroupe les composés protéiques d'une taille inférieure à 5 kDa et contenant les acides aminés modifiés thioéther lanthionine et méthyllanthionine et des acides aminés déshydratés tels que le didéshydrobutyrine (Dhb) et didéshydroalanine (Dha). Le terme lantibiotique (par contraction des mots lanthionine et antibiotique) leur est généralement réservé (Sahl *et al.*, 1998).

- **Propriétés physico-chimiques :**

La nisine est un peptide de 3488 Da constitué de 34 acides aminés dont la structure est représentée à la Figure 12. Les molécules de nisine peuvent s'assembler en dimères ou oligomères de 7000 à 14000 Da via des réactions intermoléculaires entre les résidus Dha et Dhb. La conformation en anneaux des lanthionines assurerait la rigidité du peptide, diminuerait sa sensibilité à la protéolyse et augmenterait sa résistance à la chaleur (Mc Auliffe *et al.*, 2001).



**Figure 12:** Structure de la nisine A et de la nisine Z (Mc Auliffe *et al.*, 2001).

Mulders *et ses collaborateurs* en 1991, ont isolés un variant naturel de la nisine A, la nisine Z, qui diffère par un acide aminé en position 27. La spécificité de l'activité antimicrobienne des deux variants est identique. Cependant, des tests d'activité menés par la technique de diffusion en gélose et des concentrations en bactériocines supérieures à 0.1 µg/ml ont montré que la nisine A donnait des zones d'inhibition d'un diamètre inférieur à celles de la nisine Z à concentrations identiques. Cette différence s'explique pas une meilleure diffusion de la nisine Z dans l'agar (de Vos *et al.*, 1995).

La solubilité de la nisine est fonction du pH et de la force ionique de la solution. En-dessous de pH 5, la nisine A présente une solubilité supérieure à celle de la nisine Z. Dans des conditions de pH neutre ou basique, la solubilité des deux variants est comparable. Le pH influence de façon importante la stabilité de la nisine à la température (Rollema *et al.*, 1995). La nisine dans une solution à pH 5.0 et 6.8 perd respectivement 40 et plus de 90 % de son activité après un autoclavage à 115.6°C, alors qu'à pH 2 aucune diminution de l'activité n'est observée (Hurst, 1981).

- **Biosynthèse:**

Trois classes de transposons d'une taille de 70 kb contenant les gènes responsables de la synthèse de nisine ont été identifiés chez *Lc. lactis* sp (Rauch *et al.*, 1994). Les classes I et II regroupent les transposons conjugatifs portant respectivement les gènes *nisA* et *nisZ* codant pour le prépeptide de la nisine A et Z.

Les membres de la classe III contiennent le gène *nisZ* et sont non conjugatifs. Les transposons portent également les gènes des protéines impliquées dans les modifications post-traductionnelles du prépeptide (*nisB*, *nisC* et *nisP*), la sécrétion du peptide mature (*nisT*), de l'immunité de la souche productrice à la bactériocine (*nisI*, *nisF*, *nisE* et *nisG*) et des facteurs de régulation de la transcription (*nisK* et *nisR*). La production de nisine évolue en fonction de la phase de croissance. Elle débute au milieu de la phase exponentielle pour atteindre un maximum de la fin de cette phase de croissance au début de la phase stationnaire (Kleerebezem *et al.*, 2001).

La régulation se fait au niveau de la transcription par un système de type "quorum sensing" (Kleerebezem, 2004). La production de bactériocine est également influencée par les facteurs environnementaux, notamment le pH et l'aération du milieu de culture. L'aération stimule la production de nisine Z par *Lc. diacetylactis* UL719 tandis qu'elle possède un effet antagoniste pour la nisine. Hurst (1981), Amiali *et al.* (1998) ont observé une diminution de 50 % de la concentration en nisine Z, produite par *Lc. diacetylactis* UL719, lorsque la souche est cultivée à un pH de 5.0 comparativement aux pH 5.5, 6.0 et 6.5.

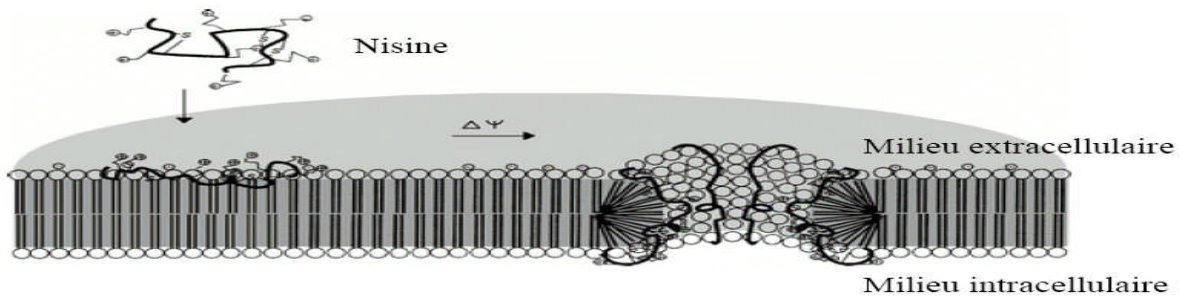
Pour d'autres souches productrices de nisine, différents auteurs ont mis en évidence une augmentation du titre en bactériocine pour des cultures effectuées sans contrôle de pH ou dans des milieux non tamponnés (Guerra *et al.*, 2003).

- **Spectre d'activité et modes d'action :**

Parmi toutes les bactériocines, la nisine possède un spectre d'activité très large incluant des souches de *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Pediococcus* et *Staphylococcus* ainsi que des cellules végétatives et des spores de *Clostridium* et *Bacillus* (Meghrouh *et al.*, 1999).

Dans des conditions normales, les bactériocines produites par des bactéries Gram positif n'ont pas d'effet bactéricide sur des espèces Gram négatif. Cependant, la nisine présente une activité inhibitrice contre des souches de *Helicobacter pylori* et *Neisseria* (Mota-Meira *et al.*, 2000) et de *Salmonella* en présence d'EDTA. La première cible de la nisine se situe au niveau de la membrane cytoplasmique des souches sensibles.

Des deux modèles proposés dans la littérature pour expliquer la formation des pores transmembranaires par la nisine, celui de Driessen *et al.* (1995) et Van den Hooven *et al.* (1996) est généralement retenu (Sahl *et al.*, 1998). Ce modèle est représenté à la Figure 13.



**Figure 13** : Modèle de formation d'un pore transmembranaire par la nisine (Sahl *et al.*, 1998).

Les forces d'attraction électrostatiques entre les charges négatives des têtes phospholipidiques de la membrane et les charges positives des résidus de lysine de l'extrémité C-terminale de la nisine serait à l'origine des interactions entre les molécules de nisine et la membrane (Breukink *et al.*, 1998). Le caractère amphiphile de la nisine lui permettrait ensuite de s'insérer dans le feuillet externe de la bicouche lipidique (Van den Hooven *et al.*, 1996). L'accumulation de plusieurs molécules de nisine au même point conduirait à la formation d'un pore. Tout en restant attachées à la surface, les molécules de nisine se déplaceraient à travers la membrane, en réponse au potentiel électrique, entraînant avec elles les lipides de la couche externe du côté cytoplasmique (Moll *et al.*, 1996).

La formation transitoire de ces pores s'accompagne d'une rupture de la force proton motrice par dissipation du potentiel électrique transmembranaire ( $\Delta\Psi$ ) et du gradient de pH conduisant à l'arrêt de toutes biosynthèses (Montville *et al.*, 1994).

Les pores entraînent également le passage dans le milieu extracellulaire d'ATP, d'acides aminés, de potassium et de phosphate inorganique (Abee *et al.*, 1994).

Le deuxième mode d'action de la nisine est l'inhibition de la biosynthèse de la paroi cellulaire (Reisinger *et al.*, 1980). Cette inhibition résulterait de la formation d'un complexe entre le précurseur lipidique membranaire du peptidoglycane, le lipide II, et les molécules de nisine. Le lipide II est également la seule cible spécifique de la nisine pour la formation de pores (Mc Auliffe *et al.*, 2001).

Cette association engendrerait des pores stables et uniformes composés de 8 molécules de nisine et 4 de lipides II selon un nouveau modèle proposé par Hasper *et al.* (2004).

L'implication du Dha situé en 5<sup>ème</sup> position sur la molécule de nisine a clairement été démontrée dans la capacité de la bactériocine à inhiber le développement des spores (Chan *et al.*, 1996). La double liaison du résidu Dha interagirait avec des facteurs associés à la

sporulation (Liu *et al.*, 1993). La nisine active également des facteurs reliés à l'autolyse de cellules sensibles.

- **Application de la nisine :**

La nisine est une bactériocine (peptide antimicrobien) produite par certaines bactéries du genre *Lactococcus lactis*. C'est un peptide de 34 acides aminés, il est actif contre certaines bactéries pathogènes des aliments, notamment les *Listeria* les *Bacillus* et les *Clostridium* et elle est utilisée commercialement en tant qu'agent de conservation dans les conserves et certains fromages (Harris *et al.*, 1991).

Les conditions d'application de la nisine sont liées à son spectre d'action, ainsi que le pH doit être inférieur à 7. Les raisons qui peuvent permettre l'utilisation de la nisine comme additif alimentaire sont les suivants :

- Elle est produite par un organisme normalement utilisé dans les fermentations alimentaires.
- La nisine résiduelle dans les aliments est dirigée, elle est en effet sensible à la chymotrypsine.

Des tests effectués en Grande Bretagne et en URSS conclus à l'absence de toxicité.

## **21. Possibilité d'utilisation dans les produits laitiers :**

L'application de cette propriété de *Lactococcus lactis* de produire de la nisine a été d'abord envisagée pour l'inhibition de *Clostridium trybutyricum* dans les fromages et divers travaux anciens ont confirmé cette possibilité mais la sensibilité des souches nisinogemes aux plages de la sensibilité des ferments à la nisine rend la problématique de l'utilisation du procédé. Cependant, Liinska (1997), en utilisant des souches productrices de nisine en combinant avec des ferments résistants à la nisine a obtenu 90% de fromage de très bonne qualité, alors que parmi les témoins 59% des fromages étaient butyriques.

La nisine est également utilisée dans les fromages fondus, Somers et Taylor (1987) ont montrés que la nisine était efficace dans la prévention de la formation de toxine de *C. botulium* dans les fromages fondus possédant un taux d'humidité supérieur à 50%. La nisine est également utilisée pour améliorer la conservation des produits laitiers contenant du chocolat, dans les yaourts pour éviter la forte acidification et dans le « cottage cheese » pour inhiber le développement de souches de *Bacillus* et de *Listeria monocytogènes* (Bayoumi, 1991).



## 1. Provenances des échantillons :

Les échantillons du lait cru de chèvre proviennent des fermes d'élevage se situant dans la ville d'Es-Senia, de la région d'Oran. Les prélèvements de lait dérivent de chèvres des populations Makatia et de la population Arabia. Les prélèvements sont réalisés sur une période de quatre ans, de 2007 à 2011, dans des conditions aseptiques puis amenés le jour même au laboratoire pour analyse microbiologique.

Après lavage à l'eau savonneuse, rinçage à l'eau javellisée puis séché avec une lingette stérile du pis (sans trayons) de la chèvre, le lait a été recueilli dans des flacons stériles (100 ml/flacon) dès les premiers jets puis échantillonné durant la même période pour cause de disponibilité fourragère durant quatre ans au mois de Mars (2007 pour les variétés Makatia, 2011 pour les variétés Makatia et la variété Arabia). L'enrichissement est réalisé en incubant les échantillons à 30°C pendant 24h (Badis *et al.*, 2004)



**Figure 14** : Prélèvement des échantillons du lait à partir des chèvres de la race Arabia de la ville Es-Senia de la région d'Oran.

## 2. Provenance des bactéries pathogènes :

Neuf souches pathogènes ont été utilisées dans cette étude : trois souches de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923, ATCC 29213 et ATCC 43300), *Listeria ivanovii* ATCC 19119, *Escherichia coli* ATCC 25921, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter calcoaceticus* et *Salmonella enterica*, proviennent du laboratoire central médical du CHU Oran, sauf les souches de *Listeria* qui proviennent du Department of Analytical chemistry, Nutrition and Food Sciences, University of Santiago de Compostela (Espagne).

## 3. Isolement des bactéries lactiques:

Les milieux utilisés au cours de ce travail étaient soit des milieux liquides, soit des milieux solides additionnés d'agar-agar à 2% pour les milieux solide et 0,7% pour les géloses molles. Le milieu MRS à pH=6,8 a été utilisé pour la croissance de la microflore lactique totale, les lactobacilles sont énumérés sur milieu MRS acidifié à pH=5,4 (De Man *et al.*, 1960).



La stérilisation des milieux est réalisée par autoclave à 121°C pendant 20 min. Le milieu lait est stérilisé à 110°C pendant 10 min.

### **3.1 Préparation des suspensions de dilution**

Après coagulation du lait des suspensions de dilutions décimales dans l'eau physiologique (NaCl 0,9%) ont été préparées. Pour les besoins du comptage en milieu solide trois dilutions seront choisies  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  et  $10^{-9}$  afin d'obtenir un nombre de colonies variant entre 25 et 250 colonies, l'ensemencement se fait en profondeur. Après solidification des milieux, les boîtes de Petrie sont incubées à 30°C pendant 48h.

### **3.2 Purification des isolats de bactéries lactiques**

Après croissance et comptage des colonies en boîte et par dilution, On prend de chaque boîte 10 colonies isolées sur lesquelles sera effectuée une coloration de Gram et une recherche de la catalase. Les bactéries à Gram<sup>+</sup>, catalase<sup>-</sup> et non sporulées sont retenues et repiquées sur bouillon MRS. L'opération est renouvelée jusqu'à l'obtention d'une culture pure dont la pureté est estimée par observation microscopique après coloration de Gram (Balows *et al.*, 1992, Curk *et al.*, 1996 et Heleni *et al.*, 2006).

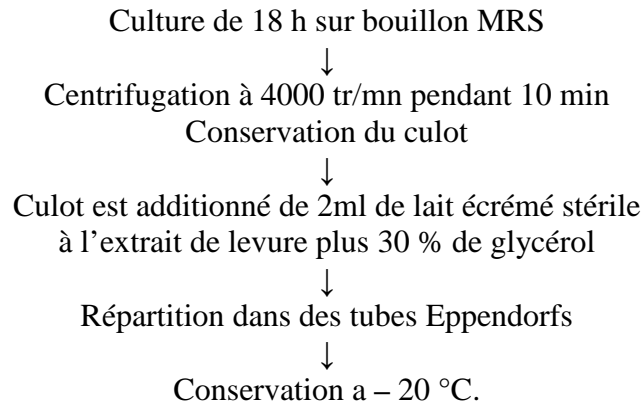
### **3.3 Conservation des isolats**

#### **3.3.1 La conservation à court terme :**

La conservation des isolats purifiés est réalisée par ensemencement sur gélose inclinée. Après incubation à 30°C pendant 18 heures, les tubes sont conservés à + 4°C, Le renouvellement des cultures se fait tous les trois semaines (Saidi *et al.*, 2002).

#### **3.3.2 La conservation à long terme :**

A partir des jeunes cultures (18-48 h) sur milieu liquide, les cellules sont récupérées par centrifugation à 4000 t/min pendant 10 min. Une fois le surnageant éliminé, on ajoute le milieu de culture de conservation sur le culot. Le milieu de conservation contient du lait écrémé, 0,2% d'extrait de levure et 30% de glycérol. Les cultures sont conservées en suspension dense et en tubes Eppendorfs à -20°C. Indiquent que des suspensions très concentrées résistent mieux à la congélation. En cas de besoin, les cultures sont repiquées dans le lait écrémé à 0,5% d'extrait de levure, avant utilisation (Saidi *et al.*, 2002).



**Figure 15:** Conservation de longue durée des bactéries lactiques purifiées (Saidi *et al.*, 2002)

#### 4. Tests d'orientation pour l'identification des bactéries lactiques :

Sur chacune des boîtes servant aux dénombrements, nous classons les colonies en catégories selon leur aspect macroscopique. Le pourcentage de chaque type de colonie est noté pour chaque dénombrement. Dans chaque catégorie, nous choisissons aléatoirement une colonie supposée représentative parmi celles, observées pour réaliser les premiers tests d'orientation.

Chaque colonie suspectée est une bactérie lactique et purifiée deux fois par isolement sur le milieu MRS gélosé (incubation en aérobiose 48 h à 30°C). Des cultures pures issues de ces isolements sont réalisées pour stocker les souches à -20°C, dans un milieu MRS contenant du glycérol pour des analyses ultérieures. Pour une identification préliminaire des bactéries lactiques, nous nous sommes basés sur des études :

- Microscopiques (les formes caractéristiques des cellules microbiennes, leur arrangement, la présence ou non de spore et leur coloration de Gram).
- De la mobilité, du test de catalase et du type fermentaire.

##### 4.1 Identification des souches de bactéries lactiques :

Suite à la purification des isolats, vingt huit souches ont été retenues, dont nous avons étudié les genres conformément au protocole de Carr *et al.*, (2002).

###### 4.1.1 Étude macroscopique :

Une observation macroscopique permet de décrire l'aspect des colonies, obtenues sur milieu solide (taille, pigmentation, contour, aspect, viscosité).

###### 4.1.2 Étude microscopique:

L'observation microscopique au grossissement (G x100) permet de classer les bactéries selon leur Gram, leur morphologie cellulaire, leur mode d'association (Joffin et Leyral, 1996).

### 4.1.3 Coloration de Gram :

Nécessaire à l'observation microscopique car elle nous oriente suite aux formes observées vers les démarches à suivre pour les autres tests. Cette étape sert à colorer les bactéries Gram<sup>-</sup> en rose et les Gram<sup>+</sup> en violet.

## 4.2 Critères physiologiques

### 4.2.1 Test du NaCl et du pH :

Effectué en parallèle avec la catalase, et dans le même but (différencier les enterocoques des lactocoques et des leuconostocs). Il nécessite l'emploi de deux milieux MRS liquides ; l'un contenant 6,5% de NaCl (6,5g de NaCl par 100ml de milieu) et en incubé à 28°C pendant 24h à 48h, et l'autre MRS à un pH de 9,6 (Carr *et al.*, 2002 et Mathara *et al.*, 2004). Dans lesquels on a ensemencé les souches ayant une forme cocci. Ces deux paramètres sont très caractéristiques des entérocoques qui sont les seuls à pouvoir croître dans ces deux milieux. Nous avons utilisé aussi un milieu MRS à 4% de NaCl pour l'ensemble des souches, ainsi qu'un autre MRS à 8% de NaCl pour les bacilles, la procédure est la même que pour les tests cités ci-dessus.

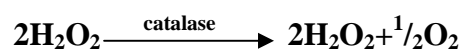
### 4.2.2 Test des températures de croissance et de thermorésistance :

On a ensemencé les isolats dans du MRS<sub>6,8</sub> liquide et qu'on a incubé à 15°C et à 45°C Carr *et al.*, (2002), de plus une troisième série de tube à subir un chauffage à 63°C au bain Marie pendant 30 min puis on a incubé à 30°C pendant 24h à 48h (Badis *et al.*, 2004). Ces tests vont nous aider à distinguer les souches mésophiles des thermophiles, ainsi que les thermorésistantes.

## 4.3 Critères biochimiques

### 4.3.1 Test de la catalase :

Pour différencier les lactocoques ou leuconostocs (catalase<sup>-</sup>) des entérocoques (catalase<sup>+</sup>) ; les lactocoques comme la majorité des bactéries lactiques sont des microaérophiles et n'ont pas besoin de synthétiser la peroxydase contrairement aux entérocoques qui sont aérobies. Le test consiste à verser une goutte de peroxyde d'hydrogène dilué au dixième, sur une lame de verre et d'y ajouter, à l'aide d'une pipette pasteur, une colonie développée sur gélose MRS s'il y a effervescence l'activité de l'enzyme catalase est positive (Cat<sup>+</sup>) qui décompose le peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante :



Le contraire est négatif (Larpen *et al.*, 1990).

#### **4.3.2 Etude du métabolisme azoté (recherche de l'arginine déshydrogénase (ADH)) :**

Le milieu utilisé pour ce test est le M16 BCP (milieu M16 solide avec un indicateur de pH qui est le pourpre de bromocrésol). Les bactéries qui possèdent l'ADH (Arginine Déshydrogénase) vont acidifier le milieu en fermentant le lactose (le BCP va virer au jaune), puis en déshydratant l'arginine, elles vont réalcaliniser le milieu et de ce fait la couleur du BCP redeviendra violet. Les bactéries qui ne possèdent pas cette enzyme vont seulement acidifier le milieu (Thomas, 1973).

#### **4.4 Etude du profil fermentaire :**

L'étude de la fermentation des dix sept sucres suivants a été effectuée : arabinose, glucose, galactose, lactose, maltose, mannitol, raffinose, saccharose, xylose, esculine, sucrose, fructose, cellobiose, melibiose, sorbitole, ribose, mannose.

La suspension bactérienne est obtenue à partir d'une preculture sur milieu MRS qui est incubé à 30°C pendant 18h, 2ml de la culture jeune est centrifugé à 5000 t/min pendant 5min. Le culot contenant les cellules bactériennes est ensuite lavé deux fois avec de l'eau physiologique pour éliminer les traces du milieu de culture. Ensuite, 2 ml de MRS BCP (milieu MRS sans sucre avec un indicateur de pH : le pourpre de bromocrésol) sont ajoutés au culot ce qui représente l'inoculum. 17 carbohydrates sont répartis séparément dans des tubes à hémolyse à raison de 100 µl de sucre dans 1 ml de MRS BCP, auxquels on ajoute 100 µl de l'inoculum (Manu *et al.*, 2002 et Guessas et Kihal, 2004).

Les conditions d'anaérobiose sont assurées par ajout d'une couche d'huile de paraffine à la surface et l'incubation se fait dans des conditions optimale 30°C, pendant 48h (Guessas et Kihal, 2004). Le trouble du milieu accompagne le virage au jaune de l'indicateur de pH du à l'acidification du milieu, traduit la fermentation du sucre test. Ainsi, le profil fermentaire d'une souche donnée est comparé aux profils-types donnés par la littérature, ce qui permet l'identification de la bactérie selon (Carr *et al.*, 2002 et Klein *et al.*, 2004).

L'identification complète de nos souches bactériennes a été achevée selon les schémas de systématique illustrée dans le schéma illustre dans les figures 16 ,17 et 18 suivantes.

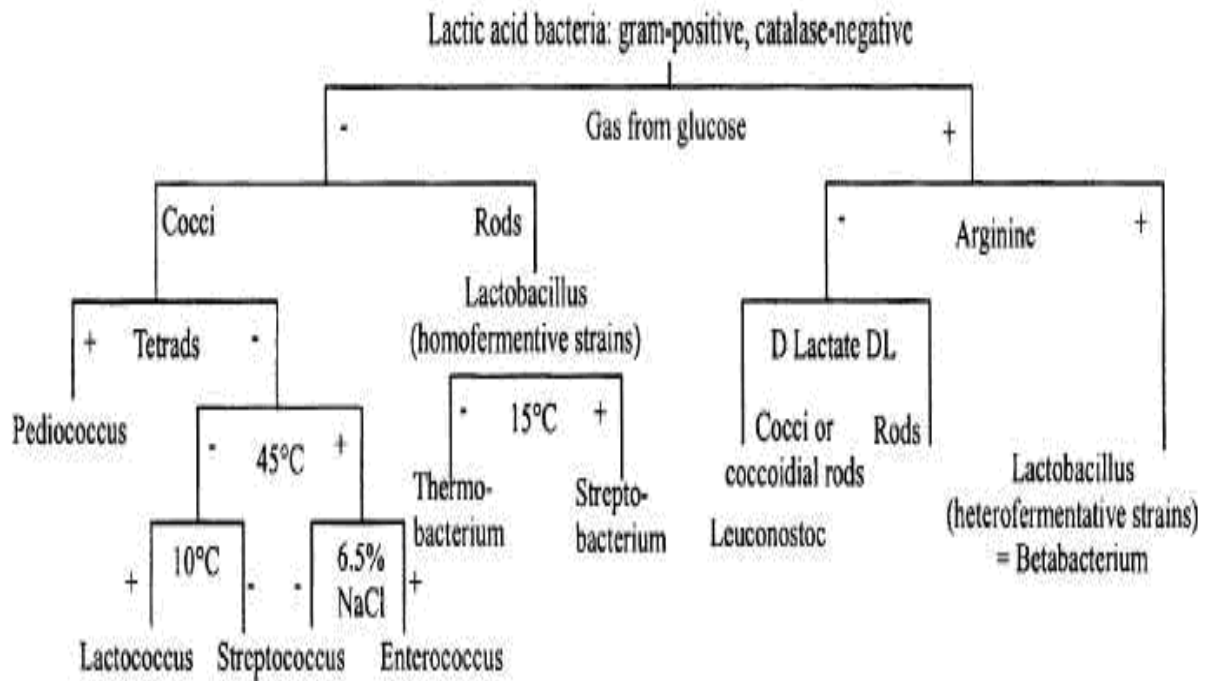


Figure 16: indique le schéma général de différenciation des genres appartenant aux bactéries lactiques (Carr *et al.*, 2002)

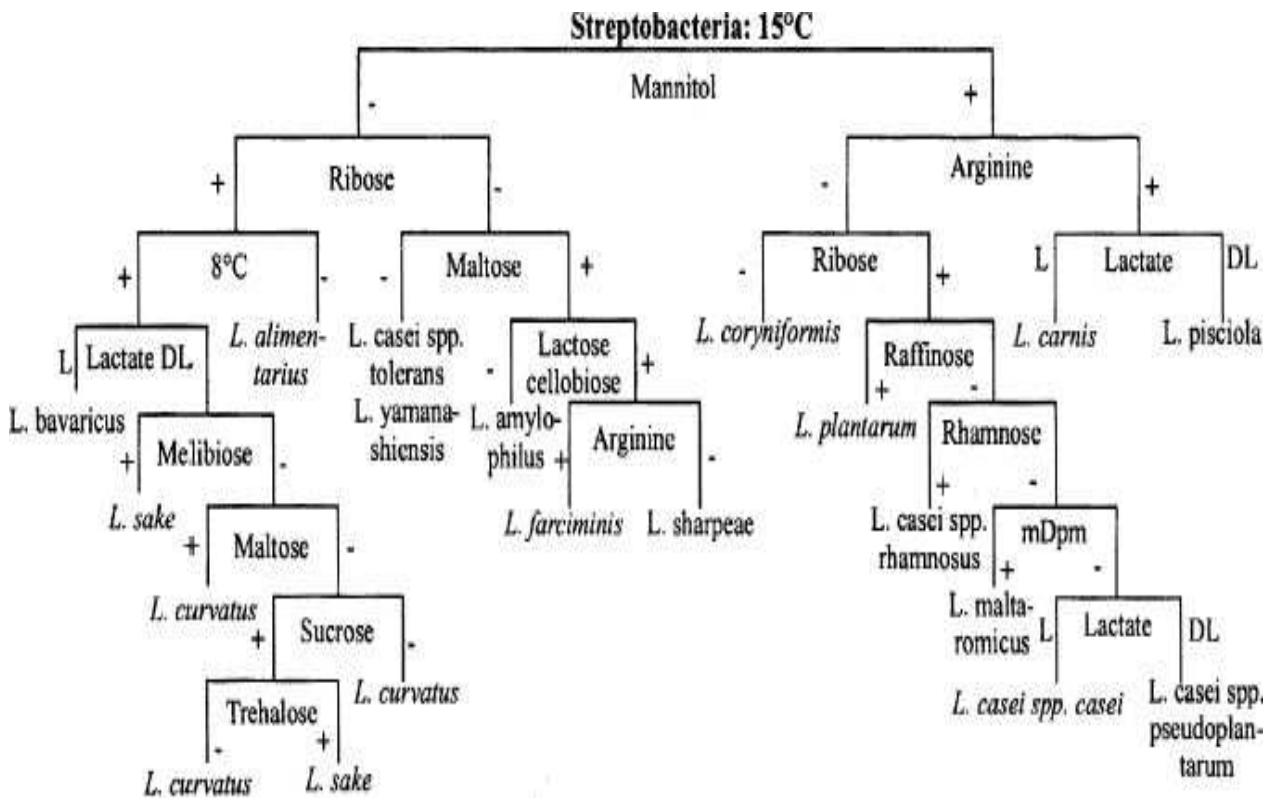
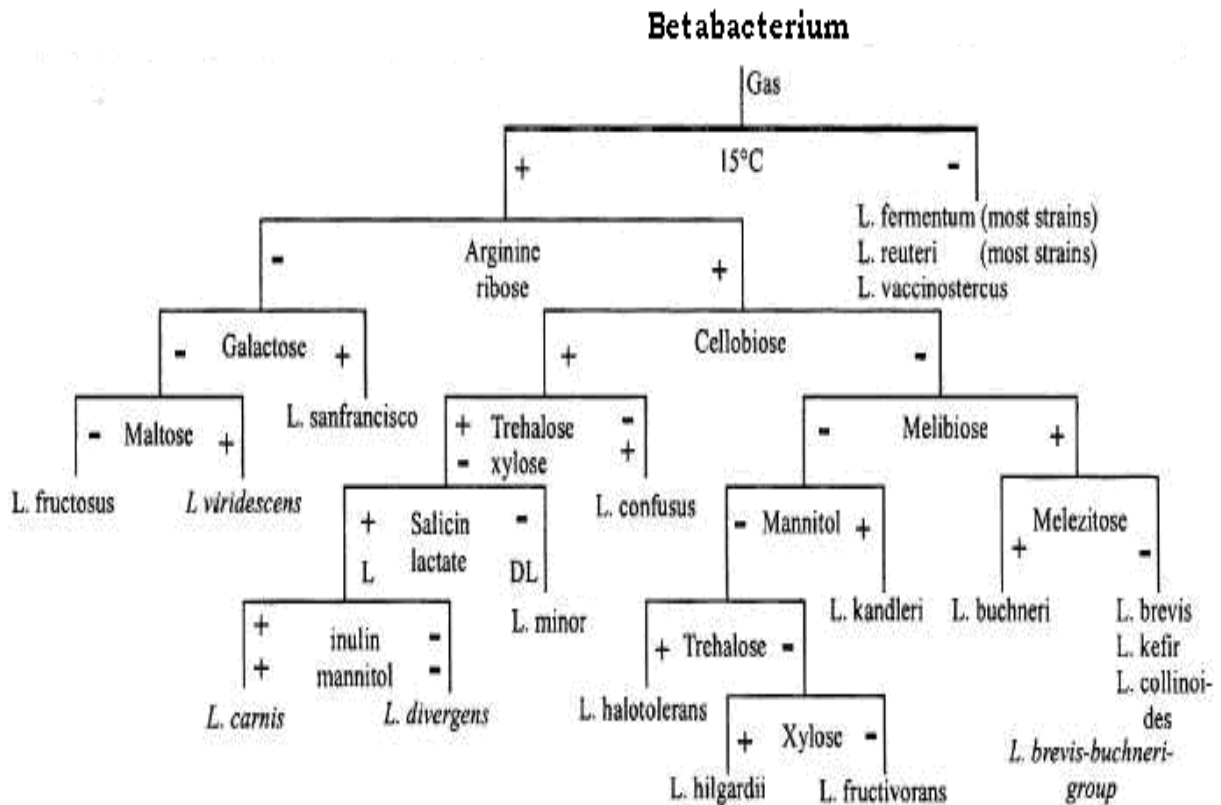


Figure 17: Schéma général dichotomique d'identification rapide des streptobacilles (Carr *et al.*, 2002)





**Figure 18:** indique le schéma d'identification dichotomique rapide pour lactobacilles heterofermentatif (Carr *et al.*, 2002).

#### 4.5 Identification de l'espèce par galerie API 50 CHL:

Pour la détermination de l'espèce, l'étude du profil de la fermentation des hydrates de carbone sur une galerie API 50 CH a été réalisée. La galerie API 50 CH (biomérieux) est constituée de 50 microtubes permettant l'étude de la fermentation de substrat, appartenant à la famille des hydrates de carbone et dérivés (hétérosides, polyalcools, acides uroniques).

L'inoculum est préparé dans le milieu MRS-BCP (sans extrait de viande), puis réparti à l'aide d'une micropipette stérile dans les 50 tubes de la galerie. Durant la période d'incubation, la fermentation se traduit par un changement de couleur dans le tube, dû à une production d'acide en anaérobiose révélée par l'indicateur de pH (pourpre de bromocrésol).

Le premier tube, sans principe actif, sert de témoin. La lecture des résultats se fait après 24 et 48 heures d'incubation. Les résultats sont traités selon les recommandations de Carr *et al* (2002), Axelsson (2004) et Hammes et Hertel (2006), et comparés avec ceux de la souche *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 (obtenus à partir de la base des données "Biomérieux"), et le coefficient de simple appariement "SSM" de chaque binôme de souches a été calculé (Sneath, 1973 et Prescott *et al.*, 2003).

## **4.6 Caractérisation technologique :**

### **4.6.1 Etude de la thermorésistance :**

On a ensemencé les isolats dans du MRS liquide puis ils subissent un chauffage à 60,5°C au bain marie pendant 30 min puis on à incuber à 30°C pendant 24h à 48h (Badis *et al.*, 2004).

### **4.6.2 Production des composés aromatiques :**

La production d'acétoïne (acétylméthylcarbinol) est testée sur milieu Clark et Lubs. Les souches sont cultivées sur ce milieu; Après 24h d'incubation, on test par la réaction de Voges-Proskauer dite réaction de V.P (Avril *et al.*, 1992).

Dans un tube à hémolyse, 2 ml de cette culture sont transvasés, 0,5 ml d'une solution de soude (NaOH) à 16% dans l'eau distillée (VP1) et 0,5 ml de réactif  $\alpha$ -naphtol à 6% dans l'alcool absolu (VP2). On agite soigneusement les tubes et on laisse au repos 5 à 10 min à température ambiante. La production d'acétoïne se traduit par l'apparition d'un anneau ou la diffusion de la couleur rose à la surface du milieu. Un VP positif signifie que la souche possède une voie métabolique particulière pour la fermentation des hexoses, la voie butylèneglycolique (Zourari *et al.*, 1992 et Guessas, 2006).

### **4.6.3 Production de dextrane :**

La production du dextrane à partir du saccharose est mise en évidence sur milieu solide MSE (Mayeux *et al.*, 1962). Les souches productrices de dextrane sont caractérisées par la formation de colonies larges, visqueuses et gluantes.

### **4.6.4 Utilisation du citrate en présence de sucre fermentescible (glucose):**

L'utilisation du citrate est étudiée sur milieu Kempler et Mc Kay (1980). Ce milieu contient une solution de ferricyanide de potassium et une solution de citrate ferrique. La présence du citrate dans le milieu inhibe la réaction entre l'ion ferrique et le ferricyanide de potassium. Les colonies qui fermentent le citrate lancent la réaction entre ces ions il en résulte la formation de colonies bleues ou ayant un centre bleu foncé (après 18 h-72 h d'incubation). Les colonies incapables de fermenter le citrate restent blanches.

### **4.6.5 Etude de l'activité protéolytique :**

L'aptitude à la protéolyse des caséines du lait des différentes espèces de *Lactobacillus* est recherchée sur milieu MRS liquide, dont le peptone est remplacé par la caséine du lait. L'appréciation de l'activité protéolytique se fait par l'apparition d'un coagulum du à l'hydrolyse de la caséine (Badis *et al.*, 2004).

## 5. Mise en évidence des inhibitions inter bactériennes :

La recherche d'éventuelle production de substances inhibitrices par les bactéries isolées est réalisée selon deux méthodes :

### 5.1 La méthode directe :

Selon Fleming *et al.* (1975), consiste à cultiver les deux souches dans le même milieu en double couche.

Sur du MRS solide tamponné et à partir des cultures jeunes des souches de bactéries lactiques (un spot de la souche à caractériser en phase exponentielle de croissance), qu'on a incubé à 30°C pendant 24h. On a versé 0,1ml de cultures jeunes de bactéries pathogènes (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus sp.* et *Escherichia coli*) dans 7,5ml de MH semi-solide (contenant 0,7% d'agar-agar) qu'on a versé par dessus la première gélose conformément à la méthode de la double couche. Après solidification du milieu, les boîtes de Pétri sont mise à 28°C pendant 24h.

La lecture des résultats consiste à déterminé la présence d'un halo clair autour des souches ensemencées en touche et de mesurer leurs dimensions.

### 5.2 La méthode indirecte :

Décrite par Barefoot *et al.*, (1983), cette méthode permet de mettre en contact le surnageant de la souche lactique productrice de substance antimicrobienne avec la souche test. Les souches précédemment sélectionnées pour leur production de substances antimicrobienne sont concernées par ce test.

Les souches sont cultivées dans le milieu MRS liquide et incubées pendant 18 heures. Après incubation, le milieu est centrifugé (8000 tr/mn 10 min) et le surnageant est conservé. Dans une boîte de Pétri contenant du MRS solide et ensemencé par la souche test, des puits sont réalisés avec un emporte pièce et sellée par 10 µl de gélose MRS. Les puits recevront 100µl du surnageant de la souche test et les boîtes sont incubée pendant 24 à 48 heures. Les colonies entourées d'une zone claire dans la nappe de culture de la souche test et ayant un diamètre supérieur à 2 mm sont considérées comme positive.

## 6. Mise en évidence de la nature de l'agent inhibiteur :

Les inhibitions de la croissance de la souche indicatrice peuvent être dues à l'acidification du milieu, à la production de peroxyde d'hydrogène, à la présence de phages ou à la synthèse de bactériocines.



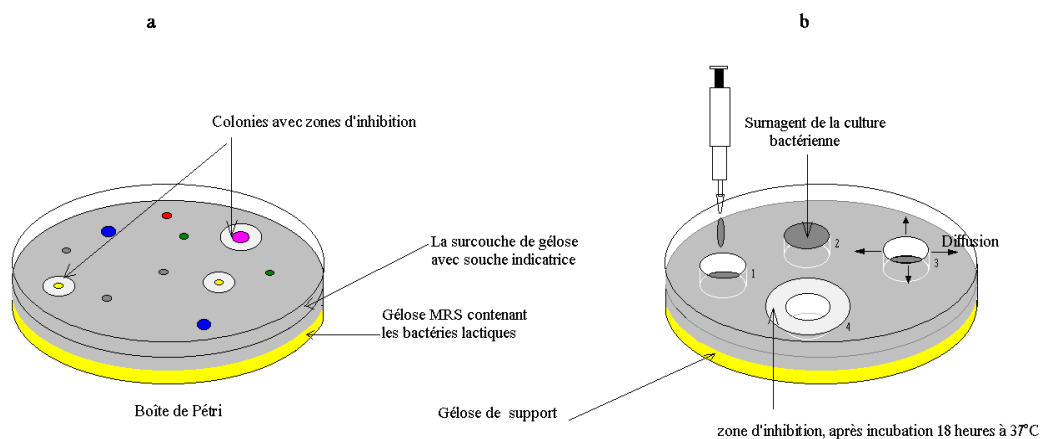
### 6.1 Inhibition due à la production d'acides organiques:

L'étude de l'effet de l'abaissement du pH du milieu sur l'inhibition des souches indicatrices est réalisée en milieu MRS tamponné à pH 7 à l'aide de tampon phosphate (0,1M). Ce tampon est préparé selon les indications de Benhamouche. N (2005). Après incubation la lecture des résultats se fait par comparaison au milieu témoin non tamponné.

### 6.2 Inhibition due au peroxyde d'hydrogène:

La croissance de certaines cultures lactiques entraîne la production de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) qui est considéré comme un inhibiteur de la croissance bactérienne (Cogan *et al*, 1981 et Julliard *et al*, 1987). Cet agent peut être dégradé par une enzyme « la catalase » présente chez certaines espèces bactériennes.

Pour détecter la production de  $H_2O_2$ , on réalise des cultures en présence de catalase à raison de 2 mg/ml de milieu. L'enzyme et la souche indicatrice sont mélangés dans la gélose molle en surfusion. Après incubation la lecture des résultats se fait par comparaison au témoin ne contenant pas de catalase.



**Figure 19:** Méthodes utilisées pour la recherche des substances antimicrobiennes. (a) méthode de la double couche, (b) méthode de diffusion en puits (Guessas, 2007)

### 6.3 Recherche de substances inhibitrices de nature protéique:

La recherche d'éventuelle production de substances inhibitrices par les souches sélectionnées lors du criblage est réalisée en milieu solide. Pour s'assurer de la nature protéique des substances inhibitrices, on utilise des enzymes protéolytiques : la trypsine et l' $\alpha$ -chymotrypsine. Chaque enzyme est dissoute dans du tampon phosphate de sodium (0.1M; pH 7). 2 mg d'enzyme et 1 ml de tampon phosphate stérile.

Le but de ce test est de prouver la nature de la substance antimicrobienne élaborée par les isolats. A partir des cultures jeunes, un volume de 2 ml a été prélevé et centrifugé à 8000 t/min pendant 10 min. Au préalable, des boîtes Pétri contenant 10 ml de milieu MH solide sont ensemencées par 500  $\mu$ l de *Staphylococcus aureus*. Avec l'emporte pièce 5 puits sont fait

dans le milieu solide juste après sa solidification. Un volume de 500  $\mu\text{l}$  de surnageant brut est ajouté 250  $\mu\text{l}$  de chaque enzyme (trypsine et  $\alpha$ -chymotrypsine) (2 mg d'enzyme + 1 ml de tampon phosphate stérile). Le tout est incubé à 37°C pendant 1h. Dans les puits 50  $\mu\text{l}$  ont été disperser :

- Surnageant dans le premier
- MRS liquide dans le deuxième
- Surnageant + trypsine
- Surnageant +  $\alpha$ -chymotrypsine
- Surnageant + catalase

#### 6.4 Recherche de phages lysogènes

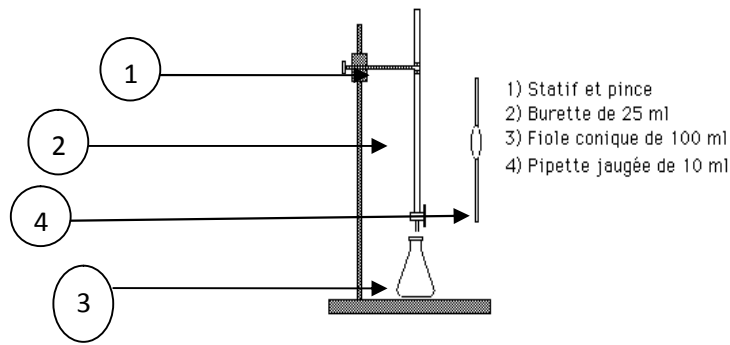
Nous avons effectués ce test pour éliminer la supposition d'une inhibition causée par les phages bactériens.

Avec une pipette Pasteur, on découpe un fragment de gélose dans la zone d'inhibition. Ce fragment est suspendu dans 1 ml de tampon phosphate stérile contenant 50  $\mu\text{l}$  de chloroforme. Après agitation, on laisse décanter 5 min, puis on prélève 300 $\mu\text{l}$  de milieu que l'on ajoute à 7,5 ml de gélose molle contenant la souche indicatrice à 0,1ml. Le mélange est coulé stérilement dans une boîte de Pétri et incubé 48 h à 28°C. La présence de plage de lyse indique la présence de phages.

### 7. Dosage de l'acidité dornic:

L'évaluation de l'acidité produite par les souches pures de *Lb. plantarum* est réalisée par pH métrie et par titrimétrie à différentes températures 20°C, 30°C, 37°C et 44°C. Cette dernière a pour but de déterminer par titrage la concentration molaire en ions  $\text{H}_3\text{O}^+$  dans un échantillon de lait. La concentration est exprimée en "Degrés dornic (°D)".

Le matériel nécessaire est le suivant : un statif avec noix et pince, une fiole conique de 100 ml, une solution de NaOH N/9, une burette de 25 ml, une pipette jaugée de 10 ml et une solution de phénolphaléine à 1% dans l'éthanol. Remplir la burette de la solution de NaOH N/9 et la fixer au statif. Régler le niveau du liquide à zéro. À l'aide d'une pipette de 1 ml, prélever 1ml de lait et transférer dans une fiole conique de 10ml. Ajouter 5 gouttes de solution de phénophtaléine et titrer jusqu'à l'apparition d'une couleur rose persistante. Noter le volume de solution titrant utilisé en dixièmes de millilitres. Nombre de dixièmes de millilitre de NaOH = 1°D.



**Figure 20 :** Montre les Instruments pour la mesure de l'acidité dornic titrable.

Les résultats sont exprimés selon la relation :

$$\text{Acidité} = V_{\text{NaOH}} \times 10$$

$V_{\text{NaOH}}$  : volume de la soude coulé pour neutraliser l'acidité.

L'acidité est exprimée en degré Dornic où  $1^{\circ}\text{D} = 0,1\text{g/l}$  d'acide lactique.

Pour conserver un lait on doit mesurer son acidité, que l'on exprime le plus souvent par le  $^{\circ}\text{D}$  un degré doriqes représente 0,1 g d'acide lactique par litre; un lait frais a une acidité de  $18^{\circ}\text{D}$  (Bourgeois *et al.*, 1996).

## 8. L'étude du l'effet du pH sur l'évolution de la croissance et d'acidité de *Lactobacillus plantarum* (Lb.58 et Lb.68):

On prépare le milieu MRS à différent pH (4- 4,5- 5- 5,5 -6- 6,5- 7- 7,5 -8 et 8,5) puis on mesure chaque trois heures le pH et la Densité optique (Do).

## 9. Mesure de la croissance :

On utilise la méthode de numération sur milieux solides. On inocule chaque souche dans 10ml de lait écrémé stérile et après incubation (18h ou plus) et coagulation, on réalise une série de dilutions dans 9ml d'eau physiologique ( $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  et  $10^{-9}$ ). Onensemence les dilutions adéquates en profondeur puis on ajoute le milieu solide (MRS) en surfusion ( $45^{\circ}\text{C}$ ) et on incube à  $20^{\circ}\text{C}$ ,  $30^{\circ}\text{C}$ ,  $37^{\circ}\text{C}$  et  $44^{\circ}\text{C}$  pendant 24 - 48h (deux sontensemencées par dilution). On dénombre seulement les boites contenant 30 à 300 colonies (Kihal., 1996). Les cinétiques de croissance et d'acidification sont réalisées simultanément aux intervalles de temps suivants : 0h, 3h, 6h, 9h, 14h, 18h, 24h et 48h.

$$\begin{aligned}
 n &= t/G \\
 X &= X_0 \times 2^{t/G} \\
 \ln X &= \ln X_0 + \ln 2/G \times t \\
 \ln X &= \ln X_0 + \mu \times t \\
 \mu &= \ln 2/G
 \end{aligned}$$

X : le nombre de cellule au temps  $t_1$

$X_0$  : le nombre de cellule au temps initial  $t_0$

$\mu$  : Taux de croissance spécifique.

G : temps de génération (temps nécessaire au doublement de la population cellulaire).

n : le nombre de génération.

**Ou bien:**

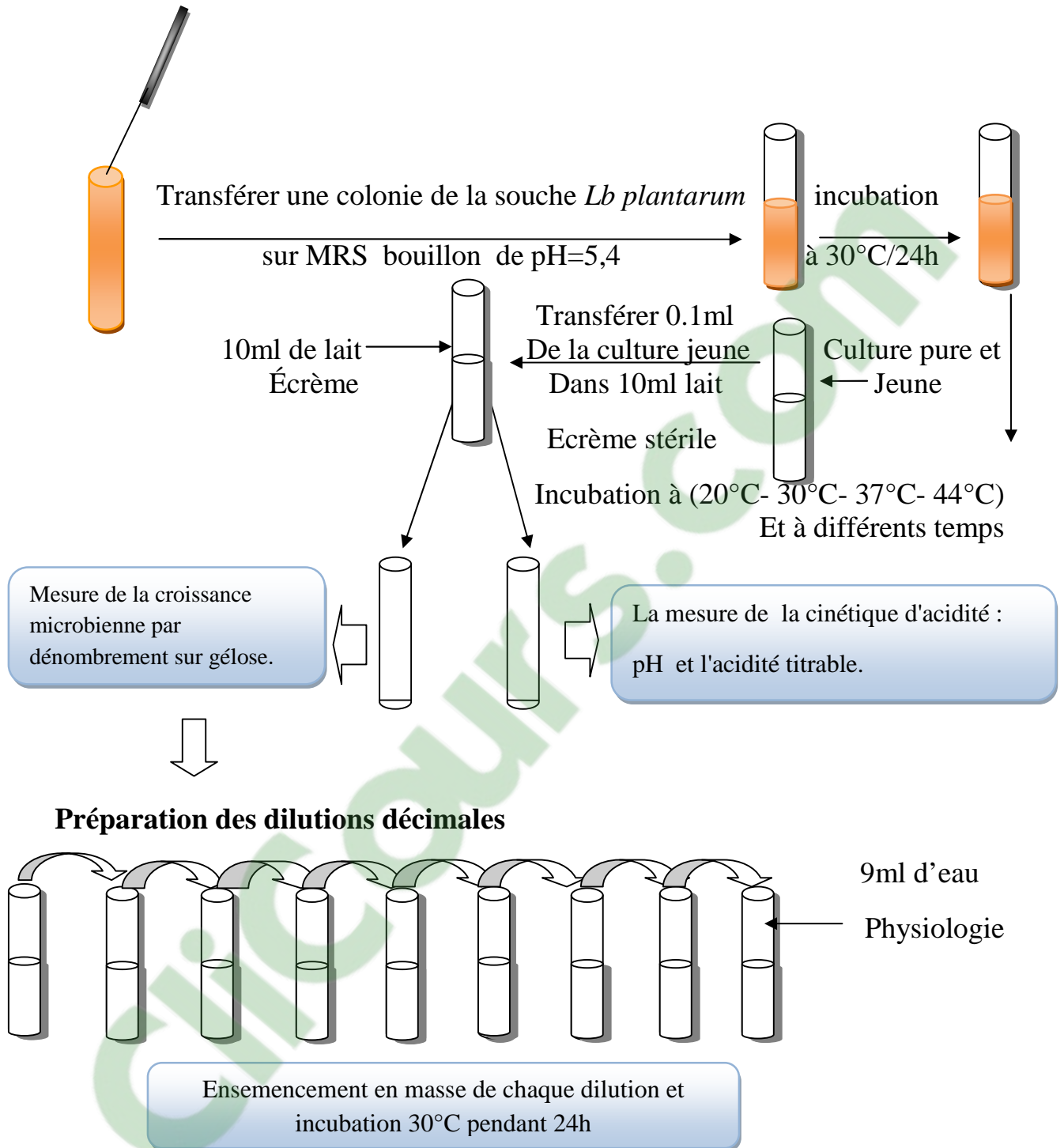
La vitesse de croissance ou taux de division ( $\mu$ ) est le nombre de générations par unité de temps:

$$\mu = n/t = \log N_t - \log N_0 / 0.301 \times t$$

$$n = \log N_t - \log N_0 / 0.301$$

$$\text{Alors: } \mu = \log N_t - \log N_0 / 0.301 \times t$$

Le temps de génération **G** est l'intervalle de temps entre 2 divisions de la population ou le temps de doublement moyen de la population: **G = 1**



**Figure 21:** Les différentes étapes de la cinétique de croissance et d'acidification.

## **10. L'étude de l'évolution de la croissance et d'acidité des deux souches au dépend du sucre et l'acide aminé du milieu:**

On inocule chaque souche dans un milieu MRS modifié, la modification se fait soit au niveau du sucre; en remplaçant le glucose par mannose, ou le maltose, dont le 250 ml de MRS 5g de chaque sucre, soit au niveau de l'acide amine ou on enlève l'extrait de levure et remplacé par un autre acide aminé tel que l'Asparagine 0.04g ou la glycine 0.02g pour 250 ml de MRS et les incubés à des T°C différents et la lecture du pH et de la DO.

## **11. La détermination de la sensibilité aux antibiotiques:**

Pour chaque souche testée (Les six souches de *Lactobacillus* ont subis ce test), une colonie de morphologie typique a été sélectionnée et repiquée sur milieu MRS liquide, et incubé pendant 18h. La densité cellulaire des cultures a été aux environs de 10<sup>8</sup> UFC /ml. Les souches sont étalées sur milieu MRS à l'aide d'écouvillon, et Trente trois antibiotiques ont été testés, le tableau (25) montre la charge de chaque disque d'antibiotique utilisé. Gélose avec disques d'antibiotiques ont été ensuite incubées pendant 48 h. Les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés à l'aide d'une règle. Les résultats ont été exprimés comme sensibles (S), intermédiaires (I) et résistantes (R) selon les normes recommandées (Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie, 2007). Deux souches de référence de résistance aux antibiotiques connue, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, ont été inclus dans les essais (Zhoua *et al.*, 2005 et Taheri *et al.*, 2009).

**Tableau 25** : Les antibiotiques utilisés pour définir la sensibilité de nos souches lactiques.

| Antibiotiques                                  | Charge du Disque   | Symbole |
|--|--------------------|---------|
| <b>PENICILLINES</b>                            |                    |         |
| Penicilline                                    | 6 µg / 10 IU       | P       |
| Oxacilline                                     | 1 µg               | OX1     |
| Ampicilline                                    | 10 µg              | AM      |
| Amoxicilline + Acide Clavulanique              | 20 µg + 10 µg      | AMC     |
| Piperacilline                                  | 75 µg              | PIP 75  |
| Ticaracilline                                  | 75 µg              | TIC     |
| <b>CARBAPENEMES</b>                            |                    |         |
| Imipeneme                                      | 10 µg              | IPM     |
| <b>CEPHALOSPORINES</b>                         |                    |         |
| Cephalothine                                   | 30 µg              | CF      |
| Cefazoline                                     | 30 µg              | CZ      |
| Cefoxitine                                     | 30 µg              | FOX     |
| Cefotaxime                                     | 30 µg              | CTX     |
| Ceftazidime                                    | 30 µg              | CAZ     |
| Cefsulodine                                    | 30 µg              | CFS     |
| <b>AMINOSIDES</b>                              |                    |         |
| Amikacine                                      | 30 µg              | AN      |
| Netilmicine                                    | 30 µg              | NET     |
| Tobramycine                                    | 10 µg              | TM      |
| <b>TETRACYCLINES</b>                           |                    |         |
| Tetracycline                                   | 30 µg              | TE      |
| <b>MACROLIDES</b>                              |                    |         |
| Erythromycine                                  | 15 µg              | E       |
| Spiramycine                                    | 100 µg             | SP      |
| <b>LINCOSAMIDES</b>                            |                    |         |
| Lincomycine                                    | 15 µg              | L       |
| Clindamycine                                   | 2 µg               | CM      |
| <b>STREPTOGRAMINES</b>                         |                    |         |
| Pristinamycine                                 | 15 µg              | PT      |
| <b>GLYCOPEPTIDES</b>                           |                    |         |
| Vancomycine                                    | 30 µg              | VA      |
| <b>POLYPEPTIDES</b>                            |                    |         |
| Bacitracine                                    | 0,02 à 0,04 IU     | BAC     |
| Colistine                                      | 50 µg              | CS 50   |
| <b>SULFAMIDES-TRIMETHOPRIME</b>                |                    |         |
| Trimethoprim-Sulfamethoxazole (co-trimoxazole) | 1.25 µg + 23.75 µg | SXT     |
| <b>NITROFURANES</b>                            |                    |         |
| Nitrofurantoine                                | 300µg              | FT      |
| <b>QUINOLONES</b>                              |                    |         |
| Acide Nalidixique                              | 30 µg              | NA      |
| <b>FLUOROQUINOLONES</b>                        |                    |         |
| Ciprofloxacine                                 | 5 µg               | CIP     |
| Ofloxacine                                     | 5 µg               | OFX     |
| Pefloxacine                                    | 5 µg               | PEF     |
| <b>DIVERS</b>                                  |                    |         |
| Acide Fusidique                                | 10 µg              | FA      |
| Rifampine                                      | 30 µg              | RA 30   |

1 les disques d'antibiotiques proviennent de Bio-rad (Marnes-la-Coquette, France), sauf VA de OXOID (Basingstoke, Hampshire, England).

## 12. Effet de l'extrait brut de *Lb. plantarum* (Lb.58) sur la croissance de *S. aureus* :

La souche dans du MRS pH 6,8 pour obtenir la culture jeune. Dans des eppendorfs nous avons déposé un volume de 2ml de la solution bactérienne qu'on centrifuge à raison de 8000 tours/min pendant 10 minutes. On prend le surnageant puis en fait un chauffage de ce dernier à 100°C pendant 10 min dans un bain marie. On prend 2ml de l'extrait brut de *Lactobacillus plantarum* (58) chauffé à 100°C en lui ajoute 2ml de bouillon nutritive, et 10 autres tubes contenant tous la même quantité du bouillon nutritive, puis en commence à faire des dilutions de (1/2) jusqu'à la dilution (1/1016) qui est la 10eme dilution. Puis on prend-la culture jeune de *Staphylococcus aureus* et l'ajoute à raison de 0.1 ml par tube et par dilution.

En fin on calcule la densité optique de chaque dilution faite à 0h, 2h, 4h, 6h, 8h, 24h, 26h et 28h.



## **1. Dénombrement et isolement des bactéries lactiques du lait cru de chèvre :**

Les résultats du dénombrement de la microflore lactique sur milieu MRS acidifié a donné une concentration cellulaire microbienne de  $29 \pm 4 \cdot 10^8$  ufc/ml de lait. Ce taux de bactéries ne reflète que les germes acidotolérants. A partir des boîtes contenant un nombre réduit de colonies séparées, 252 isolats ont été purifiés et pré-identifiés avec l'observation morphologique macroscopique et microscopique, le type de gram et la réaction de la catalase pour retenir que les isolats en forme de bâtonnet gram positif et catalase négative (Badis *et al.*, 2004), Toutes les souches (252) ont répondues à ces critères.

## **2. Recherche des souches lactiques productrices de substances antimicrobiennes:**

Les résultats des interactions obtenues ont permis de retenir 64 isolats représentatifs donnant 4096 couples d'interaction. Les zones d'inhibition ont été produites sur milieu MRS non tamponné. Les causes de l'obtention des zones d'inhibition doivent être précisées. La production de l'acide lactique est responsable de certaines zones d'inhibition. L'utilisation du milieu MRS tamponné (le tampon phosphate, 0,05 mM) a réduit le nombre de souches productrices de zone d'inhibition à 08. Nos résultats sur l'étude des interactions ont permis la révélation de différents cas d'inhibitions :

- des cas d'auto-inhibition.
- des cas inter-inhibition entre souches de mêmes espèces.

Sur 252 isolats du lait cru de chèvre, seulement 08 souches peuvent être considérées comme productrices de substances inhibant des espèces proches. Pour la confirmation de l'aspect bactériocinogènes des souches retenues, la détermination de la nature de l'agent inhibiteur a été réalisée en éliminant les facteurs suivants :

- l'inhibition par la production d'acides organiques par la neutralisation.
- l'inhibition par la production du peroxyde d'hydrogène par l'enzyme de la catalase.
- l'inhibition due à l'attaque par les bactériophages en utilisant le formol.

Le choix des 08 souches fortement inhibitrices est basé sur les deux critères:

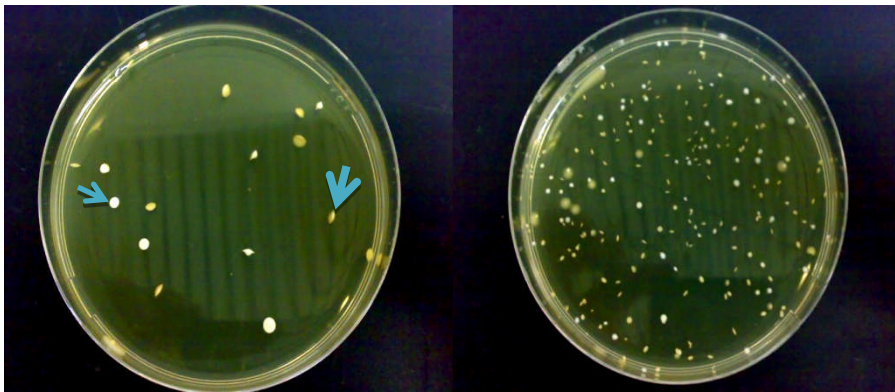
- 1- L'importance du diamètre de la zone d'inhibition et le pourcentage des souches inhibées.
- 2- Le spectre d'activité par la détermination des souches indicatrices (Type de bactéries).

La vérification de la pureté des souches et de leurs appartenances au groupe des bactéries lactiques est régulièrement réalisée par observation microscopique.

### 3. Résultats de l'identification des isolats :

- **Caractérisation macroscopique:**

La caractérisation macroscopique, permet de décrire l'aspect des colonies obtenues sur milieu solide MRS a pH 5,4 après 72h d'incubation à 30°C (Ana Belen florez *et al.*, 2006) et de déterminer les critères relatifs aux colonies des bactéries lactiques (taille, pigmentation, contour, aspect, viscosité), Pour les isolats testés, on a observé sur milieu solide des petites colonies d'environ 1mm de diamètre, de forme lenticulaire de couleur blanchâtres ou laiteuses, avec une surface lisse et un pourtour circulaire régulier (Fig. 22), La croissance en milieu MRS liquide est caractérisée par l'apparition du trouble au fond du tube avec une zone transparente de 5 mm d'épaisseur à la surface du milieu liquide (Fig. 23).



**Figure 22:** Aspect lenticulaires de couleur blanche des colonies des bactéries lactiques sur milieu MRS solide après incubation à 30°C pendant 24 h.



**Figure 23:** Aspect microaérophiles des cultures pures des bactéries lactiques sur milieu MRS liquide après incubation à 30°C pendant 24h.

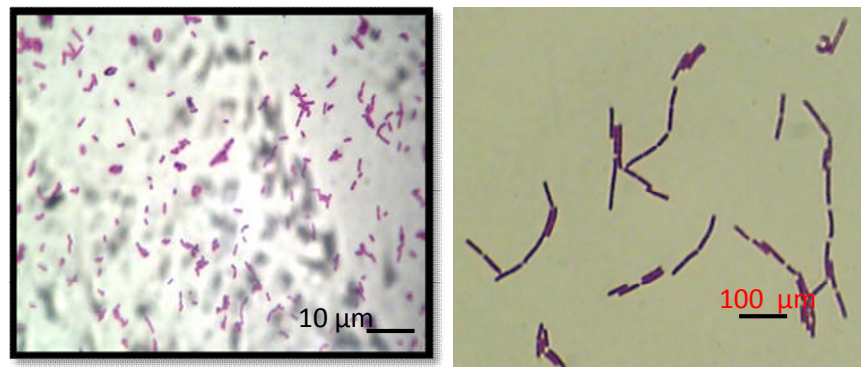
- **Caractérisation microscopique:**

Les 08 souches dominantes représentatives ont fait l'objet d'une étude microscopique, Les résultats obtenus suite a la coloration des Gram et au test de la catalase, montre que les 08 souches sont des bâtonnets Gram positif et catalase négative non sporulé, Toutes les souches présentent une forme cellulaire en bâtonnet, Le mode d'association varie d'une souche à l'autre, il est expliqué dans le tableau (26), Ces observations permettent de classer initialement les isolats selon le gram, leurs morphologies cellulaires et leur mode d'association (Joffin et Leyral, 1996).

**Tableau 26:** Critères morphologiques, le gram et le test de la catalase des huit isolats présumés des bactéries lactiques isolées de lait cru de chèvre.

| Code de souche | Gram | Catalase | Forme                   | Mode d'association            |
|----------------|------|----------|-------------------------|-------------------------------|
| <b>Lb, 13</b>  | +    | -        | Bâtonnets fins et longs | En chaine                     |
| <b>Lb, 21</b>  | +    | -        | Bâtonnet                | En diplobacilles              |
| <b>Lb, 22</b>  | +    | -        | Bâtonnets courts        | En chaine                     |
| <b>Lb, 52</b>  | +    | -        | Bâtonnets courts        | En chaine                     |
| <b>Lb, 54</b>  | +    | -        | Bâtonnets courts        | En diplobacilles              |
| <b>Lb, 55</b>  | +    | -        | Bâtonnet                | En diplobacilles              |
| <b>Lb, 58</b>  | +    | -        | Bâtonnets courts        | En chaine et en diplobacilles |
| <b>Lb, 68</b>  | +    | -        | Bâtonnets courts        | En chaine et en diplobacilles |

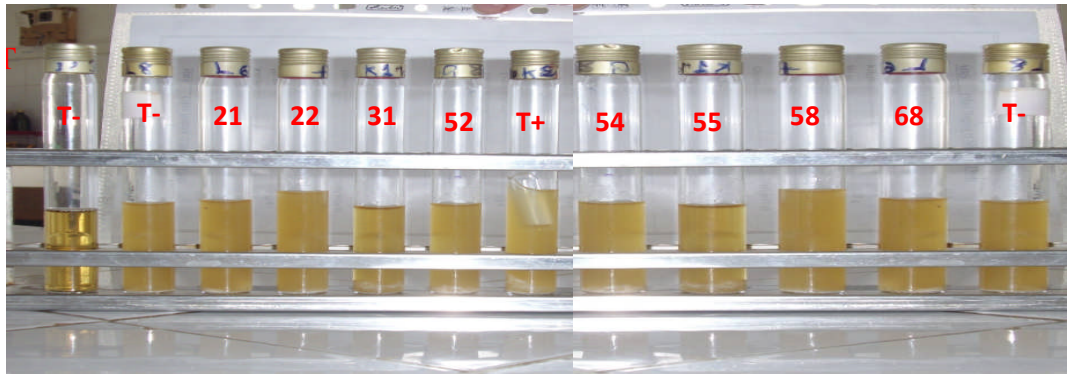
La coloration de Gram montre que tous les isolats sont de Gram positif et de forme bâtonnet, isolés ou regroupés en paire ou en chainette (Fig. 24).



**Figure 24:** Aspect morphologique cellulaire des cultures pures des isolats (Lb.58 et Lb.68) appartenant au genre *Lactobacillus*.

### 3.1 Le type fermentaire:

Ce test nous a permis de différencier entre les souches homofermentaires et les souches hétérofermentaires en utilisant un milieu glucosé stérile qui contient une cloche de Durham, Aucune production du gaz (CO<sub>2</sub>) à partir du glucose n'a été observé chez les huit isolats, ainsi elles sont considérées comme homofermentaires.



**Figure 25:** Le test du type fermentaire des différentes souches de *Lactobacillus sp*, sur milieu MRS glucose contenant une cloche de Durham, Le témoin négatif milieu MRS stérile (tube 1) et le témoin positif (dégagement du gaz) culture de *Leuconostoc mesenteroides* (tube 7).

**Tableau 27:** Résultats du test du type fermentaire sur milieu glucosé et sur milieu gluconate pour déterminer les souches hétérofermentaires facultatives.

| Souches | Homofermentaires<br>(Glucosé) | Hétérofermentaires<br>(gluconate) |
|---------|-------------------------------|-----------------------------------|
| Lb. 21  | +                             | -                                 |
| Lb. 22  | +                             | -                                 |
| Lb. 31  | +                             | -                                 |
| Lb. 52  | +                             | -                                 |
| Lb. 54  | +                             | -                                 |
| Lb. 55  | +                             | -                                 |
| Lb. 58  | +                             | +                                 |
| Lb. 68  | +                             | +                                 |

Alors que dans la production de gaz à partir du gluconate présente deux aspects : les souches Lb.58 et Lb.68 étaient hétérofermentaires, et les souches (Lb.21, Lb.22, Lb.31, Lb.52, Lb.54 et Lb.55) sont homofermentaire, Le tableau (27) indique clairement que les isolats (Lb.21, Lb.22, Lb.31, Lb.52, Lb.54 et Lb.55) sont homofermentaire obligatoire, tandis que les souches Lb. 58 et Lb. 68 sont hétérofermentaires facultatives.

### 3.2 Le test de l'ADH :

L'activité de l'arginine déshydrogénase effectuée sur les huit souches, sur milieu M16 PCP a révélé que seule la souche Lb. 58 qui est ADH positive.

**Tableau 28:** représente les résultats du test de l'arginine déshydrogénase (ADH) des isolats retenus.

| Souches | ADH |
|---------|-----|
| Lb. 21  | -   |
| Lb. 22  | -   |
| Lb. 31  | -   |
| Lb. 52  | -   |
| Lb. 54  | -   |
| Lb. 55  | -   |
| Lb. 58  | +   |
| Lb. 68  | -   |

### 3.3 Croissance à 15 et 45°C et la thermorésistance :

Cette étude de la croissance à 15 et à 45°C et Le test de la thermorésistance à 63,5°C pendant 30 min (Badis *et al.*, 2004) permet de faire la différence entre la flore thermophile et mésophile.

**Tableau 29:** Croissance à différentes températures et la thermorésistance des isolats retenus.

| Souches | Culture à 15°C | Culture à 30°C | Culture à 45°C |             | Thermorésistance (63,5°C) |
|---------|----------------|----------------|----------------|-------------|---------------------------|
| Lb. 21  | -              | +              | -              | Mésophile   | -                         |
| Lb. 22  | -              | +              | +              | Thermophile | -                         |
| Lb. 31  | +              | +              | -              | Mésophile   | -                         |
| Lb. 52  | +              | +              | +              | Thermophile | +                         |
| Lb. 54  | +              | +              | +              | Thermophile | +                         |
| Lb. 55  | +              | +              | +              | Thermophile | -                         |
| Lb. 58  | +              | +              | +              | Thermophile | +                         |
| Lb. 68  | +              | +              | +              | Thermophile | -                         |

L'emploi des tests (croissance à différentes températures, la recherche du type fermentaire, l'hydrolyse de l'arginine, l'utilisation du citrate en présence du glucose) nous ont permis d'établir une pré-identification pour le genre *Lactobacillus*, Nous avons subdivisés nos souches en plusieurs groupes (groupe 1 : homofermentaires et hétérofermentaires, groupe 2 : mésophiles et thermophiles).

Les huit souches poussent bien à 15 et 45°C après 24h, sauf la souche Lb.22 et Lb.21 qui ne pousse pas à 15°C et Lb.31 et Lb.21 qui sont de type mésophile, elles fermentent tous le ribose dans la galerie API 50CHL, A partir des résultats ci-dessus, et en suivant les recommandations de Carr *et al* (2002), Axelsson (2004) et Hammes et Hertel (2006), on peut conclure que les huit souches appartiennent au genre *Lactobacillus*.

### 3.4 Profil fermentaire :

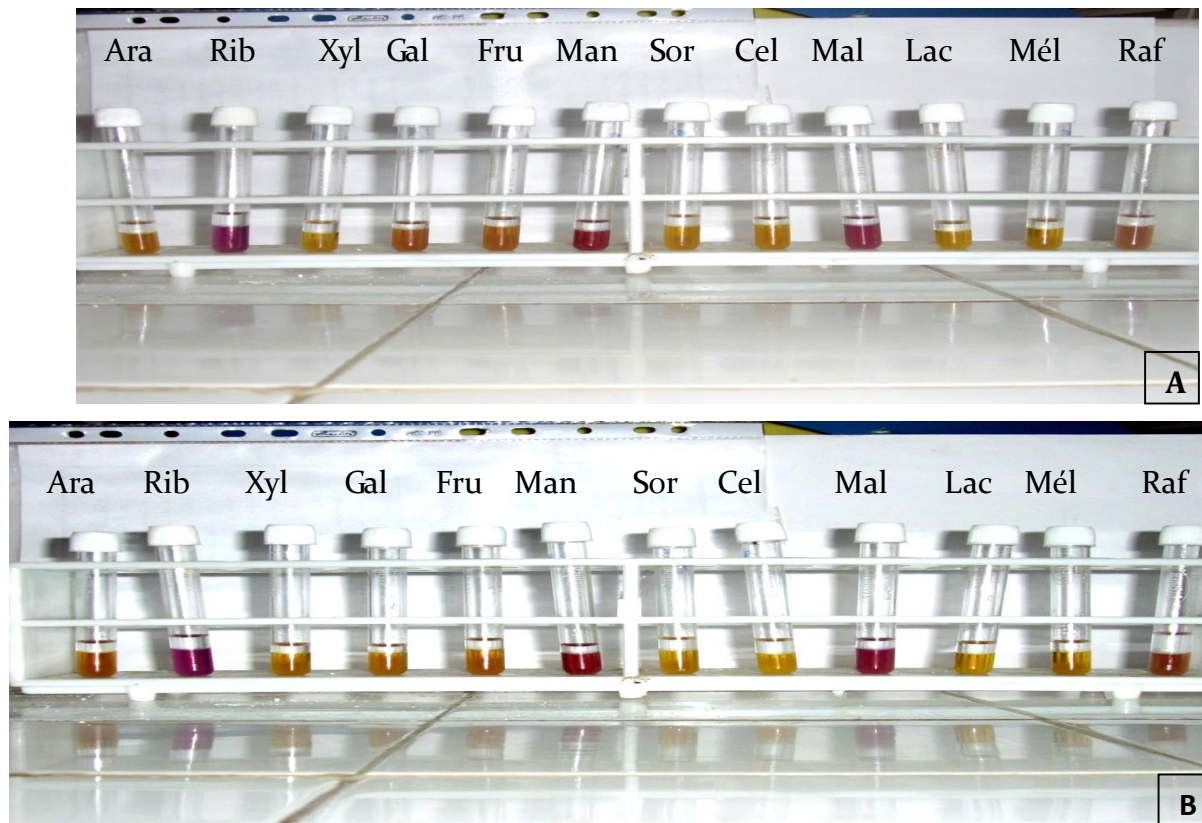
La détermination des genres et des espèces bactériennes, réside essentiellement dans leur capacité à fermenter les sucres en acide lactique et autres acides organiques. L'analyse des

profils fermentaires (Tab. 30) révèle une grande diversité métabolique des carbohydrates chez les isolats retenus.

**Tableau 30:** Profil fermentaire des sucres par les huit isolats de *Lactobacillus* sp.

|              | Galactose | Fructose | Arabinose | Raffinose | Mannose | Maltose | Xylose | Cellobiose | Ribose | Melibiose | Sorbitol | Lactose | Esculine | Mannitol | Sucrose | Saccharose | Glucose |
|--------------|-----------|----------|-----------|-----------|---------|---------|--------|------------|--------|-----------|----------|---------|----------|----------|---------|------------|---------|
| <b>Lb.21</b> | +         | +        | +         | -         | +       | +       | -      | +          | -      | -         | -        | +       | +        | -        | +       | +          | +       |
| <b>Lb.22</b> | +         | +        | +         | -         | -       | +       | -      | +          | +      | +         | -        | +       | +        | -        | +       | +          | +       |
| <b>Lb.31</b> | +         | +        | +         | +         | +       | +       | -      | +          | +      | +         | -        | +       | +        | +        | +       | +          | +       |
| <b>Lb.52</b> | +         | +        | -         | -         | -       | +       | -      | +          | +      | -         | +        | +       | -        | +        | +       | +          | +       |
| <b>Lb.54</b> | +         | +        | +         | -         | +       | +       | -      | +          | +      | -         | +        | +       | +        | +        | +       | +          | +       |
| <b>Lb.55</b> | +         | +        | -         | -         | -       | +       | -      | +          | +      | -         | +        | +       | -        | +        | +       | +          | +       |
| <b>Lb.58</b> | +         | +        | -         | -         | +       | +       | -      | +          | +      | -         | +        | +       | +        | +        | +       | +          | +       |
| <b>Lb.68</b> | +         | +        | +         | +         | -       | +       | +      | +          | +      | +         | +        | +       | -        | +        | +       | +          | +       |

La figure 26 donne un aperçu des résultats enregistrés pour Lb.58 et Lb.68 respectivement.



**Figure 26:** Profil fermentaire des sucres de la souche Lb.58 (A) et Lb.68 (B), le virage de l'indicateur de pH au jaune indique une réaction positive.

Les lactobacilles ne possèdent pas la catalase mais ils peuvent produire une pseudo catalase quand le milieu contient une concentration élevée de glucose (Carr *et al.*, 2002), Sur la base des différentes températures de croissance, de l'hydrolyse de l'arginine et du type



fermentaire selon le substrat employé (glucose ou gluconate), le genre *Lactobacillus* est subdivisé en trois groupes (Tab. 30).

Les bactéries homofermentaires et mésophiles font partie du groupe *Streptobacterium*, les homofermentaires et thermophiles celui de *Thermobacterium* alors que *Betabacterium* renferme les hétérofermentaires et mésophiles (Collins *et al.*, 1987; Charteris *et al.*, 2001 et Hammes et Hertel, 2003).

La différenciation entre les différentes espèces du genre *Lactobacillus* repose essentiellement sur leur faculté de fermenter différemment les carbohydrates (Tab. 30).

Les profils fermentaires enregistrés (Tab. 30) sont comparés avec celui des souches de référence dans la clé d'identification de Berge (Kandler et Weiss, 1986; Stiles *et al.*, 1997 et Carr *et al.*, 2002) et nous a amené à définir les différentes espèces, Ainsi, le genre *Lactobacillus* a été réparti en 8 espèces.

Les souches qui fermentent le mannitol, le ribose et le raffinose, sont identifiées comme *Lb. plantarum* (Schillinger et Lücke, 1987).

- La souche Lb.58 est hétérofermentaire, Thermophile et possèdent un profil fermentaire qui correspond à celui de *Lb. plantarum*,
- Les souches Lb.68, Lb.54 et Lb.52 se développent à 15°C et 45°C, elles sont identifiées à *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* n'hydrolyse ni l'arginine, ni l'urée mais hydrolyse l'esculine (Collins *et al.*, 1989).

*Lb. plantarum* est capable de pousser à des températures comprises entre 2°C et 8°C et de ce fait peut être considérée comme étant une espèce psychrotrophe, cependant sa croissance à ces températures est lente (Sharpe, 1962 et Schillinger et Lücke, 1987).

Les souches Lb.58, Lb.68, Lb.54 et Lb.52 sont aptes à se développer à 15°C et 45°C, propriétés trouvées chez *Lb. plantarum*, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*, *Lb. casei* et *Lb. rhamnosus*.

Les souches *Lb.55*, *Lb.13*, poussent à 15°C et non à 45°C caractéristiques rencontrées chez *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*, *Lb. casei*.

Les isolats qui fermentent les hexoses en lactate, en acétate et/ou en éthanol et CO<sub>2</sub>, *Lb. acidophilus* fermente l'amygdalines et le cellobiose, et hydrolyse l'esculine (Rogosa *et al.*, 1953 et Johnson *et al.*, 1980).

La classification des lactobacilles pourrait être mieux menée si nous avions entamés la recherche de production de gaz à partir de gluconate, en plus du test de production de gaz à partir du glucose, Cela nous aurait sans doute permis de classer plus facilement les lactobacilles isolées selon leur type de fermentation (lactobacilles homofermentaires,

lactobacilles hétérofermentaires facultatifs et lactobacilles hétérofermentaires obligatoires) Demarigny *et al.*, (1996).

Actuellement, le genre *Lactobacillus* renferme 92 espèces et 15 sous espèces, sans compter les cinq espèces qui ont été transférées au genre *Weissella* (Collins *et al.*, 1993 et Charteris *et al.*, 2001).

**Tableau 31:** Résultats de l'identification des espèces après comparaison avec des tableaux référentiels de Björkroth et Holzapfel, (2006) et de Hammes et Hertel, (2006).

| Code de la souche | Genre et espèce  | Pourcentage de fiabilité |
|-------------------|--|--------------------------|
| Lb.21             | <i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i>         | 85%                      |
| Lb.22             | <i>Lactobacillus plantarum</i>                         | 90%                      |
| Lb.31             | <i>Lactobacillus casei</i>                             | 75%                      |
| Lb.52             | <i>Lactobacillus rhamnosus</i>                         | 75%                      |
| Lb.54             | <i>Lactobacillus rhamnosus</i>                         | 70%                      |
| Lb.55             | <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> | 70%                      |
| Lb.58             | <i>Lactobacillus plantarum</i>                         | 93%                      |
| Lb.68             | <i>Lactobacillus plantarum</i>                         | 90%                      |

#### 4. La mise en évidence d'interaction entre bactéries lactiques en milieu tamponné :

Les espèces de lactobacilles sont généralement connus par leur production des acides organiques dans le milieu de culture et elles peuvent produire aussi le peroxyde d'hydrogène et d'autres composés antimicrobiens (Barefoot et Klaenhammer, 1984, Walsh *et al.*, 2008, Saidi *et al.*, 2011 et Mami *et al.*, 2012).

##### 4.1 Production de substance antimicrobienne :

Les résultats des interactions en milieu solide entre les différentes souches de *Lactobacillus* indiquent éventuellement que l'agent inhibiteur est une bactériocine, La confirmation de la nature de cette substance passe obligatoirement par plusieurs étapes, Ces tests permettront la détermination de la nature de l'agent inhibiteur, du mode et du spectre d'action.

La méthode par diffusion sur milieu solide (Fleming *et al.*, 1975) est utilisée pour la détection des inhibitions; elle se traduit par la formation d'un halo autour de la souche ensemencée en touche, La lecture des résultats consiste à mesurer le rayon de l'halo d'inhibition de la souche indicatrice ensemencée en double couche au-dessus des souches inhibitrices, Les résultats obtenus ont révélé la présence de zone d'inhibition chez 08 isolats qui appartiennent aux espèces suivantes, *Lb. plantarum* (2), *Lb. rhamnosus* (2), *Lb. acidophilus* (1), *Lb. sakei* subsp. *sakei* (1), *Lb. casei* (1) et *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* (1).

L'intérêt de ces espèces de *Lactobacillus* consiste à leur intégration en transformation laitière et à la production de bio-ingrédients à activité antimicrobienne (Ennahar *et al.*, 1999; Luchansky, 1999 et Deegan *et al.*, 2006), Ces souches pourront donc être pris en



considération pour l'élaboration de ferments possédant la capacité d'améliorer la qualité sanitaire des produits alimentaire fermentés (Bredholt *et al.*, 2001; Brillet *et al.*, 2005; Abriouel *et al.*, 2001 et Deegan *et al.*, 2006).

#### 4.2 Inhibitions entre les bactéries lactiques :

La majorité des lactobacilles retenus possèdent un spectre d'activité élevé, En revanche, les espèces de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* ont un spectre d'action réduit et elles ont inhibées un nombre de souches inférieures à 3 souches (Tab. 32).

- Les souches les plus inhibées comprennent *Lb. plantarum*.
- L'espèce la plus inhibitrice est *Lb. plantarum*.

Ce grand effet inhibiteur des lactobacilles peut avoir deux origines :

La première est la production d'acide organiques; en effet, les lactobacilles sont connus pour une grande résistance aux pH acides (jusqu'à un pH voisin de 3,5) contrairement aux autres genres de bactéries lactiques qui sont plus sensibles (Adams et Hall, 1988; Wong, et Chen, 1988; Benthin et Villadsen, 1995; Podolak *et al.*, 1996 et Wilson *et al.*, 2005).

La deuxième est que les lactobacilles produisent une autre substance inhibitrice (type bactériocine) active sur de nombreuses espèces (Larsen *et al.*, 1993; Anderssen *et al.*, 1998; Oyetayo *et al.*, 2003 et Avila *et al.*, 2005).

#### 5. Recherche de la nature de l'agent inhibiteur :

La présence d'une inhibition n'est pas due uniquement à la production de bactériocines, Cette inhibition peut avoir plusieurs origines parmi lesquelles, nous pouvons mentionner la production d'acides organiques, de peroxyde d'hydrogène, de phages et/ou de bactériocines (Moreno *et al.*, 1999; Navarro *et al.*, 2000; Rodriguez *et al.*, 2002; Maldonado *et al.*, 2003; Todorov et Dicks, 2005 et Boumehira *et al.*, 2011).

Les bactériocines des bactéries Gram<sup>-</sup> et Gram<sup>+</sup>, représentent un groupe hétérogène de substances antibactériennes dont le poids moléculaire, les propriétés biochimiques, le spectre d'activité et le mode d'action peuvent être très différents (Riley et Wertz, 2002; Aslim *et al.*, 2005 et Deegan *et al.*, 2006).

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

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

Les résultats obtenus à la suite des différents tests sur milieu solide et liquide, nous orientent sur l'activité des substances antimicrobiennes que nous avons décelées. Pour la recherche de la nature de l'agent inhibiteur sur milieu solide, nous avons sélectionné huit souches qui se répartissent comme suit:

*Lactobacillus plantarum* (2), *Lactobacillus rhamnosus* (2), *Lactobacillus acidophilus* (1), *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* (1), *Lactobacillus casei* (1), *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (1).

Ce choix est basé sur les travaux de Hosono *et al.*, (1977) qui établit que la sélection des souches soit établit à partir des mesures des activités inhibitrices sur milieux solides.

### 5.1 Effet de la production d'acides :

Pour minimiser la production d'acide, nous avons utilisé un milieu tamponné à pH 7 avec le tampon phosphate 100 mM.

L'évaluation des résultats obtenus avec le milieu normal (non tamponné) et le milieu tamponné à pH = 7 nous ont permis de déterminer si la production d'acides est un facteur actif des inhibitions enregistrées, L'inhibiteur due à la production de l'acide lactique a été mise en évidence par (Budde *et al.*, 2003).

L'intensité de l'inhibition pour toutes les souches est diminuée en milieu tamponné, Plusieurs chercheurs ont soulignés l'influence que peut exercer le pH sur le degré de l'activité inhibitrice de la bactériocine (Aasen *et al.*, 2000; Abriouel *et al.*, 2001 et Mataragas *et al.*, 2003).

L'apparition de zones claires dans le milieu ne confirme pas que ces inhibitions sont dues à des bactériocines elles peuvent être dues à l'acidification du milieu (Desmazeaud, 1983). Le milieu tamponné (tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH =7) maintient le pH constant (Sambrook *et al.*, 1986) afin d'éliminer l'effet de l'acidité produite dans le milieu, Le nombre de souches inhibitrices observées, en milieu tamponné, était moins important que celui observé en milieu non tamponné, Le diamètre des zones d'inhibition des souches a diminué comparé à ceux obtenues en milieu non tamponné (Fig. 27).

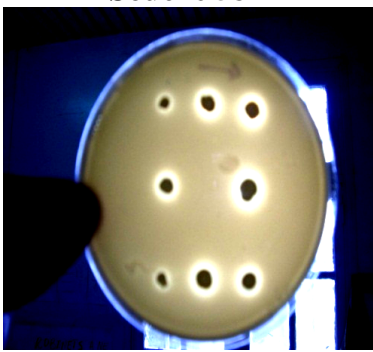
On remarque aussi que toutes les souches lactiques inhibent la souche Lb.58 (*Lactobacillus plantarum*) avec des diamètres qui varient entre 3mm et 8mm, mais la Lb.58 n'est pas inhibée par elle-même, alors on peut dire qu'il n'y a pas d'auto-inhibition, ceci est due à la protection de la souche contre ces propres métabolites (Guessas *et al.*, 2005).

En remarque tous les souches lactiques inhibent les souches Lb.68 et Lb.55 (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*), avec des diamètres qui varient entre 3 mm et 7 mm.

**Tableau 32:** Les interactions entre les différentes souches retenues, les souches ensemencées en touches sont des bactéries (en colonnes), les souches test (bactéries lactiques) sont ensemencées en surfaces, le diamètre de la zone d'inhibition est mesuré en (mm) dans le milieu de culture (milieu tamponné) :

| Code des souches | 58 | 55 | 68 |
|------------------|----|----|----|
| Lb. 21           | 6  | 4  | 2  |
| Lb. 22           | 3  | 3  | 5  |
| Lb. 31           | 7  | 4  | 3  |
| Lb. 52           | 4  | 7  | 2  |
| Lb. 54           | 5  | 4  | 5  |
| Lb. 55           | 8  | 3  | 5  |
| Lb. 68           | 6  | 3  | 0  |
| Lb. 58           | 0  | 7  | 5  |

**Souche 58**



|        |        |        |
|--------|--------|--------|
| Lb. 22 | Lb. 68 | Lb. 21 |
| Lb. 52 |        | Lb. 55 |
| Lb. 58 | Lb. 31 | Lb. 54 |

**Souche 68**



|        |        |        |
|--------|--------|--------|
| Lb. 22 | Lb. 68 | Lb. 21 |
| Lb. 52 |        | Lb. 55 |
| Lb. 54 | Lb. 31 | Lb.58  |

**Figure 27:** Les interactions entre les isolats des bactéries lactiques du genre *Lactobacillus* (Souche Lb.58 et Lb.68) sur milieu solide tamponné (la zone claire autour des colonies indique une inhibition de la souche test).

## 5.2 Production de peroxyde d'hydrogène :

Le peroxyde d'hydrogène est, depuis longtemps, reconnu comme un agent majeur de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques en particulier celle des lactobacilles (Juillard *et al*, 1987).

Les bactéries lactiques sont généralement catalase (-) négative mais certains souches peuvent accumuler du peroxyde d'hydrogène lorsqu'elles sont cultivées en aérobiose ou en micro aérobiose.

**Tableau 33** : La production de peroxyde d'hydrogène par les différentes souches retenues

| Souches | Catalase |
|---------|----------|
| Lb. 21  | -        |
| Lb. 22  | -        |
| Lb. 31  | -        |
| Lb. 52  | -        |
| Lb. 54  | -        |
| Lb. 55  | -        |
| Lb. 68  | +        |
| Lb. 58  | +        |

Le niveau d'accumulation varie selon la souche bactérienne, il peut être auto-inhibiteur révélant une activité plus intense des réactions génératrices de peroxyde d'hydrogène que des réactions peroxydasique provoquant son élimination (Juillard *et al.*, 1987).

La synthèse entre l'inhibition due à la production d'acide et de peroxyde d'hydrogène montre que l'inhibition est due à des facteurs différents:

1. l'acidité uniquement : pas de souches.
2. le peroxyde d'hydrogène: (Lb.58, Lb.68) *Lactobacillus plantarum*, (Lb.52, Lb.54) *Lactobacillus rhamnosus*, (Lb.55) *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*.
3. les deux (l'acidité + le peroxyde d'hydrogène): pas de souche.
4. à un autre agent inhibiteur qui peut être une bactériocine: *Lactobacillus plantarum* (Lb.58), *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* (Lb.31), *Lactobacillus acidophilus* (Lb.2), *Lactobacillus casei* (Lb.13).

### 5.3 La production de phage lysogène:

Les phages peuvent être l'origine des inhibitions dans la croissance bactérienne (Davies et Gasson, 1980), Le test des phages s'est révélé négatif pour l'ensemble des souches, aucune plage de lyse n'est apparue après incubation, L'obtention d'un tapis bactérien signifie que l'effet inhibiteur ne peut pas se propager d'une bactérie à l'autre et donc qu'il n'est pas dû à la présence de bactériophages (Lewis *et al.*, 1991).

Les substances actives sont donc épuisées au cours de l'action antibactérienne, ce qui n'exclut pas la production d'acides (Deegan *et al.*, 2006), de peroxyde d'hydrogène (Piard et Desmazeaud, 1991), de diacétyl (Condon, 1987) et ou de substances de type bactériocines (Alexandre *et al.*, 2002) par les souches isolées.

#### 5.4 L'effet des enzymes protéolytiques sur la substance inhibitrice:

Comme les bactériocines sont de nature protéique, les réponses obtenues après l'action des enzymes protéolytiques (trypsine et  $\alpha$ -chymotrypsine) nous permettra d'identifier les substances antibactériennes comme étant des bactériocines.

Si le halo d'inhibition disparaît en présence de l'action d'une enzyme protéolytique, l'agent inhibiteur est de nature protéique (Callewaert et de Vuyst, 2000 et Aslim *et al.*, 2005).

Mais s'il persiste après l'action des deux enzymes utilisées, il y a une forte probabilité pour que l'agent ne soit pas de nature protéique c'est-à-dire une bactériocine,

Puisque les bactériocines sont par définition des substances protéiques, la sensibilité aux enzymes protéolytiques est un critère principal dans leur caractérisation.

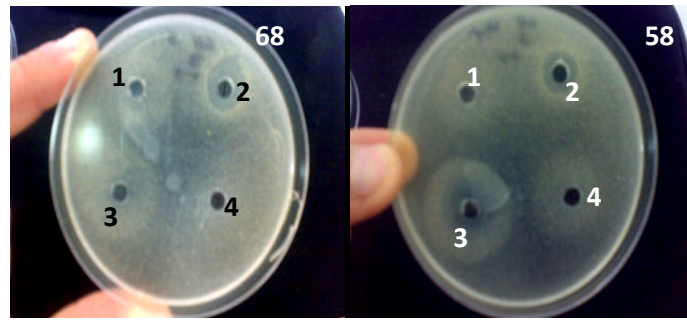
La perte de l'activité antimicrobienne après traitement avec des enzymes indique la sensibilité des composés actifs sécrétés par les souches mises en culture. Puisque les bactériocines sont par définition des substances protéiques. Elles doivent être sensibles à au moins à une enzyme. En conséquence, la sensibilité aux enzymes protéolytiques est le critère principal dans leur caractérisation (Çon et Gökalp, 2000; El Shafei *et al.*, 2000 et Cintas *et al.*, 2001).

Cependant, plusieurs facteurs peuvent avoir un effet sur l'activité antimicrobienne comprenant l'interaction entre la bactériocine et les constituants des cellules ou du milieu de croissance, de la pureté et de la concentration de l'enzyme et de la technique employée pour déterminer la sensibilité enzymatique (Nes *et al.*, 1996).

L'effet des diverses enzymes protéolytiques utilisées est montré dans la figure 28 et le tableau 34.

**Tableau 34:** Révèle l'action des enzymes protéolytiques et le traitement thermique sur l'activité antimicrobienne des extraits bruts sur la croissance de *Staphylococcus aureus*.

| Souches | $\alpha$ -chymotrypsine | Trypsine | Traitement thermique 100°C |
|---------|-------------------------|----------|----------------------------|
| Lb. 21  | -                       | -        | -                          |
| Lb. 22  | -                       | +        | -                          |
| Lb. 31  | -                       | -        | -                          |
| Lb. 52  | -                       | +        | -                          |
| Lb. 54  | -                       | -        | -                          |
| Lb. 55  | -                       | -        | -                          |
| Lb. 68  | -                       | -        | +                          |
| Lb. 58  | -                       | -        | -                          |



**Figure 28:** L'action des enzymes protéolytiques et le traitement thermique sur l'apparition des zones d'inhibition en présence de *Staphylococcus aureus* (1:  $\alpha$ -chymotrypsine; 2: Substance de la Souches; 3: Traitement thermique 100°C; 4: Trypsine)

La perte de l'activité antimicrobienne après traitement avec les enzymes protéolytiques indique la sensibilité des composés actifs sécrétés par les souches à l'action des enzymes protéolytiques, Pour les souches performantes testées pour leur nature d'agent inhibiteur, On a pu remarquer que parmi les huit souches inhibitrices mentionné dans le tableau 34, les souches (Lb.58, Lb.68, Lb.55, Lb.54, Lb.52 et Lb.31) permettent de suggérer que l'activité antagoniste de ces souches soit due à une substance de nature protéique ou peptidique, des résultats similaires ont été rapportés par Scheved *et al.*, (1993) au cours de leurs recherches sur la nature des agents inhibiteurs de types bactériocines, Tandis que pour les souches (Lb.52 et Lb.22) nous avons notés une zone d'inhibition autour de l'enzyme de la trypsine elle reflète une sensibilité de cet agent inhibiteur aux enzymes protéolytiques.

Cette sensibilité partielle, déjà observée, peut s'expliquer par:

- Soit l'agent inhibiteur est protéique et alors le clivage enzymatique conduit à un fragment qui garde une activité inhibitrice partielle.
- Soit l'agent inhibiteur est une protéine conjuguée et l'activité inhibitrice est portée par la partie non protéique : dans ce cas les enzymes effectuent la configuration structurel de la partie protéique ce qui réduit l'activité antagoniste.

1. Peroxyde d'hydrogène et substance protéique cas de la souche (Lb.22)  
*Lactobacillus sakei* subsp. *sakei*.
2. Acidité, peroxyde d'hydrogène et substance protéique pas de cas observée.
3. Substance protéique uniquement cas de la souche (Lb.52 et Lb.22)  
*Lactobacillus rhamnosus* et *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* respectivement.

L'agent inhibiteur est résistant uniquement à une seule enzyme:

- l' $\alpha$ -chymotrypsine pas de souche.
- la trypsine cas de deux souches: Lb.52 et Lb.22.
- l'agent inhibiteur est sensible aux deux enzymes cas de: Lb.58, Lb.68, Lb.55, Lb.54, Lb.21 et Lb.31.

La substance protéique produite par Lb.52 et Lb.22 est sensible à l' $\alpha$ -chymotrypsine et mais résistante à la trypsine.

Plusieurs facteurs peuvent avoir un effet sur l'activité antimicrobienne parmi lesquelles l'interaction entre la bactériocine et les constituants des cellules ou du milieu de croissance (Ness *et al.*, 1996), de la pureté et de la concentration de l'enzyme et de la technique employée pour déterminer la sensibilité enzymatique (Piard *et al.*, 1990).

Cependant, plusieurs facteurs peuvent avoir un effet sur l'activité antimicrobienne comprenant l'interaction entre la bactériocine et les constituants des cellules ou du milieu de croissance, de la pureté et de la concentration de l'enzyme et de la technique employée pour déterminer la sensibilité enzymatique (Nes *et al.*, 1996).

La spécificité de l'action des bactériocines parmi les bactéries à Gram<sup>+</sup> est fonction des caractéristiques des souches: composition des protéines et des phospholipides membranaires et de la couche de peptidoglycane. L'incapacité des bactériocines à traverser cette barrière est due à leur poids moléculaire et/ou à leur propriétés hydrophobes (Schved *et al.*, 1994).

Dans le cas où la membrane externe est rendue perméable, soit par un traitement physique (Kalchayanand *et al.*, 1992), soit par un traitement chimique (Stevens *et al.*, 1991 et Schved *et al.*, 1994), les bactéries Gram<sup>-</sup> deviennent sensibles aux bactériocines.

D'autres bactériocines de lactobacilles possèdent un champ d'activité pouvant regrouper n'importe quel genre de bactérie Gram<sup>+</sup>: ce sont par exemple les plantaricines C19, A et B (*Lb. plantarum* C19, C-11 et NCDO1103) (Nettles et Barefoot, 1993).

Les substances antimicrobiennes produites par les souches bactériennes isolées du lait cru de chèvre répondent aux critères retenus par Klaenhammer (1988) on peut dire que les souches *Lactobacillus* possèdent une activité antibactérienne, qui est due à l'acide lactique, et à un agent de nature protéique, peut être bactériocine, C'est le cas des substances inhibitrices produites par *Lb. plantarum* (Lb.58, Lb.68).

Lors de la caractérisation des bactériocines, des variations importantes dans les spectres d'activité sont constatées, Il est également noté que la sensibilité d'une souche dépend du genre, de l'espèce et même de la sous-espèce, Ces variations de sensibilité sont dues aux caractéristiques des souches (présence ou absence de sites récepteurs) et donc aux niveaux de lésions occasionnées par le facteur inhibiteur (Kalchayanand *et al.*, 1992).

## 6. Identification par galerie API 50 CHL :

Les résultats de la fermentation des hydrates de carbone sur la galerie API 50CH, ont permis l'identification des espèces, la figure (29) et le tableau (35), indiquent les résultats du profil de fermentation des hydrates de carbones, Après la comparaison des résultats, avec les données de Carr *et al.*, (2002), Axelsson (2004) et Hammes et Hertel (2006). Les souches sont classées dans les espèces suivantes :

- Les souches Lb.58 et Lb.68, appartiennent à l'espèce *Lactobacillus plantarum*, ces résultats sont identiques au profil fermentaire de *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917, obtenu à partir de la base des données de Biomerieux, à qui le pourcentage de similitude était de 100% pour la souche Lb.58 et de 97,95% pour les souches Lb.68.



**Tableau 35:** Comparaison du profil d'utilisation des carbohydrates par Lb.58, Lb.68, Lbc 22, Lbc 5 et Lbc 6.

| hydrates de carbone     | Souches                        |                                |                                |                                |                                |  |
|-------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--|
|                         | Lb.58<br>Lait de chèvre        | Lb.68<br>Lait de chèvre        | LbC 22<br>Lait de chamelle     | Lbc 5<br>Lait de chamelle      | Lbc 6<br>Lait de chamelle      | <i>Lactobacillus plantarum</i><br>ATCC 14917 |
| Témoin                  | -                              | -                              | -                              | -                              | -                              | -  |
| Glycérol                | -                              | -                              | -                              | -                              | -                              | -  |
| Erythritol              | -                              | -                              | -                              | -                              | -                              | -  |
| D- Arabinose            | -                              | -                              | -                              | -                              | -                              | -  |
| L- Arabinose            | +                              | +                              | +                              | +                              | +                              | +  |
| D- Ribose               | +                              | +                              | +                              | +                              | +                              | +  |
| D- Xylose               | -                              | -                              | -                              | +                              | -                              | -  |
| L- Xylose               | -                              | -                              | -                              | -                              | -                              | -  |
| D- Adonitol             | -                              | -                              | -                              | -                              | -                              | -  |
| MDX                     | -                              | -                              | -                              | -                              | -                              | -  |
| D- Galactose            | +                              | +                              | +                              | +                              | +                              | +  |
| D- Glucose              | +                              | +                              | +                              | +                              | +                              | +  |
| D- Fructose             | +                              | +                              | +                              | +                              | +                              | +  |
| D- Mannose              | +                              | +                              | +                              | +                              | +                              | +  |
| L- Sorbose              | -                              | -                              | -                              | -                              | -                              | -  |
| L- Rhamnose             | -                              | -                              | -                              | -                              | -                              | -  |
| Dulcitol                | -                              | -                              | -                              | -                              | -                              | -  |
| Inositol                | -                              | -                              | -                              | -                              | -                              | -  |
| D- Mannitol             | +                              | +                              | +                              | +                              | +                              | +  |
| D- Sorbitol             | +                              | +                              | +                              | +                              | +                              | +  |
| MDM                     | +                              | -                              | +                              | -                              | -                              | +  |
| MDG                     | -                              | -                              | -                              | -                              | -                              | -  |
| NAG                     | +                              | +                              | +                              | +                              | +                              | +  |
| Amydaline               | +                              | +                              | +                              | +                              | +                              | +  |
| Arbutine                | +                              | +                              | +                              | +                              | +                              | +  |
| ESC                     | +                              | +                              | +                              | +                              | +                              | +  |
| Salicine                | +                              | +                              | +                              | +                              | +                              | +  |
| D- Celiobiose           | +                              | +                              | +                              | +                              | +                              | +  |
| D- Maltose              | +                              | +                              | +                              | +                              | +                              | +  |
| D- Lactose <sup>1</sup> | +                              | +                              | +                              | +                              | +                              | V  |
| D- Melibiose            | +                              | +                              | +                              | +                              | +                              | +  |
| D-Saccharose            | +                              | +                              | +                              | +                              | +                              | +  |
| D- Trehalose            | +                              | +                              | +                              | +                              | +                              | +  |
| Inuline                 | -                              | -                              | -                              | -                              | -                              | -  |
| D- Mélézitose           | +                              | +                              | +                              | +                              | +                              | +  |
| D- Raffinose            | +                              | +                              | +                              | +                              | +                              | +  |
| Amidon                  | -                              | -                              | -                              | -                              | -                              | -  |
| Glycogène               | -                              | -                              | -                              | +                              | -                              | -  |
| Xylitol                 | -                              | -                              | -                              | -                              | -                              | -  |
| Gentiobiose             | +                              | +                              | +                              | +                              | +                              | +  |
| D-Turanose              | +                              | +                              | +                              | +                              | +                              | +  |
| D- Lyxose               | -                              | -                              | -                              | -                              | -                              | -  |
| D- Tagatose             | -                              | -                              | -                              | +                              | -                              | -  |
| D- Fucose               | -                              | -                              | -                              | -                              | -                              | -  |
| L-Fucose                | -                              | -                              | -                              | -                              | -                              | -  |
| D- Arabitol             | -                              | -                              | -                              | -                              | -                              | -  |
| L-Arabitol              | -                              | -                              | -                              | -                              | -                              | -  |
| GNT                     | +                              | +                              | +                              | +                              | +                              | +  |
| 2KG                     | -                              | -                              | -                              | -                              | -                              | -  |
| 5KG                     | -                              | -                              | -                              | -                              | -                              | -  |
| Identifiée comme        | <i>Lactobacillus plantarum</i> | <i>Lactobacillus plantarum</i> | <i>Lactobacillus plantarum</i> | <i>Lactobacillus plantarum</i> | <i>Lactobacillus plantarum</i> | <i>Lactobacillus plantarum</i>               |

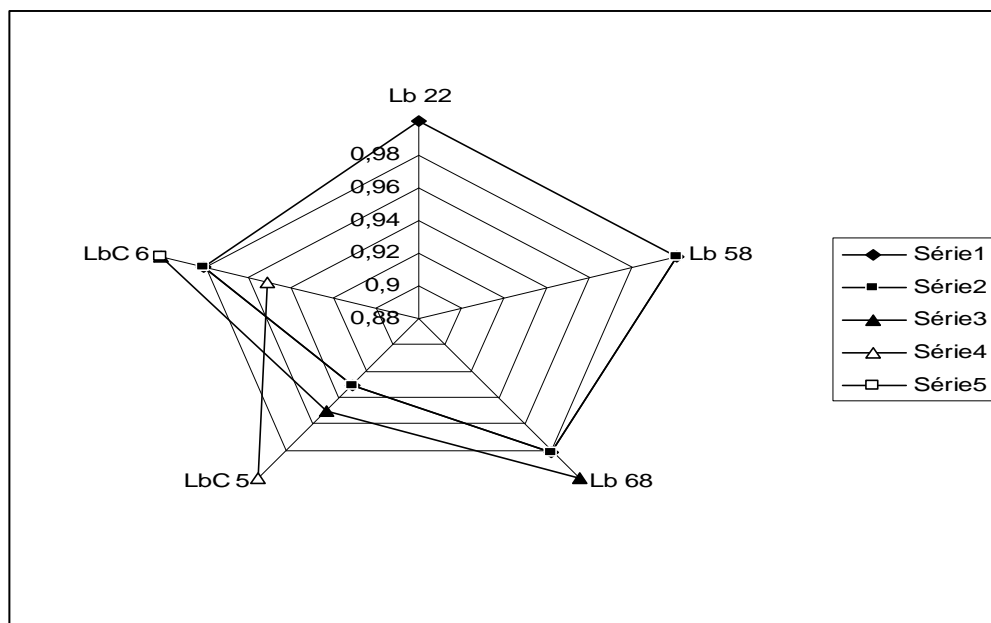
MDX : Méthyl-βD-Xylopyranoside, MDM : Méthyl-αD-Mannopyranoside, MDG : Méthyl-αD-Glucopyranoside, NAG: N-AcétyleGlucosamine, ESC : Esculine citrate de fer, 2KG : Potassium 2-cétogluconate, 5KG : Potassium 5 cétogluconate, GNT : Potassium Gluconate. <sup>1</sup>origine bovine

Afin de donner une approche quantitative entre les différentes souches, le coefficient de simple appariement (SSM) a été calculé, en utilisant les différentes caractéristiques de chaque souche, en prenant en compte les résultats de l'identification du genre et des tests technologiques, Dans le tout la comparaison a pris en compte 62 caractères, Les résultats sont exprimés sous forme de matrice (Fig. 29).

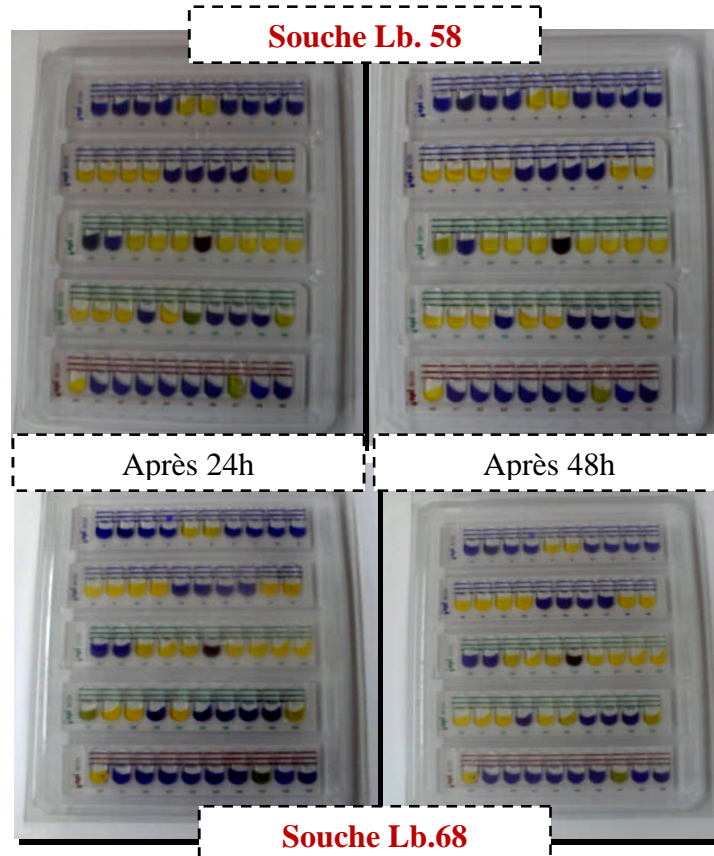
|              |              |              |              |              |              |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| <b>Lb 22</b> | 1,00         |              |              |              |              |
| <b>Lb.58</b> | 1,00         | 1,00         |              |              |              |
| <b>Lb.68</b> | 0,98         | 0,98         | 1,0          |              |              |
| <b>LbC 5</b> | 0,93         | 0,93         | 0,95         | 1,0          |              |
| <b>LbC 6</b> | 0,98         | 0,98         | 1,0          | 0,95         | 1,0          |
|              | <b>Lb 22</b> | <b>Lb.58</b> | <b>Lb.68</b> | <b>LbC 5</b> | <b>LbC 6</b> |

**Figure 29:** Matrice de similitude entre les cinq souches lactiques étudiées.

Le degré de similitude des souches s'étend de 0,93 à la similitude complète 1,0. A partir de ces résultats ont peu clairement distingué 3 groupes: le groupe 1: LbC 22 et Lb.58, le groupe 2: Lb.68 et LbC 6 et le groupe 3: LbC 5.



**Figure 30:** Représentation graphique du coefficient SSM entre les cinq souches lactiques.



**Figure 31:** Test de fermentation des hydrates de carbone sur galerie API 50 CHL des souches Lb.58 et Lb.68

Les caractères microbiologique et le profile fermentaire de la souche *Lb. plantarum* (Lb.58) et de la souche de référence *Lb. plantarum* ATCC 14917 sont identiques à 100 %, Ce coefficient de similitude est calculer entre souche Lb.58 et la souche de référence et la souche (Lb.68) est de 97 %, Ce qui oriente l'identification de la souche (Lb.58) a l'espèce de *Lactobacillus plantarum*.

### 7. Les souches tests :

La confirmation des souches pathogènes a été vérifiée par l'étude morphologique et l'observation microscopique. La confirmation de *staphylococcus aureus* (ATCC 25923, ATCC 29213, ATCC 43300) a été réalisée par la croissance sur milieu Chapman qui nous indique l'utilisation du mannitol et la résistance au sel (NaCl) car ce sont des halophile et le pouvoir pathogène confirmer par les deux tests coagulase et DNase effectuée au CHU d'Oran. L'autre espèce d'*Escherichia coli* ATCC 25922 a été vérifiée par les tests courants des enterobactéries et la de production d'indole.

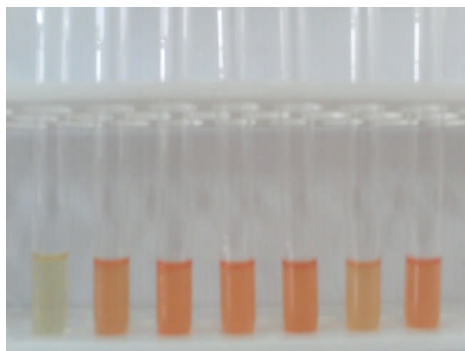
Les bactéries *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* ont été identifiées aussi et vérifiées par les tests biochimiques des enterobactéries et les milieux spécifiques l'identification au niveau du laboratoire central CHU d'Oran.

La souche de *Listeria ivanovii* ATCC 19119 provient du département de chimie anaclitique, de nutrition et science alimentaire, de l'université de Santiago decomposto (Espagne).

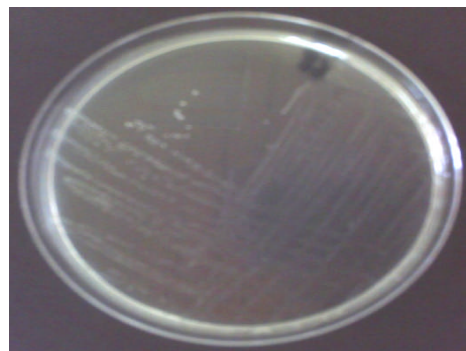
### 8. Appétitudes technologiques des souches :

La production d'acetoïne se traduit par l'apparition d'un anneau rose à la surface du milieu, nos résultats révèlent que tous les isolats sont producteurs d'acetoïne (VP<sup>+</sup>).

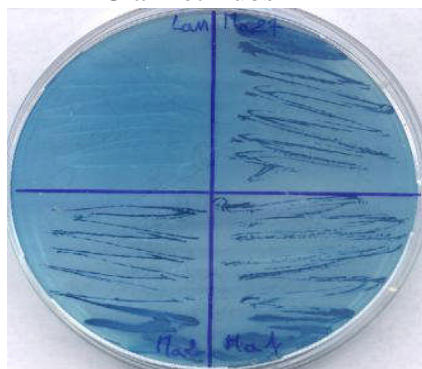
Les cinq souches ont résisté à un chauffage de 30 min à 63,5°C au bain Marie, Elles produisent de l'acetoïne sur milieu Clark et Lubs, ne produisent pas de dextrane sur milieu MSE, utilisent du citrate en présence de glucose « milieu KMK », et possèdent la capacité d'hydrolyser la caséine du lait, Le tableau 36 résume ces différents résultats technologiques :



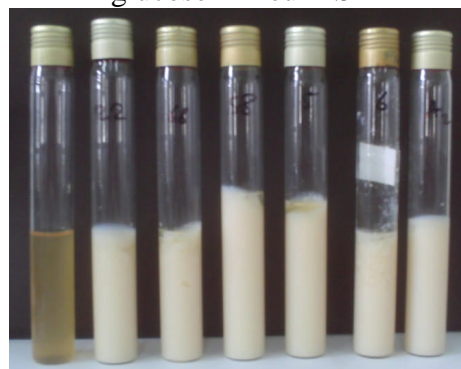
(a) Production d'acetoïne sur milieu Clark et Lubs



(b) Test de production de dextrane glucose milieu MSE



(c) Utilisation du citrate en présence de glucose sur (milieu KMK)



(d) Hydrolyse de la caséine du lait dans milieu MRS liquide

**Figure 32:** Résultats des tests technologiques des cinq souches de *Latobacillus*.

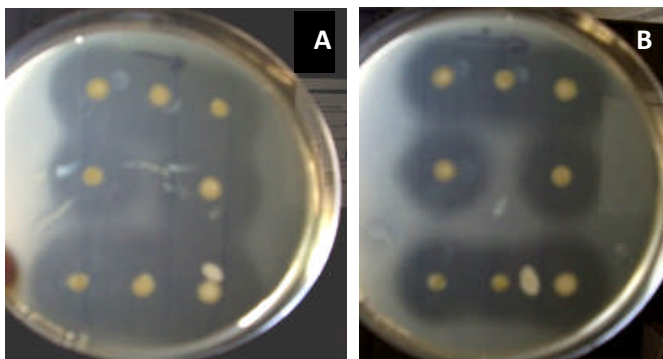
**Tableau 36:** Résultats des tests technologiques des cinq souches de *Latobacillus*; thermorésistance, production d’acetoïne et de dextrane, utilisation du citrate et l’hydrolyse de la caséine du lait.

| Caractère                         | Souches |       |        |       |       |
|-----------------------------------|---------|-------|--------|-------|-------|
|                                   | Lb 58   | Lb 68 | LbC 22 | LbC 5 | LbC 6 |
| Thermorésistance (30min à 63,5°C) | +       | +     | +      | +     | +     |
| production d’acetoïne             | +       | +     | +      | +     | +     |
| Production du dextrane            | -       | -     | -      | -     | -     |
| Utilisation du citrate            | +       | +     | +      | +     | +     |
| Hydrolyse de la caséine du lait   | +       | +     | +      | +     | +     |

**9. L’action des lactobacilles sur la croissance de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *E. coli* sur milieu solide non tamponnée et tamponnée :**

Les résultats obtenus dans l’interaction entre souches lactiques les plus performantes dans le milieu tamponné montrent une inhibition de 8 souches, ces derniers utilisées dans l’interaction avec les souches test à Gram<sup>+</sup> *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et à Gram<sup>-</sup> *Escherichia coli* comme souche pathogène.

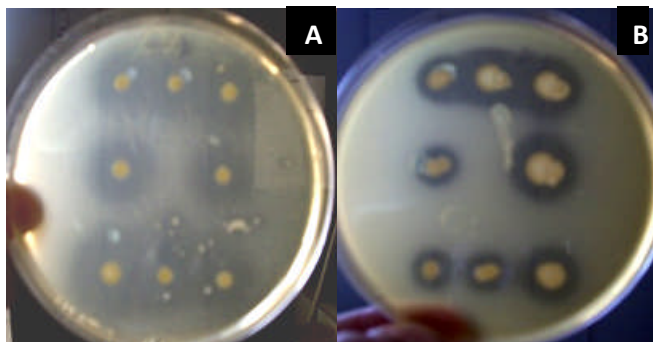
***Staphylococcus aureus* ATCC 25923**



|       |       |       |
|-------|-------|-------|
| Lb.22 | Lb.68 | Lb.21 |
| Lb.52 |       | Lb.55 |
| Lb.54 | Lb.31 | Lb.58 |

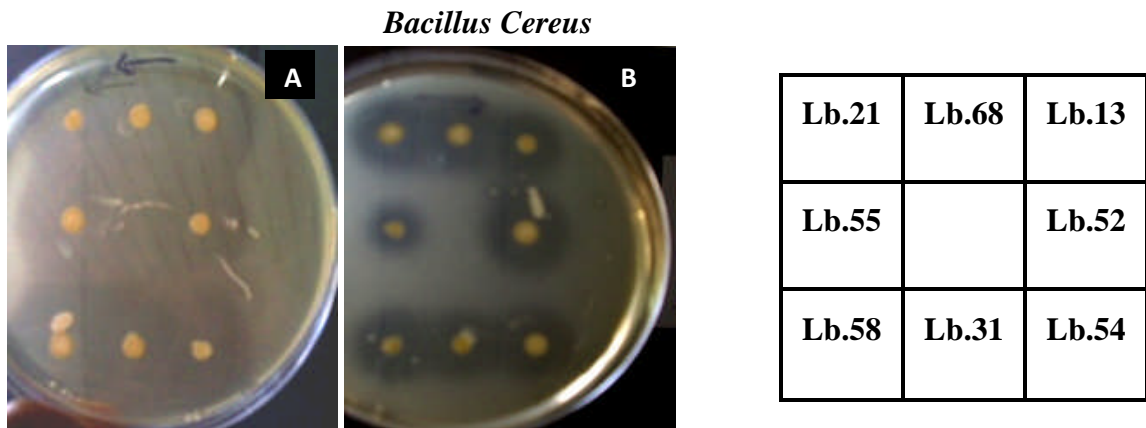
**Figure 33:** L’activité antimicrobienne vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 par l’apparition des zones claires d’inhibition autour des colonies en milieu non tamponné A et en milieu tamponné B.

***Escherichia coli* ATCC 25922**



|       |       |       |
|-------|-------|-------|
| Lb.22 | Lb.68 | Lb.21 |
| Lb.52 |       | Lb.55 |
| Lb.54 | Lb.31 | Lb.58 |

**Figure 34:** Illustre l'activité antimicrobienne vis-à-vis *Escherichia coli* ATCC 25922 par l'apparition des zones claires d'inhibition autour des colonies en milieu non tamponné **A** et en milieu tamponné **B**.



**Figure 35:** Illustre l'activité antimicrobienne vis-à-vis de *Bacillus cereus* Par l'apparition des zones claires d'inhibition autour des colonies en milieu non tamponné **A** et en milieu tamponné **B**.

**Tableau 37:** Résultats des interactions entre les souches de bactéries lactiques et les souches pathogènes, En mesurant le diamètre de la zone d'inhibition en mm (A : Milieu non tamponné ; B : Milieu tamponné).

| Souches | <i>S. aureus</i> ATCC 25923 |    | <i>Bacillus cereus</i> |    | <i>E. coli</i> ATCC 25921 |    |
|---------|-----------------------------|----|------------------------|----|---------------------------|----|
|         | A                           | B  | A                      | B  | A                         | B  |
| Lb.21   | 16                          | 14 | 25                     | 12 | 12                        | 12 |
| Lb.22   | 26                          | 15 | 23                     | 08 | 11                        | 08 |
| Lb.31   | 25                          | 13 | 26                     | 10 | 12                        | 12 |
| Lb.52   | 15                          | 15 | 25                     | 9  | 11                        | 10 |
| Lb.54   | 25                          | 17 | 24                     | 08 | 16                        | 12 |
| Lb.55   | 20                          | 20 | 25                     | 10 | 11                        | 11 |
| Lb.58   | <b>28</b>                   | 22 | <b>26</b>              | 15 | <b>14</b>                 | 12 |
| Lb.68   | <b>19</b>                   | 14 | <b>26</b>              | 11 | <b>13</b>                 | 10 |

On remarque que la souche Lb.58 a donné une inhibition considérable vis à vis de *Staphylococcus aureus*, cette inhibition est due à une substance inhibitrice, sachant que L'expérience a été conduite en milieu tamponné afin d'écarter l'effet d'acidité dû à la production d'acide lactique , les tests supplémentaires à savoir peroxyde , phage et l'effet des enzymes protéolytique confirme la nature de cette substance, ainsi l'inhibition est due à une bactériocine selon la définition donné par Tagg *et al.* (1976).

- Les souches Lb.58 et Lb.68 ont aussi exprimés des inhibitions vis à vis *Bacillus cereus* et *E. coli* a différents diamètres de zone d'inhibition.
- Les souches Lb.58 et Lb.68 ont aussi exprimés des inhibitions vis à vis du *Staphylococcus aureus* en milieu lait en culture mixte.



Pour cette étude nous avons choisi une souche productrice en se basant sur les résultats statistiques et les résultats observés dans l'étude de l'interaction entre souche inhibitrice et souche test *Staphylococcus aureus*, on a remarqué que la souche Lb.58 a présenté un diamètre de 22 mm avec *Staphylococcus aureus* et 15 mm avec *Bacillus cereus* et 12 mm avec *E. coli*.

- La souche 68 a présenté un diamètre de 14 mm avec *Staphylococcus aureus* et 11 mm avec *Bacillus cereus* et 10 mm avec *E. coli*.

## 10. Interactions bactériennes :

### 10.1 L'antagonisme bactérien des souches *Lactobacillus plantarum* (Lb.58, Lb.68) :

Les résultats des tests d'interactions des souches *Lactobacillus* et les souches pathogènes sont présentés dans le Tableaux (38).

Les résultats sont exprimés en mm, par mesure de la distance entre la limité de la colonie bactérienne et le début de la zone de non inhibition de la souche indicatrice.

Les souches présentant une zone claire d'extension latérale supérieure à 2 mm sont considérées comme productrices de substances antibactériennes (Fleming *et al.*, 1975), Le test statistique de Student a été utilisé pour comparer entre les différents résultats.

**Tableau 38:** Résultats des tests d'interaction sur milieu MRS pH 6,2 (A) et MRS tamponné (B) (en mm).

| Souches indicatrices                 | <i>Lb. plantarum</i> 58 |              | <i>Lb. plantarum</i> 68 |              |
|--------------------------------------|-------------------------|--------------|-------------------------|--------------|
|                                      | A                       | B            | A                       | B            |
| <b>Gram +</b>                        |                         |              |                         |              |
| <i>S. aureus</i> ATCC 25 923         | 28,00 ± 1,00            | 20,00 ± 1,00 | 19,00 ± 1,00            | 14,00 ± 1,00 |
| <i>S. aureus</i> ATCC 29 213         | 20,00 ± 1,00            | 15,00 ± 1,00 | 10,00 ± 1,00            | 2,6 ± 0,45   |
| <i>S. aureus</i> ATCC 43 300         | 18,00 ± 1,00            | 10,00 ± 1,00 | 12,00 ± 1,00            | 0,40 ± 0,89  |
| <i>Listeria ivanovii</i> ATCC 19 119 | 10,00 ± 1,00            | 07,66 ± 2,02 | 10,00 ± 1,00            | 1,66 ± 2,02  |
| <i>Bacillus cereus</i>               | 26,00 ± 1,00            | 13,00 ± 1,00 | 26,00 ± 1,00            | 11,00 ± 1,00 |
| <b>Gram -</b>                        |                         |              |                         |              |
| <i>E. coli</i> ATCC 25 922           | 14,00 ± 1,00            | 13,00 ± 1,91 | 13,00 ± 1,00            | 10,00 ± 1,00 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>         | 7,50 ± 1,80             | 2,00         | 6,00 ± 2,00             | 0,5          |
| <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>   | 2,00 ± 0,50             | 0,5          | 5,00 ± 0,50             | 2 ± 1        |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>        | 3,16 ± 1,75             | 0,5          | 4,50 ± 0,50             | 0,5          |
| <i>Salmonella enterica</i>           | 5,00 ± 0,50             | 3,00         | 3,00 ± 0,50             | 1,50 ± 0,70  |
| <b><i>Lactobacillus</i></b>          |                         |              |                         |              |
| <i>Lb. plantarum</i> 58              | 0,00                    | 0,00         | 2                       | 0,5          |
| <i>Lb. plantarum</i> 68              | 3,00                    | 1,00         | 0,00                    | 0,00         |

#### 10.1.1 Inhibition des souches *Staphylococcus aureus* :

Dans notre étude, on a utilisé trois souches de *S. aureus* : ATCC 25 923, ATCC 29213, et ATCC 43300.

##### a) Inhibition de la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 par les souches *Lactobacillus plantarum* (Lb.58 et Lb.68):

Sur le milieu MRS normal (pH 6,2) toutes les souches lactiques ont inhibées la souche *S. aureus* ATCC 25923, Sur milieu MRS tamponnée (pH 7), les deux souches *Lactobacillus*

plantarum (Lb.58, Lb. 68) possèdent une activité inhibitrice sur la souche *S. aureus* ATCC 25923, Après l'application du test de Student, il apparait qu'il existe une différence significative entre l'activité inhibitrice des souches Lb.58, Lb.68.

**b) Inhibition de la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 par les souches *Lactobacillus plantarum* (58 et 68):**

Sur le milieu MRS normal (pH 6,2) toutes les souches lactiques ont inhibées la souche *S. aureus* ATCC 29213, avec une activité d'inhibition égale à  $10 \pm 1$  mm.

Sur milieu MRS tamponné (pH 7), les cinq souches *Lactobacillus plantarum* (Lb.58, Lb.68) possèdent une activité inhibitrice sur la souche *S. aureus* ATCC 25923, Après l'application du test de Student, il apparait que la souche Lb.58 possède la meilleure activité inhibitrice avec un score de  $15,00 \pm 0,83$  mm, Une activité qui ne diffère pas beaucoup sur celle observé sur un milieu MRS normal, La souche de *Lb. plantarum* (Lb.68) a une grande différence par rapport au milieu normale et la souche *Lb. plantarum* (Lb.58).

**c) Inhibition de la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 par les souches *Lactobacillus plantarum* (Lb.58 et Lb.68):**

Sur le milieu MRS normal (pH 6,2) toutes les deux souches lactiques ont inhibées la souche *S. aureus* ATCC 43300, avec une activité d'inhibition égale à  $18 \pm 1$  mm pour la souche Lb. 58, et de  $12 \pm 1$  mm pour Lb. 68.

Sur milieu MRS tamponné (pH 7), la souche Lb.58 possède une activité inhibitrice contre la souche *S. aureus* ATCC 43300, Après l'application du test de Student, il apparait que la souche Lb.58 possède la meilleure activité inhibitrice avec un score de  $10,00 \pm 1$  mm, Une activité qui ne diffère pas trop sur celle observée sur un milieu MRS normal, La souche Lb.68, possède une très faible activité inhibitrice sur *S. aureus* ATCC 43300, avec un score de  $0,40 \pm 0,89$  mm.

**10.1.2 Inhibition de la souche *Listeria ivanovii* ATCC 19119 :**

Sur le milieu MRS normal (pH 6,2) toutes les deux souches lactiques ont inhibées la souche *Listeria ivanovii* ATCC 19119, avec une activité d'inhibition égale à  $10 \pm 1$ mm.

Sur milieu MRS tamponné (pH 7), les deux souches Lb.58, Lb.68 possèdent une activité inhibitrice contre la souche *Listeria ivanovii* ATCC 19119, Après l'application du test de Student, il apparait que la souche de *Lb. plantarum* (58) possède la meilleure activité inhibitrice avec un score de  $7,66 \pm 2,02$  mm.



**10.1.3 Inhibition de la souche *Escherichia coli* ATCC 25922:**

Sur le milieu MRS normal (pH 6,2) toutes les deux souches lactiques ont inhibées la souche *E. coli* ATCC 25922, avec une activité d'inhibition égale à  $14,00 \pm 1$  mm et  $13,00 \pm 1$  mm pour *Lb. plantarum* (Lb.58, Lb.68) respectivement.

Sur milieu MRS tamponné (pH 7), les souches (Lb.58, Lb.68) possèdent une activité inhibitrice contre la souche *E. coli* ATCC 25922, Après l'application du test de Student, il apparait que la souche de *Lb. plantarum* (Lb.58) possède la meilleure activité inhibitrice avec un score de  $10,00 \pm 1,91$ .

**10.1.4 Inhibition de la souche *Klebsiella pneumoniae* :**

Sur le milieu MRS normal (pH 6,2), les souches *Lb. plantarum* (Lb.58, Lb.68) ont inhibées la souche *Klebsiella pneumoniae*, Après l'application du test statistique de Student, il n'existe pas apparemment une différence significative entre leur activité antibactérienne, elle est estimée à  $7,5 \pm 1,80$  mm.

Sur milieu MRS tamponné (pH 7), la souche *Lb. plantarum* (Lb.58) a inhibées la souche *Klebsiella pneumoniae*, avec le minimum accepté (2 mm), Alors que les souches *Lb. plantarum* (Lb.68) a une activité de  $0,5 \pm 0,00$  mm dans ces conditions.

**10.1.5 Inhibition de la souche *Acinetobacter calcoaceticus* :**

Sur le milieu MRS normal (pH 6,2), les souches *Lb. plantarum* (Lb.58 et Lb.68) ont inhibées la souche *Acinetobacter calcoaceticus*, Après l'application du test statistique de Student, on distingue la souche *Lb. plantarum* (Lb.58) qui a une activité antibactérienne estimée à  $2,00 \pm 0,50$  mm, et la souche *Lb. plantarum* (Lb.68) qui ont une activité aux alentours de  $5,00 \pm 0,50$  mm.

Sur milieu MRS tamponné (pH 7), les souches *Lb. plantarum* (Lb.58 et Lb.68) ont inhibées la souche *Acinetobacter calcoaceticus*, La souche *Lb. plantarum* (Lb.68) possède une activité inhibitrice de  $2 \pm 1$  mm et la souche *Lb. plantarum* (Lb.58) a inhibé avec 0,5 mm.

**10.1.6 Inhibition de la souche *Pseudomonas aeruginosa* :**

Sur le milieu MRS normal (pH 6,2), les souches *Lb. plantarum* (Lb.58, Lb.68) ont inhibée la souche *Pseudomonas aeruginosa*, Après l'application du test statistique de Student, les souches ont presque la même activité aux alentours de  $4,50 \pm 0,50$  mm.

Sur milieu MRS tamponné (pH 7), les souches *Lb. plantarum* (Lb.58 et Lb.68) ont inhibées la souche *Pseudomonas aeruginosa*, avec le minimum accepté de 0,5 mm.

**10.1.7 Inhibition de la souche *Salmonella enterica* :**

Sur le milieu MRS normal (pH 6,2), les souches *Lb. plantarum* (Lb.58 et Lb.68) ont inhibées la souche *Salmonella enterica*, Après l'application du test statistique de Student, les souches *Lb. plantarum* (Lb.58 et Lb.68) ont presque la même activité aux alentours de  $5,00 \pm 0,5$  mm, La souche *Lb. plantarum* (Lb.68) à une activité inhibitrice de  $5,00 \pm 0,5$  mm.

Sur milieu MRS tamponné (pH 7), aucune souche lactique n'a inhibé la souche *Salmonella enterica*.

**10.1.8 Inhibition de la souche *Bacillus cereus* :**

Sur le milieu MRS normal (pH 6,2), les souches *Lb. plantarum* (Lb.58 et Lb.68) ont inhibées la souche *Bacillus cereus* après l'application du test statistique de Student, les souches ont la même activité aux alentours de  $26,00 \pm 1,00$  mm.

Sur milieu MRS tamponné (pH 7), les souches *Lb. plantarum* (Lb.58 et Lb.68) ont inhibées la souche *Pseudomonas aeruginosa*, avec  $3,00 \pm 0,0$  mm pur *Lb. plantarum* (Lb.58) et  $1,5 \pm 0,00$  pour *Lb. plantarum* (Lb.68).

**10.1.9 Inhibition de la souche *Lactobacillus plantarum* Lb.58:**

Sur le milieu MRS normal (pH 6,2), la souche Lb.68 a inhibé la souche *Lactobacillus plantarum* (Lb.58), Après l'application du test statistique de Student, La souche *Lb. plantarum* (Lb.58) à une activité inhibitrice de  $2,00 \pm 0,00$  mm.

Sur milieu MRS tamponné (pH 7), la souche *Lb. plantarum* (Lb.68) a inhibée la souche *Lactobacillus plantarum* (Lb.58), avec une activité inhibitrice acceptée (0,5 mm).

**10.1.10 Inhibition de la souche *Lactobacillus plantarum* Lb.68:**

Sur le milieu MRS normal (pH 6,2), la souche *Lb. plantarum* (Lb.68) a inhibée la souche *Lactobacillus plantarum* (Lb.58), Après l'application du test statistique de Student, La souche (Lb.58) à une activité inhibitrice de  $3,00 \pm 0,00$  mm. Sur milieu MRS tamponné (pH 7), la souche *Lb. plantarum* (Lb.68) a inhibée la souche *Lactobacillus plantarum* (Lb.58), avec une activité inhibitrice acceptée (1 mm).

**11. Cinétique d'évolution de l'acidité (pH et D°) et Etude du pouvoir coagulant du lait écrémé de *Lactobacillus plantarum* a différentes températures d'incubation :**

C'est principalement pour leur activité acidifiante que les industries agro-alimentaires utilisent les bactéries lactiques, car elle est considérée comme un critère primordial de sélection des souches à intérêt, L'activité acidifiante de *Lactobacillus plantarum* (Lb.58) sélectionnée et isolée à partir du lait de chèvre de l'ouest d'Algérie, après 0, 3, 6, 9, 12, 15,

18, 24 et 48h d'incubation à 20°C, 30°C, 37°C et 44°C a été évaluée, Le suivi de l'activité acidifiante de la souche a été réalisé sur le milieu lait écrémé stérilisé, selon la méthode décrite par Psono *et al.*, (2006).

**Tableau 39:** Les variations de l'acidité et pH en fonction du temps et températures en milieu lait écrémé.

| Température |    | 0h   | 3h   | 6h    | 9h    | 12h   | 15h   | 18h   | 24h   | 48h    |
|-------------|----|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| 20°C        | °D | 1,00 | 4,00 | 9,00  | 14,00 | 19,00 | 21,00 | 28,00 | 35,00 | 44,00  |
|             | pH | 6,80 | 6,75 | 6,70  | 6,50  | 6,42  | 6,33  | 6,25  | 5,90  | 5,53   |
| 30°C        | °D | 1,00 | 4,00 | 8,00  | 14,00 | 23,00 | 35,00 | 49,00 | 68,00 | 130,00 |
|             | pH | 6,80 | 6,77 | 6,68  | 6,50  | 6,28  | 5,98  | 5,70  | 5,00  | 4,92   |
| 37°C        | °D | 1,00 | 4,00 | 8,00  | 13,00 | 19,00 | 28,00 | 36,00 | 46,00 | 61,00  |
|             | pH | 6,80 | 6,66 | 6,58  | 6,50  | 6,28  | 6,11  | 5,98  | 5,70  | 5,24   |
| 44°C        | °D | 1,00 | 5,00 | 10,00 | 16,00 | 23,00 | 30,00 | 38,00 | 52,00 | 80,00  |
|             | pH | 6,80 | 6,74 | 6,62  | 6,50  | 6,40  | 6,42  | 6,34  | 6,09  | 5,29   |

Les valeurs du pH enregistrées :

- À 20°C varie entre 6,70 et 6,90 après 6h d'incubation; 6,42 après 12h d'incubation; et enfin entre 5,90 et 5,53 après 24h et 48h d'incubation.
- À 30°C varie entre 6,68 et 6,90 après 6h d'incubation; 6,28 après 12h d'incubation; et enfin entre 5,00 et 4,92 après 24h et 48h d'incubation.
- À 37°C varie entre 6,58 et 6,90 après 6h d'incubation; 6,28 après 12h d'incubation; et enfin entre 5,70 et 5,24 après 24h et 48h d'incubation.
- À 44°C varie entre 6,62 et 6,90 après 6h d'incubation; 6,40 après 12h d'incubation; et enfin entre 6,09 et 5,29 après 24h et 48h d'incubation.

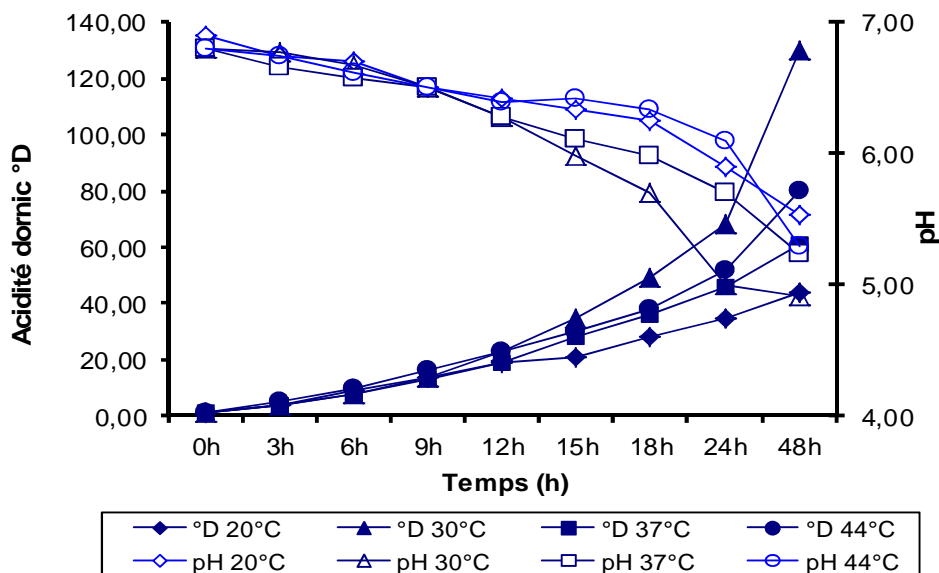
Le résultat de la variation du pH de *Lb. plantarum* (Lb.58) se résume comme suit: après 6h d'incubation, les valeurs du pH minimal et maximal à 20°C et 30°C atteintes sont 6,70 et 6,68 respectivement, soit une moyenne de  $6,69 \pm 0,11$  avec une production d'acide lactique de 8°D et 9°D; après 12h d'incubation, l'acidification du lait écrémé atteint un pH minimal de 6,42 et maximal de l'ordre de 6,28, soit une moyenne de  $6,35 \pm 0,15$  et une production d'acide lactique de 19°D et 23°D ; après 24h d'incubation, la moyenne d'acidification est de l'ordre de  $5,45 \pm 0,3$ , avec une valeur de pH minimal de 5,90 et maximale de l'ordre de 5,00 et une production d'acide lactique de 35°D et 68°D, En fin après 48 h d'incubation, la moyenne d'acidification est de l'ordre de  $5,22 \pm 0,28$ , avec une valeur de pH minimal de 5,53 et maximale de l'ordre de 4,92 et une production d'acide lactique de 44°D et 130°D.

les valeurs du pH minimal et maximal à 37°C et 44°C atteintes sont 6,58 et 6,62 respectivement, soit une moyenne de  $6,60 \pm 0,02$  et une production d'acide lactique de 8 °D et 10 °D ; après 12 h d'incubation, l'acidification du lait écrémé atteint un pH minimal de 6,40 et maximal de l'ordre de 6,28, soit une moyenne de  $6,34 \pm 0,06$  et une production d'acide

lactique de 19°D et 23°D ; après 24 h d'incubation, la moyenne d'acidification est de l'ordre de  $5,89 \pm 0,19$ , avec une valeur de pH minimal de 6,09 et maximale de l'ordre de 5,70 et une production d'acide lactique de 46°D et 52°D.

Enfin après 48h d'incubation, la moyenne d'acidification est de l'ordre de  $5,26 \pm 0,03$ , avec une valeur de pH minimal de 5,29 et maximale de l'ordre de 5,24 et une production d'acide lactique de 61°D et 80°D.

Selon la capacité de *Lb. plantarum* (Lb.58) à réduire le pH du lait écrémé après 6h d'incubation à différentes températures en peut classer cette dernière comme une souche moyennement acidifiante, dont les pH observé après 6h d'incubation à différentes températures d'incubations se situent entre 6,58 et 6,70 avec une production d'acide lactique de 8°D à 10°D, Enfin après 24h et 48h d'incubation se dernier attient sont minimal qui est de 5,53 et maximal 4,92 une production d'acide lactique de 44°D à 130°D.



**Figure 36:** Variations de l'acidité et du pH en fonction du temps et différentes températures de *Lb. plantarum* (Lb.58).

Le résultat de l'activité acidifiante montre une variation dans les valeurs du pH entre les différentes températures d'incubations de la souche *Lb. plantarum*. Nos résultats sont comparables à ceux obtenus par certains travaux ayant étudié l'activité acidifiante de souches de bactéries lactiques appartenant au genre *Lactobacillus* (Xanthopoulos *et al.*, 1997; Ayad *et al.*, 2004 et Dagdemir et Ozdemir, 2008). Ces auteurs ont montré qu'il y a une variation dans les valeurs du pH entre les souches à l'intérieure de la même espèce et ont classé les souches étudiées comme étant "rapide" ou "lente" par rapport à leur pouvoir acidifiant. Cette diversité dans l'activité acidifiante offre donc un large choix pour satisfaire les différentes exigences technologiques. En ce qui concerne le test de coagulation du lait écrémé à 20°C, 30°C, 37°C

et 44°C après 24h d'incubation. Les résultats obtenus ont montré que la souche *Lb. plantarum* coagule rapidement le lait à 30°C et 37°C. Cette capacité à coaguler le lait a été également testée après 48h d'incubation.

Le mécanisme de coagulation du lait par des bactéries lactiques peut être provoqué soit par la transformation progressive du lactose du lait en acide lactique qui provoque l'abaissement du pH et la coagulation du lait; soit par un système enzymatique ou enzymes protéolytiques qui ont la propriété de coaguler le lait.

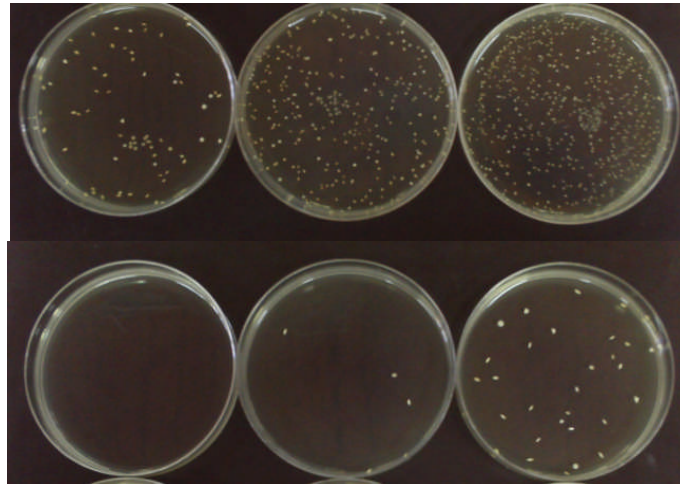
La souche de *Lb. plantarum* (Lb.58) produit la valeur plus élevée d'acide lactique à 30°C après 24h d'incubation elle est de 68°D (6.8 g/l) et de 130°D (13 g/l) après 48h d'incubation, *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus brevis* étudiés par Katina et al 2002 ont produit une quantité de 4 à 5g d'acide lactique par litre, ce résultat est proche de notre souche en particulier (Kask et al., 1999), En trouve que cette dernière produit une quantité d'acide lactique supérieure à 4 g/l et atteindre une valeur maximale de 10 g/l, En milieu synthétique saturé en glucose, Callewaert et de Vuyst (2002) ont révélées que *Lactobacillus reuteri* produit en 24h 40g d'acide lactique par litre.

Compte tenu de résultats obtenus, la souche sélectionnée durant cette étude peut être proposée pour une éventuelle utilisation comme ferments pour fabriquer des produits de transformation du lait en Algérie, Cette acidification provoque la coagulation du lait, favorise l'égouttage du gel, participe aux qualités organoleptiques des produits transformés et inhibe la croissance des microorganismes nuisibles ou indésirables, Donc on peut considérer que ce paramètre est un élément essentiel pour l'utilisation de ces souches dans l'industrie agro-alimentaire, De plus, une association de cette souche avec des souches lactiques habituelles ou commerciales est indispensable pour obtenir un produit de qualité organoleptique et nutritionnelle recherchée.

En conclusion, l'utilisation des souches sélectionnées et isolées à partir du lait de chèvre d'Algérie pour la fabrication des fromages artisanaux, boissons ou laits fermentés offre pour notre pays un aliment approprié et compétitif aux besoins de nos citoyens, Aussi, la connaissance de nouvelles souches de bactéries lactiques utilisées dans l'industrie agroalimentaire offre une nouvelle voie dans le domaine de la recherche scientifique en microbiologie appliquée dont le but de produire à l'avenir de nouveaux produits alimentaires concurrentiels sur le plan national et international type Kefir (*Lb. plantarum* et *Lb. fermentum*), le Dahi dans lequel on ajoute, en plus les deux types de ferments utilisés pour le yaourt, des souches de l'espèce *Lb. plantarum*.

## 12. Cinétique de croissance dans le milieu MRS à différentes températures d'incubation:

La cinétique de croissance de la souche a été réalisée sur milieu MRS pH 5,4, La croissance bactérienne est suivie par dénombrement sur milieu solide MRS (Fig. 38).



**Figure 38:** Dénombrement des colonies de *Lactobacillus plantarum* sur milieu MRS solide après incubation à 30°C pendant 24h.

La vitesse de croissance est estimée par le calcul de la pente de la droite de régression de la courbe de croissance de chaque souche entre T=0h et T=12h, Le taux de croissance est calculé à partir de l'équation suivante :

$$\text{Taux de croissance} = \frac{\text{Log}N_t - \text{Log}N_0}{\text{Ln}2 * T}$$

Ce test a été appliqué que sur la souche *Lb. plantarum*, la cinétique de croissance a été réalisée sur milieu MRS, Les tubes étaient incubés à différentes températures (20°C, 30°C 37°C, et 44°C), A chaque point d'observation choisis (0, 2, 4, 6, 8, 18, 24, 48h), la croissance bactérienne était suivie par mesure de la densité optique à 600 nm et l'acidification du milieu par pH mètre.

Les résultats de ce test sont présentés dans le tableau (40, 41) et la figures (38, 39), La concentration bactérienne est estimée en Log ufc/ml à partir de la densité optique.

**Tableau 40:** Le dénombrement en log (ufc/ml) chez *Lactobacillus plantarum* en fonction du temps et de la température.

| Temps             | 0h  | 3h   | 6h   | 9h   | 12h  | 15h  | 18h  | 24h  | 48h  |
|-------------------|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Log ufc/ml à 20°C | 5,1 | 5,44 | 6,43 | 7,46 | 7,68 | 7,73 | 7,9  | 7,45 | 6,98 |
| pH à 20°C         | 6,5 | 5,93 | 5,88 | 5,72 | 5,24 | 5,17 | 5,09 | 4,82 | 4,7  |
| Log ufc/ml à 30°C | 5,1 | 7,06 | 7,4  | 7,6  | 8    | 8,2  | 8,4  | 7,5  | 7    |
| pH à 30°C         | 6,5 | 6,24 | 6    | 5,78 | 5,49 | 5,14 | 4,98 | 3,85 | 3,78 |
| Log ufc/ml à 37°C | 5,2 | 6,86 | 7,1  | 7,4  | 7,52 | 7,55 | 7,55 | 7,18 | 6,81 |
| pH à 37°C         | 6,5 | 6,39 | 6,12 | 5,93 | 5,74 | 5,51 | 5,34 | 5,27 | 5,12 |
| Log ufc/ml à 44°C | 5,4 | 7    | 7,32 | 7,95 | 8,03 | 8,17 | 8,29 | 7,9  | 7,35 |
| pH à 44°C         | 6,5 | 6,42 | 6,28 | 6,03 | 5,97 | 5,84 | 5,62 | 5,42 | 5,26 |

**Tableau 41:** Le taux de de croissance ( $\mu$ ) et le temps de génération (G) chez *Lactobacillus plantarum* a différentes températures d'incubation,

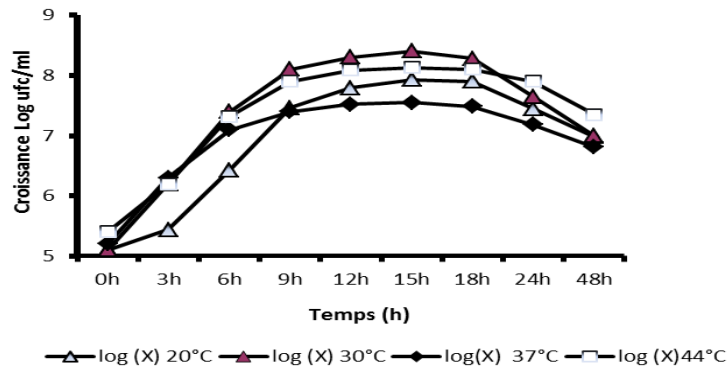
| Températures | <i>Lactobacillus plantarum</i> (Lb.58) |       |        |
|--------------|--|-------|--------|
|              | $\mu$                                  | G (h) | G (mn) |
| 20°C         | 0,17                                   | 5,88  | 353    |
| 30°C         | 0,30                                   | 3,33  | 200    |
| 37°C         | 0,20                                   | 5,00  | 300    |
| 44°C         | 0,16                                   | 6,25  | 375    |

**Dans l'incubation à 20°C:** La concentration initiale de la souche était de 5,1 Log<sub>10</sub> ufc/ml l'analyse de régression fournit une valeur de 0,02 unité de Log<sub>10</sub> ufc/ml par h (soit un taux de croissance de 0,17 h<sup>-1</sup>, ou un temps de génération de 352 min environ), Après 24 h, la concentration bactérienne est estimée de 7,45 Log<sub>10</sub> ufc/ml, La vitesse de l'acidification du milieu est estimée par le calcul de la pente de la droite de régression a la courbe de variation du pH, elle est de – 0,005 unité de pH par heure.

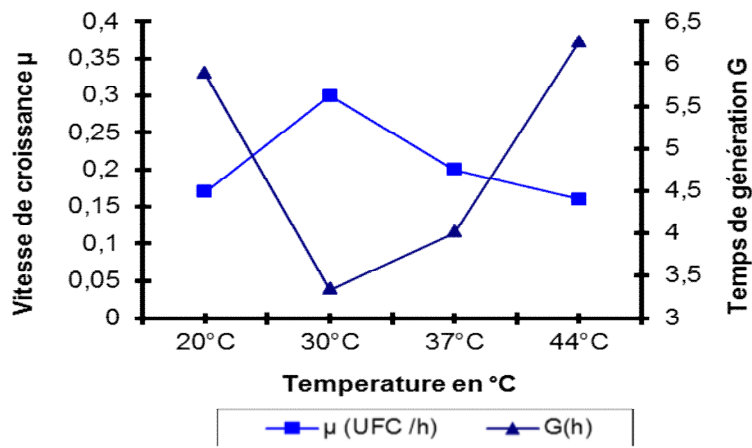
**Dans l'incubation à 30°C:** La concentration initiale de la souche était de 5,1 Log<sub>10</sub> ufc/ml l'analyse de régression fournit une valeur de 0,10 unité de Log<sub>10</sub> ufc/ml par h (soit un taux de croissance de 0,3 h<sup>-1</sup>, ou un temps de génération de 140 min environ), Après 24 h, la concentration bactérienne est estimée de 7,5 Log<sub>10</sub> ufc/ml, La vitesse de l'acidification du milieu est estimée par le calcul de la pente de la droite de régression a la courbe de variation du pH, elle est de – 0,18 unité de pH par heure.

**Dans l'incubation à 37°C:** La concentration initiale de la souche était de 5,2 Log<sub>10</sub> ufc/ml, l'analyse de régression fournit une valeur de 0,06 unité de Log<sub>10</sub> ufc/ml par h (soit un taux de croissance de 0,2 h<sup>-1</sup>, ou un temps de génération de 300 min environ), Après 24 h, la concentration bactérienne est estimée de 7,18 Log<sub>10</sub> ufc/ml, La vitesse de l'acidification du milieu est estimée par le calcul de la pente de la droite de régression a la courbe de variation du pH, elle est de – 0,011 unité de pH par heure.

**Dans l'incubation à 45°C:** La concentration initiale de la souche était de 5,4 Log<sub>10</sub> ufc/ml l'analyse de régression fournit une valeur de 0,04 unité de Log<sub>10</sub> ufc/ml par h (soit un taux de croissance de 0,16 h<sup>-1</sup>, ou un temps de génération de 375 min environ), Après 24 h, la concentration bactérienne est estimée de 7,9 Log<sub>10</sub> ufc/ml, La vitesse de l'acidification du milieu est estimée par le calcul de la pente de la droite de régression a la courbe de variation du pH, elle est de – 0,033 unité de pH par heure.



**Figure 38:** Effet de la température d'incubation sur la croissance de *Lactobacillus plantarum* (Lb.58) en milieu MRS.



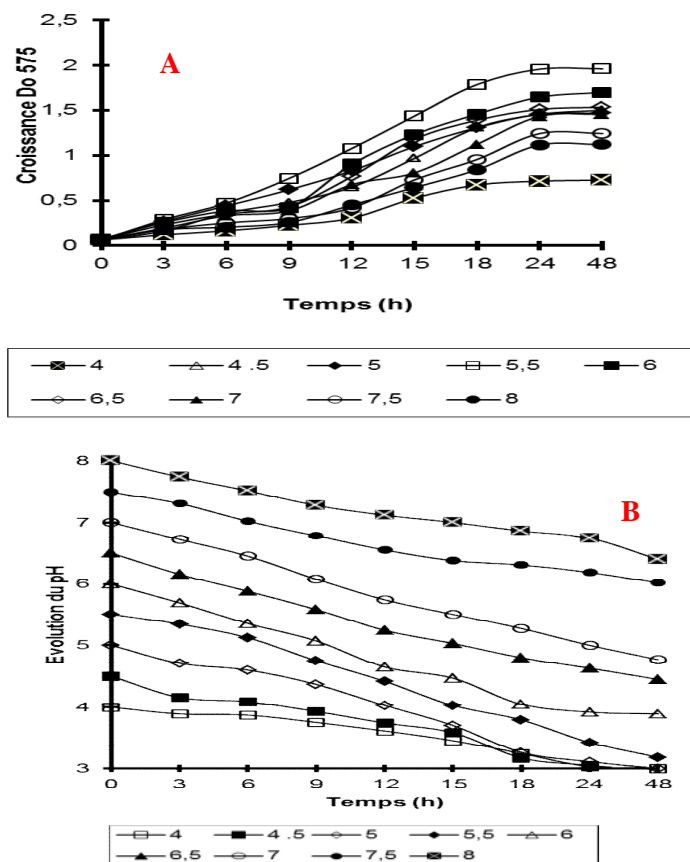
**Figure 39:** Changement de la vitesse de croissance ( $\mu$ ) de *Lactobacillus plantarum* (Lb.58) et le temps de génération ( $G$ ) en fonction de la température d'incubation.

A partir des résultats de calculs de  $\mu$  et  $G$  montre ont peu déduire que la température optimale de croissance chez *Lb. plantarum* (Lb.58) est 30°C, car le temps de dédoublement des cellules pour *Lb. plantarum* à cette température est plus réduit (140 min) et la vitesse de croissance est plus importante ( $\mu = 0,3$ ). Concernant l'acidité qui est relié étroitement à la croissance bactérienne, plus le taux de croissance est élevé plus le taux d'acidité est plus important, plus le pH diminue (livre des bactéries lactiques), Ce qui explique l'augmentation de l'acidité qui atteint 130°D pour *Lb. plantarum* (Lb.58) à une température de 30°C par conséquent une diminution de pH qui atteint 4,92 avec une vitesse d'acidification de  $-0,011$  unité de pH /h.



**Tableau 42:** Les résultats de la mesure de densité optique et pH de *Lb. plantarum* (Lb.58) incubée à 20°C.

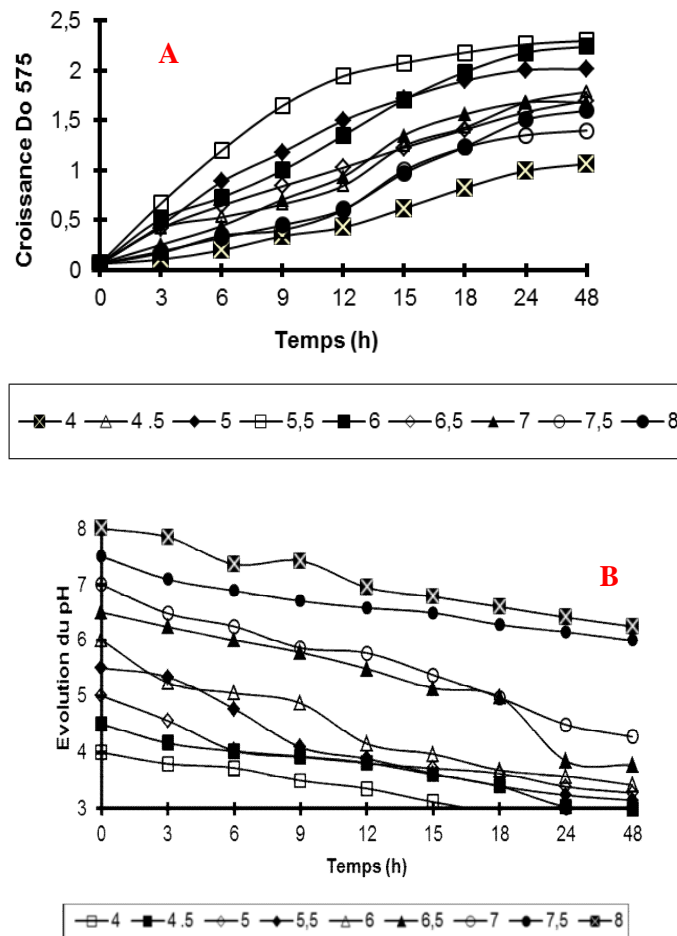
| pH  | Temps | 0h    | 3h    | 6h    | 9h    | 12h   | 15h   | 18h   | 24h   | 48h   |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 4   | pH    | 4     | 3,89  | 3,87  | 3,75  | 3,61  | 3,45  | 3,24  | 3,03  | 3     |
| 4   | Do    | 0,063 | 0,12  | 0,164 | 0,225 | 0,305 | 0,525 | 0,672 | 0,714 | 0,725 |
| 4,5 | pH    | 4,5   | 4,16  | 4,09  | 3,93  | 3,74  | 3,58  | 3,17  | 3,05  | 2,95  |
| 4,5 | Do    | 0,064 | 0,163 | 0,36  | 0,478 | 0,647 | 0,967 | 1,307 | 1,455 | 1,5   |
| 5   | pH    | 5     | 4,71  | 4,6   | 4,37  | 4,03  | 3,89  | 3,26  | 3,11  | 3     |
| 5   | Do    | 0,067 | 0,267 | 0,44  | 0,618 | 0,829 | 1,097 | 1,307 | 1,455 | 1,467 |
| 5,5 | pH    | 5,5   | 5,34  | 5,12  | 4,95  | 4,23  | 4,03  | 3,79  | 3,42  | 3,18  |
| 5,5 | Do    | 0,062 | 0,287 | 0,471 | 0,745 | 1,076 | 1,435 | 1,785 | 1,956 | 1,96  |
| 6   | pH    | 6     | 5,69  | 5,02  | 4,85  | 4,65  | 4,47  | 4,05  | 3,92  | 3,89  |
| 6   | Do    | 0,074 | 0,255 | 0,385 | 0,42  | 0,9   | 1,231 | 1,456 | 1,645 | 1,698 |
| 6,5 | pH    | 6,5   | 5,93  | 5,88  | 5,72  | 5,24  | 5,17  | 5,09  | 4,82  | 4,7   |
| 6,5 | Do    | 0,067 | 0,23  | 0,35  | 0,43  | 0,765 | 1,178 | 1,389 | 1,509 | 1,532 |
| 7   | pH    | 7     | 6,72  | 6,45  | 5,91  | 5,74  | 5,6   | 5,27  | 5     | 4,92  |
| 7   | Do    | 0,067 | 0,193 | 0,331 | 0,385 | 0,675 | 0,805 | 1,123 | 1,432 | 1,456 |
| 7,5 | pH    | 7,5   | 7,31  | 7,02  | 6,94  | 6,85  | 6,72  | 6,64  | 6,5   | 6,02  |
| 7,5 | Do    | 0,062 | 0,178 | 0,252 | 0,3   | 0,418 | 0,728 | 0,954 | 1,242 | 1,243 |
| 8   | pH    | 8     | 7,74  | 7,52  | 7,28  | 7,12  | 7     | 6,86  | 6,74  | 6,4   |
| 8   | Do    | 0,067 | 0,176 | 0,204 | 0,257 | 0,45  | 0,642 | 0,84  | 1,115 | 1,12  |



**Figure 40:** Résultats de la mesure de cinétique de croissance Do (A) et l'évolution du pH (B) de *Lb. plantarum* (Lb.58) incubée à 20°C.

**Tableau 43:** Les résultats de la mesure de densité optique et pH de *Lb. plantarum* (Lb.58) incubée à 30°C.

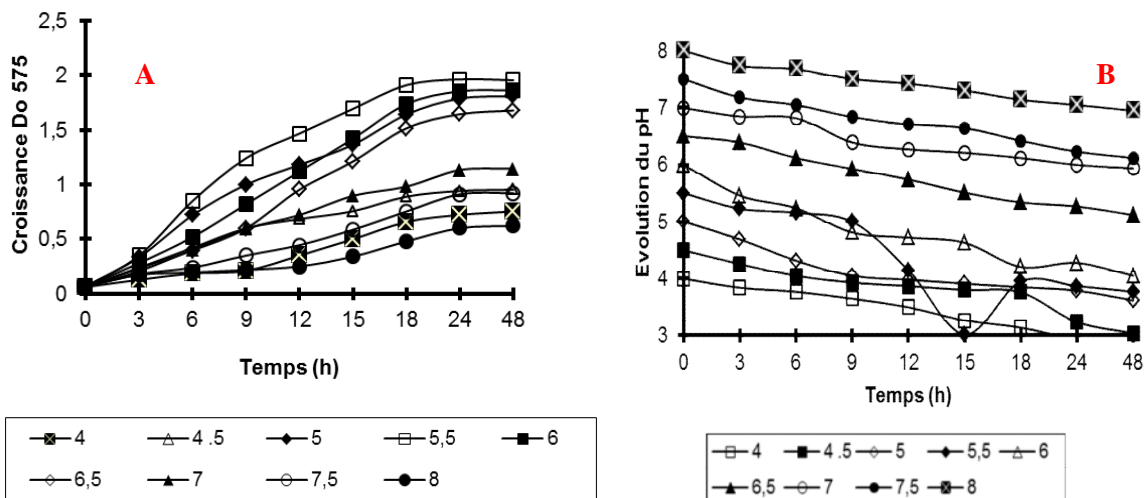
| pH  |    | 0h    | 3h    | 6h    | 9h    | 12h   | 15h   | 18h   | 24h   | 48h   |
|-----|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 4   | pH | 4     | 3,80  | 3,73  | 3,50  | 3,36  | 3,12  | 2,94  | 2,87  | 2,79  |
|     | Do | 0,063 | 0,106 | 0,2   | 0,34  | 0,427 | 0,619 | 0,824 | 0,995 | 1,066 |
| 4,5 | pH | 4,5   | 4,16  | 4,02  | 3,93  | 3,82  | 3,61  | 3,40  | 3,04  | 3     |
|     | Do | 0,060 | 0,42  | 0,53  | 0,66  | 0,845 | 1,245 | 1,43  | 1,683 | 1,787 |
| 5   | pH | 5     | 4,56  | 4,03  | 3,92  | 3,81  | 3,72  | 3,63  | 3,39  | 3,28  |
|     | Do | 0,062 | 0,45  | 0,885 | 1,182 | 1,5   | 1,721 | 1,9   | 2,007 | 2,017 |
| 5,5 | pH | 5,5   | 5,34  | 4,77  | 4,09  | 3,89  | 3,63  | 3,40  | 3,24  | 3,15  |
|     | Do | 0,068 | 0,668 | 1,2   | 1,648 | 1,946 | 2,079 | 2,182 | 2,265 | 2,3   |
| 6   | pH | 6     | 5,24  | 5,05  | 4,87  | 4,15  | 3,97  | 3,69  | 3,58  | 3,42  |
|     | Do | 0,063 | 0,51  | 0,728 | 1     | 1,35  | 1,709 | 1,987 | 2,182 | 2,243 |
| 6,5 | pH | 6,5   | 6,24  | 6     | 5,78  | 5,49  | 5,14  | 4,98  | 3,85  | 3,78  |
|     | Do | 0,066 | 0,42  | 0,647 | 0,84  | 1,027 | 1,228 | 1,409 | 1,584 | 1,7   |
| 7   | pH | 7     | 6,48  | 6,25  | 5,86  | 5,77  | 5,38  | 4,97  | 4,49  | 4,27  |
|     | Do | 0,068 | 0,254 | 0,442 | 0,707 | 0,937 | 1,354 | 1,563 | 1,684 | 1,68  |
| 7,5 | pH | 7,5   | 7,09  | 6,89  | 6,70  | 6,58  | 6,49  | 6,28  | 6,15  | 6     |
|     | Do | 0,062 | 0,171 | 0,345 | 0,4   | 0,6   | 1     | 1,231 | 1,354 | 1,4   |
| 8   | pH | 8     | 7,85  | 7,36  | 7,42  | 6,95  | 6,78  | 6,60  | 6,41  | 6,25  |
|     | Do | 0,065 | 0,187 | 0,325 | 0,45  | 0,608 | 0,973 | 1,235 | 1,508 | 1,6   |



**Figure 41:** Résultats de la mesure de cinétique de croissance (Do) (A) et l'évolution du pH (B) de *Lb. plantarum* (Lb.58) incubée à 30°C

**Tableau 44:** Les résultats de la mesure de densité optique et pH de *Lb. plantarum* (Lb.58) incubée à 37°C.

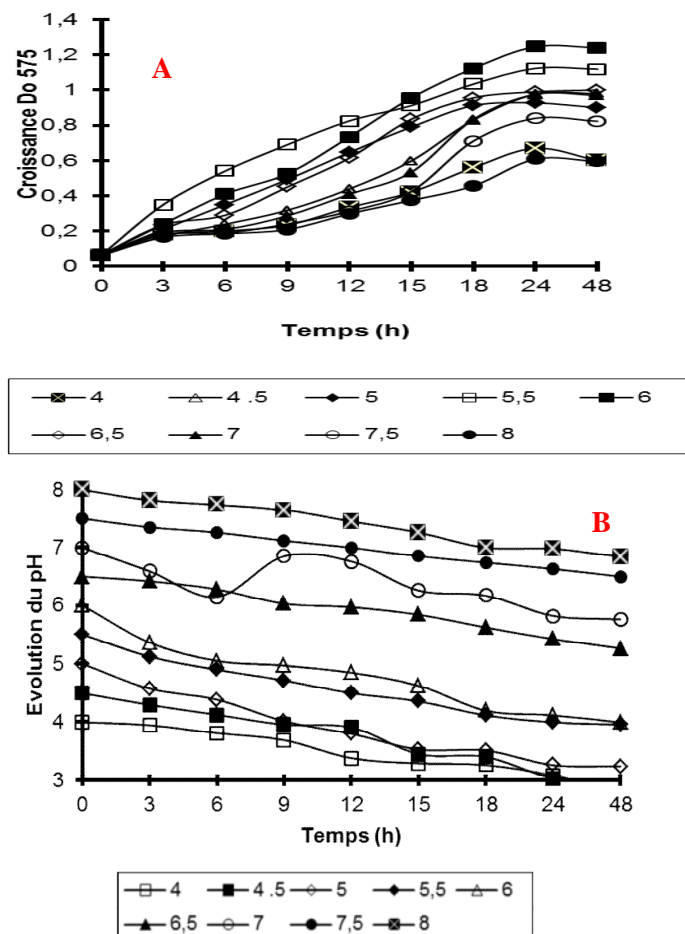
| pH  |    | 0h    | 3h    | 6h    | 9h    | 12h   | 15h   | 18h   | 24h   | 48h   |
|-----|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 4   | pH | 4     | 3,84  | 3,77  | 3,650 | 3,5   | 3,27  | 3,14  | 2,94  | 2,89  |
|     | Do | 0,062 | 0,129 | 0,187 | 0,210 | 0,350 | 0,5   | 0,658 | 0,723 | 0,754 |
| 4,5 | pH | 4,5   | 4,26  | 4,05  | 3,93  | 3,87  | 3,80  | 3,76  | 3,24  | 3,04  |
|     | Do | 0,061 | 0,238 | 0,420 | 0,6   | 0,685 | 0,756 | 0,89  | 0,942 | 0,954 |
| 5   | pH | 5     | 4,69  | 4,32  | 4,05  | 3,98  | 3,91  | 3,85  | 3,79  | 3,62  |
|     | Do | 0,068 | 0,334 | 0,720 | 1     | 1,181 | 1,365 | 1,642 | 1,789 | 1,81  |
| 5,5 | pH | 5,5   | 5,23  | 5,16  | 5     | 4,15  | 3,02  | 3,95  | 3,87  | 3,77  |
|     | Do | 0,064 | 0,350 | 0,850 | 1,242 | 1,468 | 1,694 | 1,912 | 1,965 | 1,957 |
| 6   | pH | 6     | 5,46  | 5,24  | 4,81  | 4,72  | 4,63  | 4,21  | 4,28  | 4,05  |
|     | Do | 0,067 | 0,280 | 0,52  | 0,820 | 1,12  | 1,420 | 1,737 | 1,856 | 1,864 |
| 6,5 | pH | 6,5   | 6,39  | 6,12  | 5,93  | 5,74  | 5,51  | 5,34  | 5,27  | 5,12  |
|     | Do | 0,065 | 0,234 | 0,397 | 0,6   | 0,954 | 1,212 | 1,516 | 1,645 | 1,679 |
| 7   | pH | 7     | 6,85  | 6,82  | 6,39  | 6,27  | 6,21  | 6,12  | 6     | 5,94  |
|     | Do | 0,064 | 0,207 | 0,403 | 0,597 | 0,721 | 0,897 | 0,982 | 1,134 | 1,145 |
| 7,5 | pH | 7,5   | 7,18  | 7,05  | 6,84  | 6,71  | 6,64  | 6,42  | 6,23  | 6,12  |
|     | Do | 0,063 | 0,179 | 0,239 | 0,350 | 0,446 | 0,587 | 0,754 | 0,912 | 0,923 |
| 8   | pH | 8     | 7,74  | 7,68  | 7,5   | 7,42  | 7,3   | 7,14  | 7,05  | 6,95  |
|     | Do | 0,065 | 0,174 | 0,194 | 0,217 | 0,250 | 0,34  | 0,480 | 0,602 | 0,623 |



**Figure 42:** Résultats de la mesure de cinétique de croissance (Do) (A) et l'évolution du pH (B) de *Lb. plantarum* (Lb.58) incubée à 37°C.

**Tableau 45:** Les résultats de la mesure de densité optique et pH de *Lb. plantarum* (Lb.58) incubée à 44°C.

| pH  |    | 0h    | 3h    | 6h    | 9h    | 12h   | 15h   | 18h   | 24h   | 48h   |
|-----|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 4   | pH | 4     | 3,95  | 3,81  | 3,69  | 3,38  | 3,29  | 3,26  | 3,08  | 2,79  |
|     | Do | 0,062 | 0,180 | 0,2   | 0,234 | 0,334 | 0,421 | 0,56  | 0,67  | 0,6   |
| 4,5 | pH | 4,5   | 4,30  | 4,13  | 3,96  | 3,91  | 3,45  | 3,40  | 3,03  | 2,90  |
|     | Do | 0,066 | 0,170 | 0,239 | 0,318 | 0,439 | 0,598 | 0,83  | 0,976 | 0,98  |
| 5   | pH | 5     | 4,58  | 4,39  | 4,02  | 3,80  | 3,53  | 3,51  | 3,26  | 3,24  |
|     | Do | 0,065 | 0,210 | 0,35  | 0,492 | 0,646 | 0,79  | 0,912 | 0,927 | 0,9   |
| 5,5 | pH | 5,5   | 5,12  | 4,9   | 4,72  | 4,5   | 4,36  | 4,12  | 4     | 3,96  |
|     | Do | 0,064 | 0,350 | 0,541 | 0,69  | 0,825 | 0,912 | 1,034 | 1,123 | 1,119 |
| 6   | pH | 6     | 5,36  | 5,05  | 4,97  | 4,85  | 4,63  | 4,20  | 4,12  | 4     |
|     | Do | 0,064 | 0,24  | 0,41  | 0,525 | 0,734 | 0,956 | 1,123 | 1,246 | 1,24  |
| 6,5 | pH | 6,5   | 6,42  | 6,28  | 6,03  | 5,97  | 5,84  | 5,62  | 5,42  | 5,26  |
|     | Do | 0,066 | 0,235 | 0,290 | 0,450 | 0,614 | 0,835 | 0,956 | 0,990 | 1     |
| 7   | pH | 7     | 6,59  | 6,15  | 6,85  | 6,76  | 6,26  | 6,17  | 5,82  | 5,76  |
|     | Do | 0,068 | 0,192 | 0,210 | 0,287 | 0,409 | 0,534 | 0,834 | 0,976 | 0,97  |
| 7,5 | pH | 7,5   | 7,35  | 7,26  | 7,12  | 7     | 6,85  | 6,74  | 6,63  | 6,5   |
|     | Do | 0,064 | 0,180 | 0,190 | 0,240 | 0,312 | 0,425 | 0,711 | 0,840 | 0,823 |
| 8   | pH | 8     | 7,82  | 7,74  | 7,65  | 7,45  | 7,26  | 7     | 6,98  | 6,84  |
|     | Do | 0,062 | 0,165 | 0,185 | 0,209 | 0,298 | 0,374 | 0,456 | 0,608 | 0,595 |



**Figure 43:** Résultats de la mesure de cinétique de croissance (Do) (A) et l'évolution du pH (B) de *Lb. plantarum* (Lb.58) incubée à 44°C.

Les résultats obtenues de la mesure des variations de la Do avec une longueur d'onde égale à 576 nm et le pH des cultures pures de *Lb. plantarum* (Lb.58) aux dépends de différentes températures et pH aux intervalles de 3 heures et à partir des graphes réalisés :

On note que les courbes de la mesure de la Do en fonction du temps généralement représentent trois phases de croissance: la phase de latence étalé sur les trois premières heures (0h-3h) dont les souches ayant développées une adaptation avec le milieu MRS; la phase exponentielle qui se déroule entre 3h et 18h où s'efféctue la multiplication des cellules bactériennes et la production des métabolites parmi l'acide lactique ; finalement la phase stationnaire de 18h à 48h.

Concernant le pH, on constate sa diminution en fonction du temps ce qui est due à la production de l'acide lactique à partir du glucose présent dans le milieu MRS qui modifie le pH de milieu (Heillig *et al.*, 2005).

L'abaissement du pH n'influence pas la croissance et la production d'acide lactique de la souche, elle est capable de croitre dans des pH bas compris entre 2,8 et 3, ce qui ressemble à des études ayant confirmées la présence de *Lb. plantarum* dans le pH 2,5 à 3 (Ahrné S *et al.*, 1998).

Pour notre souche de *Lb. plantarum* (Lb.58) à T=30°C; la cinétique d'acidité était optimale pour les pH 5,5 et 6 par rapport aux autres pH, dont pH 5,5 elle démarre à t = 0 h par Do = 0,068 et pH 5,5; pour atteindre à t = 9h une valeur Do =1,648 et pH = 4,9 mais pour les pH= 4 et 8 la Do était à t = 0 (0,065) et (0,063), à t = 9h la Do égale (0,34) et (0,45) respectivement.

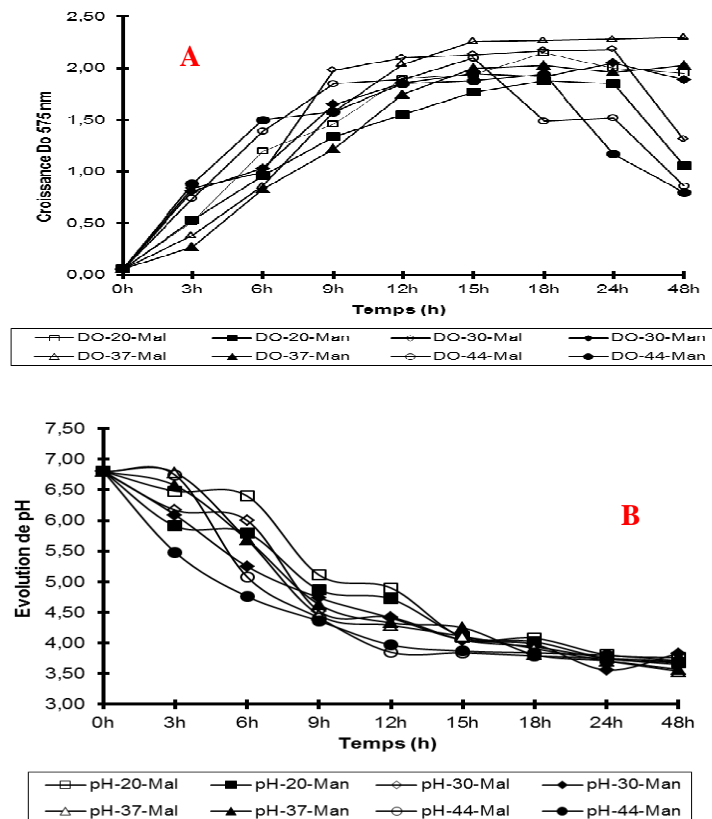
Alors *Lb. plantarum* (Lb.58) a un pH optimal de croissance de 5,5 mais elle peut survivre jusqu'à pH 9,5 (Sownd *et al.*, 2005).

On constate que la cinétique d'acidification varie selon les différentes températures dans un même pH et pendant la même durée d'incubation; à t = 12h et à pH 5,5 les valeurs de la DO et pH pour *Lb. plantarum* (Lb.58) pour les températures 20°C, 30°C, 37°C et 44°C sont (1,076 / 4,23) ;(1,946 / 3,89); (1,468 / 4,15) et (0,825 / 4,5) respectivement.

Alors la température optimale de croissance pour *Lb. plantarum* (Lb.58) est entre 30°C et 37°C (Sownd *et al.*, 2005).

**Tableau 46:** Evolution de la cinétique de croissance et d'acidité de *Lb. plantarum* (Lb.58) dans un milieu MRS modifié, En fonction du temps et des températures.

| température | La souche |    | 0h   | 3h    | 6h   | 9h   | 12h  | 15h  | 18h  | 24h  | 48h  |
|-------------|-----------|----|------|-------|------|------|------|------|------|------|------|
| 20°C        | Maltose   | Do | 0,06 | 0,507 | 1,2  | 1,46 | 1,9  | 1,94 | 2,15 | 2,00 | 1,95 |
|             |           | pH | 6,8  | 6,48  | 6,4  | 5,11 | 4,9  | 4,09 | 4,08 | 3,81 | 3,76 |
|             | Mannose   | Do | 0,06 | 0,53  | 0,96 | 1,34 | 1,55 | 1,77 | 1,88 | 1,85 | 1,06 |
|             |           | pH | 6,8  | 5,91  | 5,8  | 4,87 | 4,72 | 4,11 | 4,02 | 3,75 | 3,68 |
| 30°C        | Maltose   | Do | 0,06 | 0,84  | 0,99 | 1,98 | 2,1  | 2,13 | 2,17 | 2,18 | 1,31 |
|             |           | pH | 6,8  | 6,17  | 6    | 4,52 | 4,42 | 4,05 | 3,94 | 3,75 | 3,65 |
|             | Mannose   | Do | 0,06 | 0,81  | 1,03 | 1,65 | 1,86 | 1,95 | 1,92 | 2,05 | 1,89 |
|             |           | pH | 6,8  | 6,09  | 5,25 | 4,74 | 4,41 | 4,05 | 3,98 | 3,56 | 3,83 |
| 37°C        | Maltose   | Do | 0,06 | 0,38  | 0,86 | 1,58 | 2,04 | 2,26 | 2,27 | 2,28 | 2,3  |
|             |           | pH | 6,8  | 6,78  | 5,69 | 4,46 | 4,29 | 4,11 | 3,91 | 3,71 | 3,54 |
|             | Mannose   | Do | 0,06 | 0,27  | 0,83 | 1,22 | 1,75 | 2    | 2,03 | 1,96 | 2,03 |
|             |           | pH | 6,8  | 6,57  | 5,69 | 4,63 | 4,33 | 4,25 | 3,81 | 3,71 | 3,57 |
| 44°C        | Maltose   | Do | 0,06 | 0,74  | 1,39 | 1,85 | 1,89 | 2,1  | 1,49 | 1,52 | 0,86 |
|             |           | pH | 6,8  | 6,74  | 5,08 | 4,41 | 3,85 | 3,84 | 3,79 | 3,75 | 3,7  |
|             | Mannose   | Do | 0,06 | 0,88  | 1,5  | 1,58 | 1,85 | 1,88 | 1,94 | 1,17 | 0,8  |
|             |           | pH | 6,8  | 5,48  | 4,76 | 4,36 | 3,97 | 3,87 | 3,84 | 3,8  | 3,71 |



**Figure 44:** Evolution de la cinétique de croissance (A) et d'acidité (B) de *Lb. plantarum* (Lb.58) dans un milieu MRS modifié (+ Maltose et mannose), En fonction du temps et des températures.

D'après les courbes, on observe que la vitesse de croissance de *Lb. plantarum* (Lb.58) dans le milieu qui contient le maltose est presque la même pour celui contenant du mannose, et cette vitesse augmente à la température 30°C et 37°C, puisque c'est la température optimale pour la croissance de cette souche.

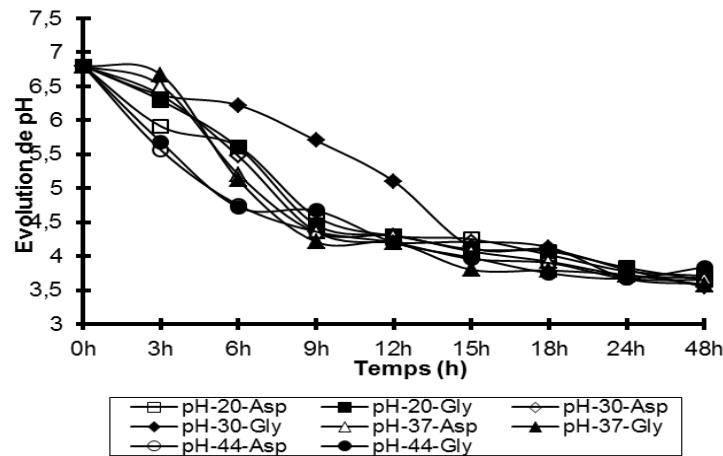
Lorsque on compare ces résultats avec ceux obtenus du milieu MRS non modifié, on trouve que la croissance dans ce milieu est plus importante que le milieu MRS modifiés car le glucose est un substrat facilement métabolisable par les bactéries lactiques notamment les lactobacilles (Thompson et Torchia, 1984; Neves *et al.*, 1999 et Mijakovic *et al.*, 2002).

Concernant l'évolution de pH, plus la croissance est importante plus l'accumulation d'acide lactique augmente, qui se traduit par un abaissement progressif du pH qui atteint 3.57 et 3.54 pour *Lb. plantarum* (Lb.58).

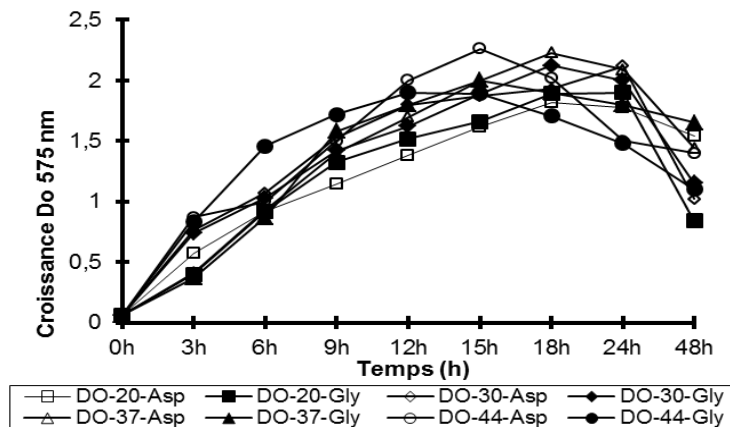
**Tableau 47:** Les variations de la densité optiques et le pH de *Lb. plantarum* (Lb.58) dans un milieu modifié en acides Aminés.

| Température | les souches |    | 0h   | 3h   | 6h   | 9h   | 12h | 15h  | 18h  | 24h  | 48h  |
|-------------|-------------|----|------|------|------|------|-----|------|------|------|------|
| 20°C        | Asparagine  | Do | 0,06 | 0,91 | 0,92 | 1,04 | 1,2 | 1,23 | 1,82 | 1,78 | 1,54 |
|             |             | pH | 6,8  | 5,91 | 5,61 | 4,58 | 4,3 | 4,25 | 4,02 | 3,78 | 3,71 |
|             | Glycine     | Do | 0,06 | 0,4  | 0,92 | 1,45 | 1,5 | 1,66 | 1,89 | 1,9  | 0,84 |
|             |             | pH | 6,8  | 6,29 | 5,6  | 4,46 | 4,3 | 4,1  | 4,07 | 3,83 | 3,65 |
| 30°C        | Asparagine  | Do | 0,06 | 0,76 | 1,07 | 1,53 | 1,8 | 1,87 | 1,93 | 2,12 | 1,02 |
|             |             | pH | 6,8  | 6,37 | 5,47 | 4,36 | 4,2 | 4,21 | 4,13 | 3,67 | 3,59 |
|             | Glycine     | Do | 0,06 | 0,74 | 1,03 | 1,42 | 1,5 | 1,89 | 1,96 | 2    | 1,15 |
|             |             | pH | 6,8  | 6,37 | 6,22 | 5,54 | 5,1 | 4,14 | 4,1  | 3,8  | 3,55 |
| 37°C        | Asparagine  | Do | 0,06 | 0,41 | 0,93 | 1,4  | 1,7 | 2    | 2,23 | 2,09 | 1,44 |
|             |             | pH | 6,8  | 6,51 | 5,2  | 4,35 | 4,3 | 4,07 | 3,92 | 3,72 | 3,68 |
|             | Glycine     | Do | 0,06 | 0,37 | 0,87 | 1,58 | 1,8 | 2    | 1,9  | 1,8  | 1,65 |
|             |             | pH | 6,8  | 6,67 | 5,12 | 4,21 | 4,2 | 3,8  | 3,79 | 3,72 | 3,58 |
| 44°C        | Asparagine  | Do | 0,06 | 0,87 | 1    | 1,5  | 2   | 2,26 | 1,6  | 1,5  | 1,4  |
|             |             | pH | 6,8  | 5,56 | 4,75 | 4,36 | 4,2 | 3,96 | 3,9  | 3,67 | 3,65 |
|             | Glycine     | Do | 0,06 | 0,83 | 1,46 | 1,72 | 1,9 | 1,89 | 1,55 | 1,48 | 1,1  |
|             |             | pH | 6,8  | 5,68 | 4,72 | 4,67 | 4,2 | 3,98 | 3,75 | 3,67 | 3,84 |





**Figure 45:** Evolution du pH du milieu de croissance de *Lactobacillus plantarum* (Lb.58) en présence de la glycine et l'asparagine comme source d'acide aminé dans le milieu MRS, incubé à quatre différentes températures 20°C, 30°C, 37°C et à 44°C.



**Figure 46:** Croissance de *Lactobacillus plantarum* (Lb.58) en présence de la glycine et l'asparagine comme source d'acide aminé dans le milieu MRS, incubé à quatre différentes températures 20°C, 30°C, 37°C et à 44°C.

Par comparaison aux résultats de milieu MRS non modifiés, La vitesse de croissance de *Lb. plantarum* (Lb.58) dans le milieu MRS modifié est faible que ça soit dans le milieu qui contient l'asparagine ou la glycine, ce qui explique que cette souche de *Lb. plantarum* (Lb.58) nécessite plus que ces deux acides aminés pour ça croissance, selon Lenoir et al. (1992) les lactobacilles nécessitent pour leur croissance l'aspartate, histidine, lysine, leucine, méthionine et de valine et ces derniers sont présent dans la composition de l'extrait de levure (Ghaly et al., 2003).

Ces derniers ont un effet significatif sur la production d'acide lactique et ne peuvent donc être que difficilement enlevées de la constitution du milieu de culture (Selmer-Olsen et Sorhaug, 1998 et Aeschlimann et Von Stockar, 1990) en plus c'est une source de vitamine B pour les lactobacilles.



### 13. Résultats de la cinétique de croissance de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) en culture pure et mixte à 37°C :

L'étude de la cinétique de croissance de la souche *Lactobacillus plantarum* (Lb.58) et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 exprimé en ufc/ml seules ou en culture mixte a été réalisée dans le lait écrémé. Le dénombrement s'effectue à un interval de temps régulier. La densité initiale de la souche de *Lb. plantarum* (Lb.58) était de 3.19 log ufc/ml. Ce critère d'inoculum est identique à celui pratiqué par Erdogan *et al.* (2006) qui était de 3.24 log. Après 24 h d'incubation en culture pure, le nombre de bactérie de *Lb. plantarum* (Lb.58) atteint une valeur de 8,19 log ufc/ml et 5,07 log ufc/ml a été enregistré pour *Staphylococcus aureus*. En culture mixte dans le lait, après 24h d'incubation, on aperçoit une diminution de la densité de *Staphylococcus aureus* (1,6 log ufc/ml), cette réduction témoigne de l'effet inhibiteur de la souche *Lb. plantarum* sur la croissance de *Staphylococcus aureus*. Après 72h d'incubation, le nombre de cellules viables de la souche *Lb. plantarum* (Lb.58) atteint 8.05 log ufc/ml. Après 72h d'incubation en Co-culture avec la souche *Lb. plantarum* aucune croissance de *Staphylococcus aureus* n'a pu être détectée.

Dans le cas de culture *Lb. plantarum*, l'analyse de régression donne une vitesse de 0,419 unité de  $\text{Log}_{10}$  ufc/h (soit un taux de croissance de  $1,38 \text{ h}^{-1}$ , ou un temps de génération de 43 min environ). Après 72h, la concentration bactérienne obtenue est de 8.05  $\text{Log}_{10}$  ufc/ml. La vitesse de l'acidification du milieu est estimée par le calcul de la pente de la droite de régression à la courbe de variation du pH, elle est de  $-0,006$  unité de pH par heure, Alors que la production de l'acide lactique, est de 59 °D (65,5 mM).

En culture pure de *S. aureus* ATCC 25923, l'analyse de régression fournit une valeur de 0,041 unité de  $\text{Log}_{10}$  ufc/h (soit un taux de croissance de  $1,93 \text{ h}^{-1}$ , ou un temps de génération de 31 min environ). Après 72h, la concentration bactérienne est estimée de 3.11  $\text{Log}_{10}$  ufc/ml. La vitesse de l'acidification du milieu est estimée par le calcul de la pente de la droite de régression à la courbe de variation du pH, elle est de  $-0,007$  unité de pH/h, alors que la production de l'acide lactique, est estimée à 41.8°D (46,44 mM).

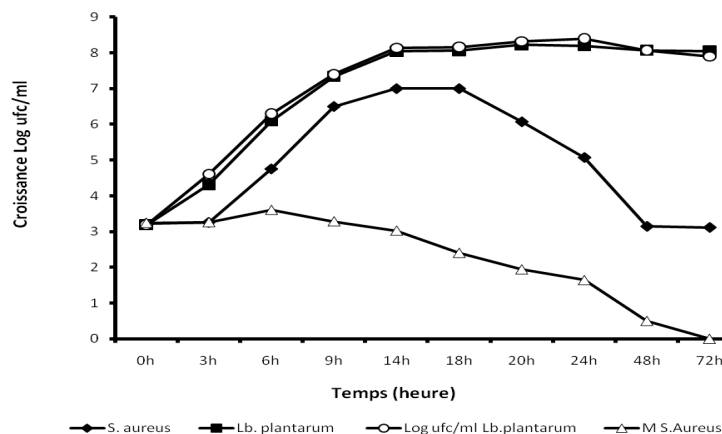
En culture mixte, *Lb. plantarum* croit avec une valeur de 0,236 unité de  $\text{Log}_{10}$  ufc/h (soit un taux de croissance de  $1.45 \text{ h}^{-1}$  et un temps de génération de 41 min environ). Après 72h, la concentration bactérienne est estimée de 7.90  $\text{Log}_{10}$  ufc/ml. Pour *S. aureus* ATCC 25923, l'analyse de régression donne 0,133 unité de  $\text{Log}_{10}$  ufc/h (soit un taux de croissance de 0,37/h, et un temps de génération de 162 min environ). Après 72h, aucune croissance n'a été observée. La vitesse de l'acidification du milieu est estimée de  $-0,005$  unité de pH par heure, alors que l'acidité dornic atteint 71°D (78,8 mM).

À partir de ces résultats on peut dire, que la souche *Lb. plantarum* (Lb.58) a inhibé totalement la souche *S. aureus* ATCC 25923 après 72h d'incubation.

En Azerbaïdjan, Gulahmadov *et al.* (2006) ont étudié, l'effet inhibiteur des espèces de lactobacilles isolées à partir d'un fromage traditionnel et du lait cru sur la croissance de certaines bactéries pathogènes parmi les quelles *Staphylococcus*. D'autres travaux conduits par Rodrigues *et al.* (2005) sur l'inhibition de *Staphylococcus aureus* en fromagerie, ils ont constaté que le nombre de *Staphylococcus aureus* a été de 0.40 log ufc/ml après 24h comparé au témoin qui été de 5,16 log ufc/ml. La souche de *Lactobacillus plantarum* (Lb.58) a montré un potentiel conséquent dans l'inhibition de *Staphylococcus aureus*; cette inhibition est due à la production de multiple substances anti-bacteriennes appartenent probablement à des bactériocines (Hernandez *et al.*, 2005). Après 72h d'incubation, Arqués *et al.* (2005) ont remarqué la diminution du nombre de *Staphylococcus aureus* (0,46 log ufc/ml) comparé au témoin (6.46 log ufc/ml).

**Tableau 48:** Cinétique de croissance, d'acidification et de production d'acide lactique dans le lait écrémé à 37°C, en culture seule et en culture mixte des souches *Lactobacillus plantarum* et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

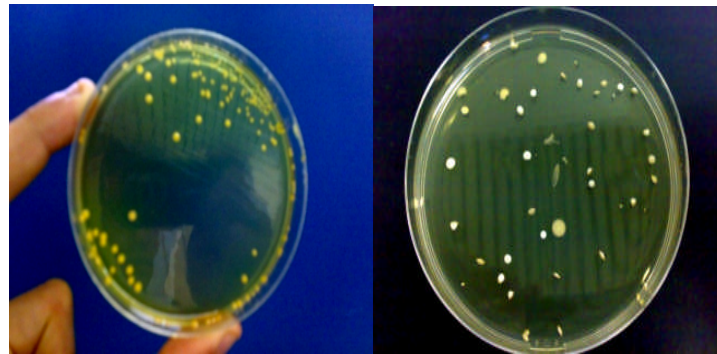
| Souches              |                                | 0h   | 3h   | 6h   | 9h   | 14h  | 18h  | 20h  | 24h  | 48h  | 72h  |
|----------------------|--------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| <i>S. aureus</i>     | Log ufc/ml                     | 3,22 | 3,25 | 4,75 | 6,5  | 7    | 7    | 6,07 | 5,07 | 3,14 | 3,11 |
|                      | pH                             | 6,45 | 6,42 | 6,3  | 6,13 | 5,82 | 5,5  | 4,64 | 5,13 | 4,9  | 4,72 |
|                      | °D                             | 0    | 2,7  | 6,30 | 8,5  | 16,4 | 23,4 | 4,64 | 36,3 | 41   | 41,8 |
| <i>Lb. plantarum</i> | Log ufc/ml                     | 3,19 | 4,31 | 6,09 | 7,34 | 8,04 | 8,06 | 8,22 | 8,19 | 8,07 | 8,05 |
|                      | pH                             | 6,44 | 6,35 | 6,08 | 5,56 | 5,01 | 4,53 | 4,4  | 4,32 | 4,24 | 4,09 |
|                      | °D                             | 0    | 2    | 6,5  | 16,1 | 28,5 | 43,7 | 48,5 | 50   | 55   | 59   |
| M 58                 | Log ufc/ml <i>Lb.plantarum</i> | 3,19 | 4,61 | 6,30 | 7,40 | 8,14 | 8,16 | 8,32 | 8,40 | 8,07 | 7,90 |
|                      | Log ufc/ml <i>S. aureus</i>    | 3,24 | 3,26 | 3,6  | 3,28 | 3,02 | 2,4  | 1,94 | 1,64 | 0,5  | 0    |
|                      | pH                             | 6,42 | 6,3  | 6,02 | 5,7  | 5,21 | 4,8  | 4,64 | 4,6  | 4,47 | 4,35 |
|                      | °D                             | 0    | 3    | 12,9 | 25,8 | 42,3 | 58,2 | 4,64 | 67,4 | 69,7 | 71   |



**Figure 47:** Evolution du dénombrement en fonction du temps pour culture pure et mixte de la souche inhibitrice *Lb. plantarum* (Lb.58) et *Staphylococcus aureus*.

**Tableau 49:** Révèle le ( $\mu$ ) et le temps de génération (**G**) pour les souches en culture pure et en culture mixtes avec la souche de *Staphylococcus aureus*

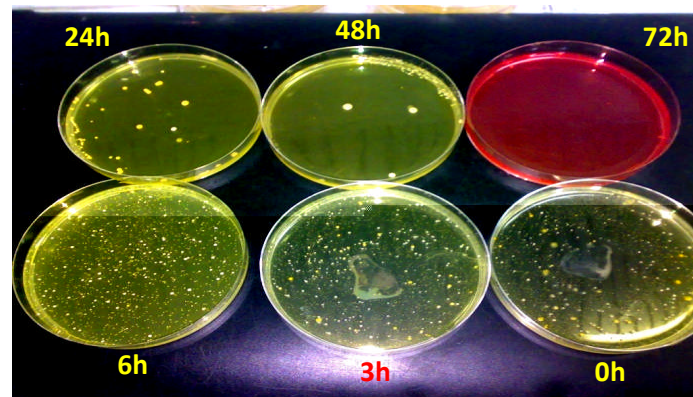
| souche                       | $\mu$ | G (temps de génération) |
|------------------------------|-------|-------------------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 1.93  | 31 min                  |
| <i>Lb. plantarum</i> 58      | 1.38  | 43 min                  |
| M ( <i>Lb. plantarum</i> )   | 1.45  | 41 min                  |
| M ( <i>S.aureus</i> )        | 0.37  | 162 min                 |



*Staphylococcus aureus*

*Lb. plantarum* Lb.58

**Figure 48:** Evolution du *Staphylococcus aureus* (souche test) et *Lb. plantarum* (Lb.58) (souches inhibitrices) en culture pure

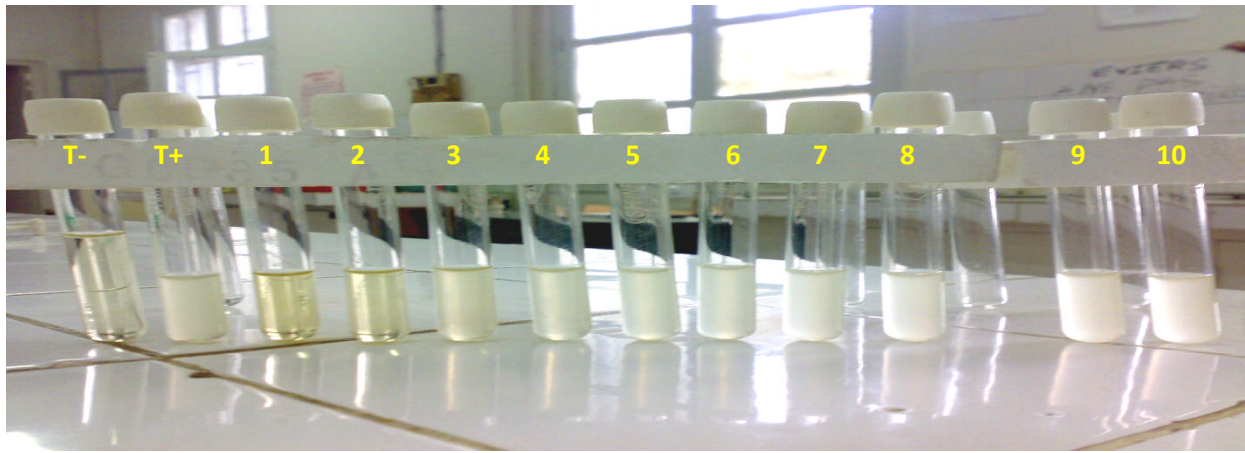


**Figure 49:** Evolution du *Staphylococcus aureus* (souche test) avec *Lb. plantarum* (Lb.58) (souches inhibitrices) en culture mixte.

#### 14. Effet de l'extrait brut de *Lactobacillus plantarum* sur la croissance de *Staphylococcus aureus* :

Les résultats du test de l'effet des dilutions de la substance de *Lb. plantarum* (Lb.58) sur la croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ont montré que les dilutions  $\frac{1}{2}$  et  $\frac{1}{4}$  produisent un effet inhibiteur permanent sur la croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

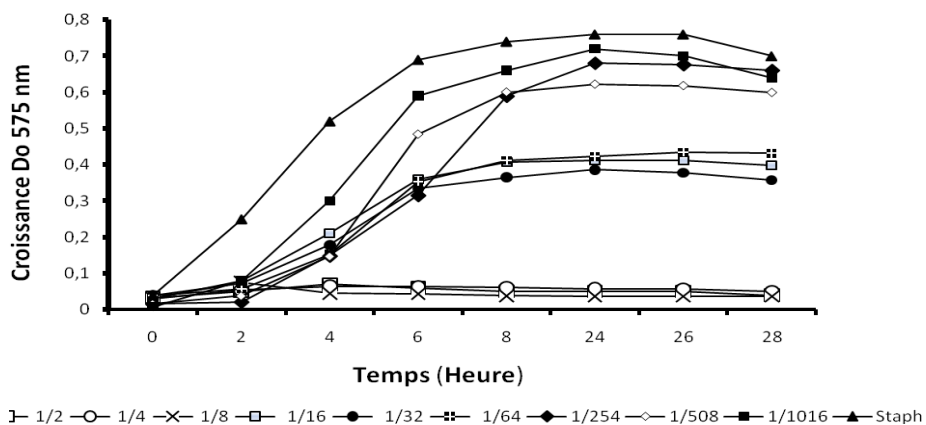
En revanche les dilutions plus forte, de la substance ralentissent la croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.



**Figure 50:** Effet de l'extrait brut de *Lb. plantarum* (Lb.58) chauffé à 100°C pendant 10 min sur la croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a différentes dilutions.

**Tableau 50:** Effet de l'extrait brut de *Lb. plantarum* (Lb.58) sur la croissance de *Staphylococcus aureus*.

|           | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10     | T+    |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|
| Temps (h) | 1/2   | 1/4   | 1/8   | 1/16  | 1/32  | 1/64  | 1/128 | 1/254 | 1/508 | 1/1016 | Staph |
| 0         | 0,033 | 0,030 | 0,032 | 0,031 | 0,040 | 0,039 | 0,050 | 0,016 | 0,016 | 0,008  | 0,044 |
| 2         | 0,050 | 0,054 | 0,076 | 0,150 | 0,073 | 0,057 | 0,063 | 0,022 | 0,038 | 0,080  | 0,362 |
| 4         | 0,070 | 0,065 | 0,045 | 0,211 | 0,178 | 0,153 | 0,184 | 0,149 | 0,147 | 0,212  | 0,655 |
| 6         | 0,061 | 0,064 | 0,044 | 0,405 | 0,334 | 0,354 | 0,477 | 0,316 | 0,484 | 0,591  | 0,698 |
| 8         | 0,050 | 0,062 | 0,038 | 0,566 | 0,440 | 0,647 | 0,692 | 0,590 | 0,634 | 0,666  | 0,740 |
| 24        | 0,050 | 0,058 | 0,037 | 0,412 | 0,386 | 0,475 | 0,636 | 0,681 | 0,622 | 0,723  | 0,760 |
| 26        | 0,050 | 0,057 | 0,037 | 0,412 | 0,378 | 0,435 | 0,600 | 0,677 | 0,618 | 0,702  | 0,760 |
| 28        | 0,040 | 0,050 | 0,037 | 0,399 | 0,358 | 0,431 | 0,630 | 0,661 | 0,599 | 0,643  | 0,700 |



**Figure 51:** Effet de l'extrait brut de *Lb. plantarum* (Lb.58) sur la croissance de *Staphylococcus aureus* a différentes dilutions

**Tableau 51:** le taux de mortalité en pourcentage de *Staphylococcus aureus* traité avec l'extrait brut de la souche *Lb. plantarum* (Lb.58).

| Temps (h) | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7     | 8     | 9     | 10     | T+    |
|-----------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|--------|-------|
|           | 1/2  | 1/4  | 1/8  | 1/16 | 1/32 | 1/64 | 1/128 | 1/254 | 1/508 | 1/1016 | staph |
| 0         | 25   | 37.8 | 27.9 | 29.5 | 9.1  | 11.4 | 13.2  | 63.6  | 63.6  | 81.8   | 100%  |
| 2         | 86.2 | 85.1 | 79   | 58.6 | 79.8 | 84.3 | 82.6  | 93.9  | 89.5  | 77.9   | 100%  |
| 4         | 89.3 | 90.1 | 93.1 | 67.8 | 72.8 | 76.6 | 71.9  | 77.3  | 77.6  | 67.6   | 100%  |
| 6         | 91.3 | 90.8 | 93.7 | 42   | 52.1 | 49.3 | 31.7  | 54.7  | 30.7  | 15.3   | 100%  |
| 8         | 93.2 | 91.6 | 94.9 | 23.5 | 40.5 | 12.6 | 6.5   | 20.3  | 14.3  | 10     | 100%  |
| 24        | 93.4 | 92.4 | 95.1 | 47.8 | 49.2 | 37.5 | 16.6  | 10.4  | 18.2  | 4.9    | 100%  |
| 26        | 93.4 | 92.5 | 95.1 | 45.8 | 50.3 | 42.8 | 21.1  | 10.9  | 18.7  | 7.6    | 100%  |
| 28        | 94.3 | 92.9 | 94.7 | 43   | 48.9 | 38.4 | 10    | 5.6   | 14.4  | 8.1    | 100%  |

Les résultats obtenus montrent que les dilutions 1/2 et 1/4 et 1/8 ont montré une activité inhibitrice. Aucune évolution de la densité optique n'a été observée. Ces résultats révèlent l'efficacité de l'extrait chauffé sur l'inhibition de *Staphylococcus aureus*. A partir de la dilution 1/16 on remarque que le taux de survie et de croissance de *Staphylococcus aureus* dépasse largement les 50 %.

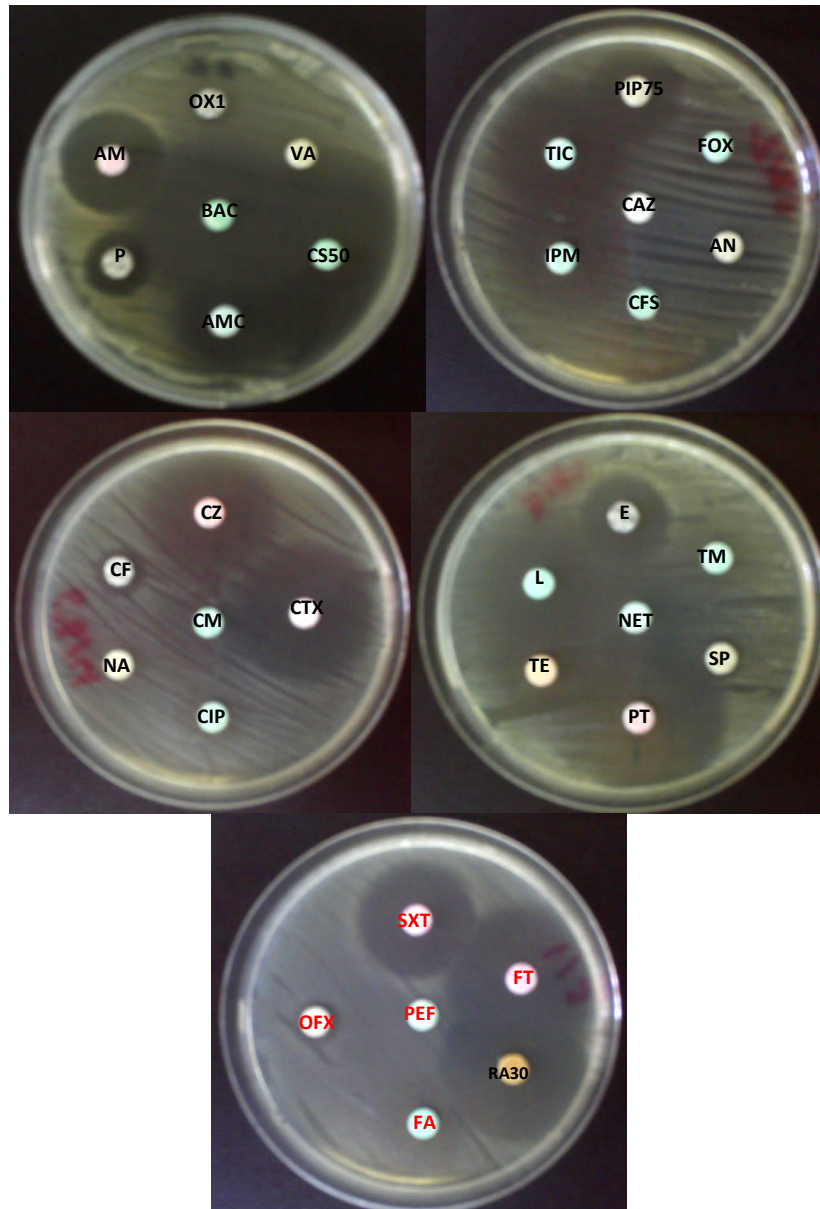
Cette activité inhibitrice de *Staphylococcus aureus* par *Lactobacillus plantarum* (Lb.58) observée en milieu synthétique riche doit être exploitée pour servir comme moyen de biopréservation des aliments pour lutter contre les intoxications alimentaires observées dans les saisons estivales.

### 15. Détermination des profils de sensibilité aux antibiotiques des lactobacilles étudiés :

Les résultats de ce test sont présentés dans la figure 52 et les tableaux 52. Le tableau (52) montre les diamètres obtenus avec chaque antibiotique et chaque souche. Après l'application des recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (2007), ce dernier donne la signification de chaque résultat, à savoir : R, bactérie résistante, S, bactérie sensible et I, intermédiaire. D'après les résultats du test, les souches lactiques étudiées étaient sensibles aux antibiotiques suivants : ampicilline, lincomycine (sauf LbG 22 et Lb.58), ticarcilline, imipenème, érythromycine, pristinamycine, rifampine, nitrofurantoïne, triméthoprime-sulfaméthoxazole (sauf LbC A2), Clindamycine (sauf LbG 22 et Lb.58). Par contre elles étaient résistantes aux : oxacilline, cefoxitine, ceftazidime, cefsulodine, amikacine, tobramycine, spiramycine, vancomycine, bacitracine, colistine, acide nalidixique, ciprofloxacine, ofloxacine, pefloxacine, acide fusidique.

Pour les autres antibiotiques les résultats étaient variables entre les souches. Cependant on peut remarquer la présence de trois groupes selon les résultats de ce test : (LbG 22, Lb.58), (Lb.68, LbC 5 et LbC 6) et (LbC A2).





**Figure 52:** Quelques résultats du test de l'étude de la sensibilité des souches *Lactobacillus* aux antibiotiques.

**Tableau 52:** Détermination des profils de sensibilité aux antibiotiques des lactobacilles étudiés.

| Antibiotiques                     | Charge du Disque   | Symbole | Souches testées |       |       |       |                    |
|-----------------------------------|--------------------|---------|-----------------|-------|-------|-------|--------------------|
|                                   |                    |         | LbG 22          | Lb.58 | Lb.68 | LbC 5 | LbC A <sub>2</sub> |
| <b>PENICILLINES</b>               |                    |         |                 |       |       |       |                    |
| Penicilline                       | 6 µg / 10 IU       | P       | I               | I     | I     | I     | S                  |
| Oxacilline                        | 1 µg               | OX1     | R               | R     | R     | R     | R                  |
| Ampicilline                       | 10 µg              | AM      | S               | S     | S     | S     | S                  |
| Amoxicilline + Acide Clavulanique | 20 µg + 10 µg      | AMC     | I               | I     | I     | I     | I                  |
| Piperacilline                     | 75 µg              | PIP 75  | S               | S     | S     | S     | S                  |
| Ticarcilline                      | 75 µg              | TIC     | S               | S     | S     | S     | S                  |
| <b>CARBAPENEMES</b>               |                    |         |                 |       |       |       |                    |
| Imipeneme                         | 10 µg              | IPM     | S               | S     | S     | S     | S                  |
| <b>CEPHALOSPORINES</b>            |                    |         |                 |       |       |       |                    |
| Cephalothine                      | 30 µg              | CF      | I               | I     | R     | R     | S                  |
| Cefazoline                        | 30 µg              | CZ      | S               | S     | I     | I     | I                  |
| Cefoxitine                        | 30 µg              | FOX     | R               | R     | I     | R     | R                  |
| Cefotaxime                        | 30 µg              | CTX     | I               | S     | I     | R     | S                  |
| Ceftazidime                       | 30 µg              | CAZ     | R               | R     | R     | R     | R                  |
| Cefsulodine                       | 30 µg              | CFS     | R               | R     | R     | R     | R                  |
| <b>AMINOSIDES</b>                 |                    |         |                 |       |       |       |                    |
| Amikacine                         | 30 µg              | AN      | R               | R     | R     | R     | R                  |
| Netilmicine                       | 30 µg              | NET     | R               | I     | R     | I     | S                  |
| Tobramycine                       | 10 µg              | TM      | R               | R     | R     | R     | R                  |
| <b>TETRACYCLINES</b>              |                    |         |                 |       |       |       |                    |
| Tetracycline                      | 30 µg              | TE      | R               | I     | S     | S     | I                  |
| <b>MACROLIDES</b>                 |                    |         |                 |       |       |       |                    |
| Erythromycine                     | 15 µg              | E       | S               | S     | S     | S     | S                  |
| Spiramycine                       | 100 µg             | SP      | R               | R     | R     | R     | R                  |
| <b>LINCOSAMIDES</b>               |                    |         |                 |       |       |       |                    |
| Lincomycine                       | 15 µg              | L       | R               | R     | S     | S     | S                  |
| Clindamycine                      | 2 µg               | CM      | R               | R     | S     | S     | S                  |
| <b>STREPTOGRAMINES</b>            |                    |         |                 |       |       |       |                    |
| Pristinamycine                    | 15 µg              | PT      | S               | S     | S     | S     | S                  |
| <b>GLYCOPEPTIDES</b>              |                    |         |                 |       |       |       |                    |
| Vancomycine                       | 30 µg              | VA      | R               | R     | R     | R     | R                  |
| <b>POLYPEPTIDES</b>               |                    |         |                 |       |       |       |                    |
| Bacitracine                       | 0,02 à 0,04 UI     | BAC     | R               | R     | R     | R     | R                  |
| Colistine                         | 50 µg              | CS 50   | R               | R     | R     | R     | R                  |
| <b>SULFAMIDES-TRIMETHOPRIME</b>   |                    |         |                 |       |       |       |                    |
| Trimethoprim-Sulfamethoxazole     | 1.25 µg + 23.75 µg | SXT     | S               | S     | S     | S     | R                  |
| <b>NITROFURANES</b>               |                    |         |                 |       |       |       |                    |
| Nitrofurantoïne                   | 300µg              | FT      | S               | S     | S     | S     | S                  |
| <b>QUINOLONES</b>                 |                    |         |                 |       |       |       |                    |
| Acide Nalidixique                 | 30 µg              | NA      | R               | R     | R     | R     | R                  |
| <b>FLUOROQUINOLONES</b>           |                    |         |                 |       |       |       |                    |
| Ciprofloxacine                    | 5 µg               | CIP     | R               | R     | R     | R     | R                  |
| Ofloxacine                        | 5 µg               | OFX     | R               | R     | R     | R     | R                  |
| Pefloxacine                       | 5 µg               | PEF     | R               | R     | R     | R     | R                  |
| <b>DIVERS</b>                     |                    |         |                 |       |       |       |                    |
| Acide Fusidique                   | 10 µg              | FA      | R               | R     | R     | R     | I                  |
| Rifampine                         | 30 µg              | RA 30   | S               | S     | S     | S     | S                  |

## DISCUSSION GÉNÉRALE

L'identification microbiologique et la caractérisation technologique de la microflore lactique du lait cru de chèvre ont été abordées.

Les résultats des tests microbiologiques classiques ont permis une pré-identification de plusieurs espèces du genre *Lactobacillus* dont: 08 souches réparties essentiellement sur (*Lb. plantarum* (Lb.58), *Lb. plantarum* (Lb.68), *Lb. casei* (Lb.13), *Lb. rhamnosus* (Lb.54 et Lb.52), *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* (Lb.55), *Lb. sakei* subsp. *sakei* (Lb.21) et *Lb. plantarum* (Lb.22)). Les souches Lb.22, Lb.58, Lb.68 sont hétérofermentaires facultatives par l'utilisation de l'acid glutamique, elles appartiennent au groupe II des *Lactobacillus*.

L'identification des souches a été réalisée en suivant les recommandations de Carr *et al.*, (2002); Axelsson (2004) et Hammes et Hertel (2006).

Les espèces de *Lactobacillus* dominants *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*, *Lb. sakei* subsp. *sakei*, ont été déjà signalé dans le lait de chèvre d'Algérie par les travaux suivants (Saidi *et al.*, 2002; Badis *et al.*, 2004a, Badis *et al.*, 2004 b et Badis *et al.*, 2005).

Le profil de fermentation des hydrates de carbone sur galerie API 50 CHL, confirme l'appartenance des souches (Lb.22, Lb.58 et Lb.68) à l'espèce *Lb. plantarum*. Cette identification est comparée à la souche *Lb. plantarum* ATCC 14917 et le pourcentage de similitude était de 100% avec les souches Lb.22 et Lb.58, de 97,95% pour Lb.68. Le calcul du coefficient de simple appariement ( $S_{SM}$ ) a permis de distinguer trois groupes: le groupe 1 (Lb.22 et Lb.58), le groupe 2 (Lb.68) et le groupe 3 (LbC 5). L'espèce *Lb. plantarum* est très diversifier phénotypiquement (Axelsson, 2004). Nos souches de *Lb. plantarum* Lb.58 et Lb.68 poussent à 45°C. Les anciennes études indiquent que l'espèce *Lb. plantarum* ne pousse pas à 45°C (Axelsson, 2004 et Hammes et Hertel, 2006). Mais Carr *et al.* (2002) ne considère pas cette caractéristique comme clé d'identification dans son diagramme dichotomique, il exige seulement: la croissance à 15°C, ADH (-), Ribose (+), Raffinose (+) et mannitol (+). En 2004, An et collaborateurs ont étudié les bactéries lactiques isolées du chigee et du lait de jument collectés de la Mongolie interne, dans le chigee, ils ont identifié 5 souches qui poussent à 45°C (An *et al.*, 2004). L'identification par le profile fermentaire des hydrates de carbone, montrent que les cinq souches appartiennent à l'espèce *Lb. plantarum*, l'identification moléculaire par le séquençage de l'ADNr 16S, montre que trois de ces cinq souches, sont réellement des *Lb. plantarum*. Donc, il existe réellement des souches de *Lb. plantarum* qui se développent à 45°C. *Lactobacillus plantarum* sont très diversifiés, possèdent un grand génome par rapport aux autres espèces de



*Lactobacillus* et par conséquent elles sont stables (Axelsson, 2004 et An *et al.*, 2004). Souvent la comparaison des données microbiologiques traditionnelles (phénotypiques) et les génotypiques (moléculaire) révèlent une grande similitude dans la caractérisation des espèces de *Lb. plantarum*.

L'isolation de souches appartenant à l'espèce *Lactobacillus plantarum* à partir du lait cru de chèvre et de chamelle d'Algérie a été déjà décrite dans plusieurs études (Guessas et Kihal., 2004; Badis *et al.*, 2004; Badis *et al.*, 2005; Laouabdia Sellami *et al.*, 2007; Mami *et al.*, 2008 et Bendimerad *et al.*, 2012). Drici *et al.* (2009) ont isolé à partir du lait de chamelle d'Algérie une souche de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* atypique par rapport à la croissance à une température de 50°C. Les analyses du génome de cette espèce par des méthodes récentes ont confirmés l'authenticité de cette espèce (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*) pouvant li se caractère à une adaptation spécifique aux conditions des régions arides Algériennes. La souche *Lactobacillus plantarum* (Lb.58) possède un caractère antibactérien capable d'inhiber à la fois les bactéries Gram<sup>+</sup> et les Gram<sup>-</sup>. Cette activité a été détecté in vitro ont milieu solide sur lequel l'effet de l'acide lactique a été neutralisé par le tampon phosphate ce qui a facilité la révélation de l'effet d'un autre composé possédant cette activité. Le milieu de culture a aussi révélé l'effet synergique entre l'acide lactique produit par Lb.58 et la substance inhibitrice, car l'élimination de l'effet de l'acidité réduit la zone d'inhibition. L'absence la zone d'inhibition dans le milieu tamponné lorsque l'inhibition est d'origine lactique cas de la souche Lb.52.

Les deux souches choisies Lb.58 et Lb.68 ont été confronté à 10 espèces bactériennes pathogènes et d'altération. La mesure des diamètres d'inhibitions pour déterminé le spectre d'activité des deux souches de lactobacilles dévoile un effet inhibiteur très élevé sur milieu non tamponnée. En revanche sur milieu tamponnée cette zone d'inhibitions diminue fortement dans le cas des bactéries pathogènes Gram négatives.

La cinétique de croissance de la souche Lb.58 a été réalisée sur milieu naturelle lait à 30°C, elle pousse fortement à pH=5,5 et a une température de 30°C et 37°C dans des conditions d'anaérobiose. Ces facteurs ont permis d'établir les conditions de croissance optimales, qui ont permis de suivre la croissance de *Lactobacillus plantarum* dans le lait.

Pour notre souche de *Lb. plantarum* à T=30°C; la cinétique d'acidité était optimale pour les pH 5,5 et 6 par rapport aux autres pH, dont pH 5,5 elle démarre à t = 0 h par Do = 0,068 et pH 5,5; pour atteindre à t = 9h une valeur Do =1,648 et pH = 4,9 mais pour les pH= 4 et 8 la Do était à t = 0 (0,065) et (0,063), à t = 9h la Do égale (0,34) et (0,45) respectivement. Alors *Lb. plantarum* a un pH optimal de croissance de 5,5 mais elle peut survivre jusqu'à pH 9,5 (Sownd *et al.*, 2005).

On constate que la cinétique d'acidification varie selon les différentes températures dans un même pH et pendant la même durée d'incubation ; à  $t = 12\text{h}$  et à pH 5,5 les valeurs de la Do et pH pour *Lb. plantarum* (Lb.58) pour les températures 20°C, 30°C, 37°C et 44°C sont (1,076 / 4,23); (1,946 / 3,89); (1,468 / 4,15) et (0,825 / 4,5) respectivement.

L'acidité qui est relié étroitement à la croissance bactérienne, plus le taux de croissance est élevé plus le taux d'acidité est plus important, plus le pH diminue (livre des bactéries lactiques), Ce qui explique l'augmentation de l'acidité qui atteint 130°D pour *Lb. plantarum* (Lb.58) à une température de 30°C. Par conséquent une diminution de pH qui atteint 4,92 avec une vitesse d'acidification de  $-0,011$  unité de pH /h.

Les résultats de calculs de  $\mu$  et G nous conduit à une température optimale de croissance chez *Lb. plantarum* (Lb.58) de 30°C (Corry *et al.*, 2003), le temps de dédoublement des cellules pour *Lb. plantarum* (Lb.58) à cette température est de 140 min et la vitesse de croissance est plus importante (0.3 UFC/h). Alors la température optimale de croissance pour *Lb. plantarum* est entre 30°C et 37°C (Sownd *et al.*, 2005).

D'après les résultats, la souche de *Lb. plantarum* a une cinétique de croissance et d'acidification, dans le milieu MRS et dans le lait écrémé à 30°C, presque identique. La meilleure température de croissance pour la souche *Lb. plantarum* (Lb.58) était à 37°C, malgré que certains auteurs recommandent généralement l'incubation à 30°C, pour la culture des souches lactiques issues du lait et des produits laitiers.

Cependant, les souches d'origines intestinales et du yaourt, poussent mieux à 37°C. Ce qui suggère que la souche *Lb. plantarum* (Lb.58) peut être d'origine intestinale (Corry *et al.*, 2003).

L'évolution de la cinétique de croissance et d'acidité de *Lb. plantarum* (Lb.58) dans un milieu MRS modifié, En fonction du temps et des températures a été effectuée.

D'après les courbes, on observe que la vitesse de croissance de *Lb. plantarum* (Lb.58) dans le milieu qui contient le maltose est presque la même pour celui contenant du mannose ou bien celui qui contient l'asparagine ou la glycine, et cette vitesse augmente dans la température 30°C et 37°C, puisque c'est la température optimale pour la croissance de cette souche.

Lorsque on compare ces résultats avec les résultats de milieu MRS non modifié, on trouve que la croissance dans ce milieu est plus important que le milieu MRS modifiés car le glucose est un substrat facilement métabolisable par les bactéries lactiques notamment les lactobacilles (Thompson et Torchia, 1984; Neves *et al.*, 1999 et Mijakovic *et al.*, 2002), et les souches de *Lb. plantarum* nécessite plus que ces deux acides aminés pour ça croissance, selon

Lenoir *et al.*, 1992.

Les lactobacilles nécessitent pour leur croissance l'aspartate, histidine, lysine, leucine, méthionine et de valine et ces derniers sont présent dans la composition de l'extrait de levure (Ghaly *et al.*, 2003).

Concernant l'évolution de pH, plus la croissance est importante plus l'accumulation d'acide lactique augmente, qui se traduit par un abaissement progressif du pH qui atteint 3.57 et 3.54 pour *Lb. plantarum* (Lb.58). Ce dernier a un effet significatif sur la production d'acide lactique et ne peuvent donc être que difficilement enlevées de la constitution du milieu de culture (Selmer-Olsen et Sorhaug, 1998 et Aeschlimann et Von Stockar, 1990) en plus c'est une source de vitamine B pour les lactobacilles.

L'interaction des souches *Lactobacillus plantarum* (Lb.58 et Lb.68) avec dix souches pathogènes et avec les autres souches de *Lactobacillus* a été effectuée.

Les infections à *S. aureus* sont très fréquentes et apparaissent sous des aspects cliniques très variés. Parmi ces infections on a les toxi-infections alimentaires, qui sont dues à l'ingestion d'entérotoxines (A et E), préformées dans l'aliment, résistant aux sucs digestifs et pour certaines à la chaleur, entraînant des troubles d'apparition précoce (moins de 3 heures) avec vomissements, diarrhée, déshydratation et absence de fièvre. L'évolution est bénigne, sauf en cas de pertes hydro-électrolytiques importantes (sujets âgés, nourrissons). *S. aureus* peut aussi causée des entérocrites aiguës, qui surviennent au décours d'une antibiothérapie et sont dues à la prolifération de *S. aureus* antibiorésistant et producteur d'entérotoxines (Avril *et al.*, 1992).

Dans ce travail, on a étudié la capacité de la souche *Lb. plantarum* (Lb.58) à inhiber trois souches de référence de *S. aureus* (ATCC 25923, ATCC 29213, ATCC 43300). Sur milieu MRS normale (pH 6,2) et sur milieu tamponné (pH 7), les staphylocoques ont été inhibés par la souche *Lactobacillus* (Lb.58) étudiée.

La souche *Lb. plantarum* (Lb. 58), possède la plus grande activité d'inhibition contre les staphylocoques. L'inhibition des souches *S. aureus* par des souches *Lb. plantarum* a été déjà décrite. Par exemple, Mami *et al.*, (2008), ont mentionné que des souches *Lb. plantarum* isolées du lait cru de chèvre inhibent des souches de *S. aureus* (ATCC 25923).

*Listeria monocytogenes* et *Listeria ivanovii* sont naturellement (*L. ivanovii* pour les animaux) et expérimentalement pathogènes. *L. ivanovii* est hémolytique et pathogène chez l'animal (ovins) et a été rarement rencontrée chez l'homme (Avril *et al.*, 1992). Dans ce travail, on a étudié la capacité de *Lb. plantarum* (Lb.58) à inhibé *Listeria ivanovii* ATCC 19119. Sur milieu MRS normale (pH 6,2) et sur milieu tamponné, *L. ivanovii* a été inhibée par la souche *Lactobacillus* étudiées. L'inhibition des souches du genre *Listeria*, par certaines souches de *Lb.*

*plantarum* a été déjà décrite (Ouwehand et Vesterlund, 2004).

*Escherichia coli* est connu depuis longtemps comme une bactérie commensale du tube digestif et pathogène pour l'appareil urinaire. Au cours des dernières décennies, le rôle de certaines catégories d'*E. coli* dans les syndromes diarrhéiques a été précisé et les mécanismes de ce pouvoir pathogène ont été analysés. L'existence de diarrhées à *E. coli* est connue depuis 1940. Ces diarrhées sont dues à des souches de sérotypes particuliers qui provoquent soit des cas sporadiques, soit des petites épidémies. Ce sont les souches entérohémorragiques (EHEC) et entéro-invasifs (EOEC) qui causent les intoxications alimentaires (Avril *et al.*, 1992). Dans ce travail, on a étudié la capacité de *Lb. plantarum* (Lb.58) à inhiber *E. coli* ATCC 25922. Sur milieu MRS normale (pH 6,2) et sur milieu tamponné, *E. coli* a été inhibée par *Lb. plantarum* (Lb.58). L'inhibition des souches *E. coli* par certaines souches de *Lb. plantarum* a été déjà décrite par plusieurs travaux (Todorov *et al.*, 2004 et Karthikeyan et Santosh, 2009).

Les autres souches à Gram<sup>-</sup> étudiées, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Salmonella enterica*, ont été inhibées à pH 6,2, par *Lb. plantarum* (Lb.58). Par contre, en milieu tamponné, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter calcoaceticus* étaient inhibées surtout par les souches *Lb. plantarum* (Lb. 68). Cependant, *Salmonella enterica* n'était pas inhibée par aucune souche lactique sur milieu tamponné. Karthikeyan et Santosh (2009), ont décrit des souches de *Lactobacillus plantarum* qui inhibent les souches de *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Paratyphi*, *Klebsiella* sp. et *Pseudomonas aeruginosa*.

L'interaction des souches lactiques entre elles, montre que la bactérie qui a la meilleure capacité d'inhibition c'est *Lb. plantarum* (Lb.58) qui est en même temps, la plus sensible à l'inhibition. *Lb. plantarum* (Lb. 58) a la meilleure activité antibactérienne, elle a inhibé toutes les souches testées.

En culture mixte, la croissance de *S. aureus* ATCC 25923 avec *Lactobacillus plantarum* (Lb.58) a été évaluée sur milieu lait. Après 9 h d'incubation la croissance de *S. aureus* commence à diminuer. Cette décroissance continue est atteinte 1.64 Log ufc/ml après 24h d'incubation. Après 48h d'incubation le nombre de *Staphylococcus aureus* est inférieur à 10 cellules. Après 72h d'incubation aucune culture de *Staphylococcus aureus* n'a été obtenue.

L'activité antibactérienne des souches lactiques peut être due à la production de plusieurs agents antibactériens. L'acide lactique et l'acidification du milieu inhibent plusieurs types de bactéries. Aussi, ces souches produisent aussi le diacétyle, qui possède aussi un pouvoir d'inhibition. L' $H_2O_2$ , libéré par les souches lactiques inhibent les bactéries qui ne possèdent pas des défenses contre le stress oxydatif (la catalase, par exemple) (Ouwehand et Vesterlund, 2004).

Gulahmadov *et al.*, (2006) ont étudiés l'effet inhibiteur des lactobacilles isolés à partir d'un fromage traditionnel d'Azerbaïdjan préparé à partir du lait cru de chèvre sur la croissance de certaines bactéries pathogènes parmi les quelles *Staphylococcus*. D'autres travaux conduits par Rodrigues *et al.*, (2005) sur l'inhibition de *S. aureus* en fromagerie ainsi le nombre de *S. aureus* a été de 0.40 log ufc/ml après 24 h comparé au témoin qui été de 5,16 log ufc/ml. La souche de *Lb. plantarum* (Lb.58) a montré un potentiel remarquable dans l'inhibition de *S. aureus*; cette inhibition est due à la production de multiple substances anti-bacteriennes appartiennent probablement à des bactériocines (Hernandez *et al.*, 2005). Arqués *et al.*, (2005) ont observé qu'après 72h d'incubation le nombre de *S. aureus* était de 0,46 log ufc/ml comparé au témoin ou le nombre était de 6.46 log ufc/ml.

Cependant, dans un milieu tamponné à pH 7, et dans l'interaction avec des bactéries qui possèdent la catalase, *S. aureus* par exemple, l'activité antibactérienne des souches étudiées persiste. Après le traitement avec des enzymes protéolytiques,  $\alpha$ -chymotypsine et la pepsine, l'inhibition disparaît. Ce qui suggère que les souches *Lb. plantarum* (Lb.58) étudiées produisent des agents de nature protéique, qui causent l'inhibition des autres bactéries. Ces composés protéiques peuvent être des bactériocines. La production des bactériocines par les souches *Lb. plantarum* est largement acceptée (Olasupo, 1996; Ouwehand et Vesterlund, 2004 ; Todorov *et al.*, 2004 et Karthikeyan et Santosh, 2009).

Nous notons la double action de *Lactobacillus plantarum* (Lb.58) par la production d'acide et ou une production de substances antimicrobiennes (bacteriocin-like). L'acidité est la première étape dans la production de fromage pour atteindre le pH approprié pour former un lait caillé. L'acidité et la production de bactériocine jouent ensemble un rôle important en production fromagère comme décrit par Ryan *et al.*, (1996). L'inhibition de *S. aureus* par la souche *Lactobacillus plantarum* (Lb.58) est due à la production de substances antibactérienne, cependant l'acidité produite joue un rôle combiné dans cette inhibition. Des résultats semblables ont été rapportés par Noonpakdee *et al.*, (2003) qui ont isolés un nombre considérable de bactéries lactiques à partir des produits de charcuterie et ont constatés que seulement une souche de *Lactobacillus* était capable d'atteindre un pH final de 4,3.

La détermination de la sensibilité aux antibiotiques des lactobacilles *Lb. plantarum* Lb.58 et Lb.68 été réalisés.

Plusieurs chercheurs ont déjà utilisé cette techniques dans l'étude des lactobacilles (Zhoua *et al.*, 2005; Ortu *et al.*, 2007 et Taheri *et al.*, 2009).

Nos résultats obtenus dans ce travail, sont comparables à celles trouvés par d'autres

chercheurs. Mikelsaar *et al.*, (2004), ont signalé que des souches de *Lb. plantarum* étudiées, ont présenté une résistance de 100% à la cefoxitine et la vancomycine et 71% à la ciprofloxacine. Pour la tétracycline, 43% des souches étaient sensibles, 29% intermédiaires et 29% résistantes.

Vescovo *et al.*, (1982), ont trouvé que des souches de *Lb. acidophilus* et *Lb. reuteri*, sont résistante à la plupart des Antibiotiques testés (21 antibiotiques), de même Stropfová et Lauková (2004), ont signalé des lactobacilles résistantes à la vancomycine.

De nombreux chercheurs ont spéculé que la bactérie commensale telle que les bactéries lactiques peuvent servir de réservoir des gènes de résistance aux antibiotiques similaires à ceux trouvés dans les pathogènes humains. La principale menace associée à ces bactéries, c'est qu'ils peuvent transférer des gènes de résistance aux bactéries pathogènes. Des gènes conférant la résistance à la tétracycline, l'érythromycine et la vancomycine ont été détectés et caractérisés chez *Lactococcus lactis*, entérocoques et plus récemment dans les espèces *Lactobacillus* isolées de la viande et des produits laitiers fermentés (Mathur et Singh, 2004).

West et Warner (1985), ont prouvé que certaines souches de *Lb. plantarum*, peuvent devenir résistantes à la streptomycine et la rifampine, après le transfert d'un plasmide à partir des *Streptococcus*.

La réduction des cas des intoxications alimentaire due aux germes nuisibles peut se réaliser par l'exploitation des potentialités des bactéries lactiques capables de produire des substances diverses dotées d'une activité antimicrobienne.

Cette approche a été déjà soulignée par Topisirovic *et al.*, (2006) en exploitant les potentialités inhibitrices naturelles de *Lactobacillus helveticus* dans la biopréservation des aliments et la réduction des germes de contamination. Les espèces de *Lactobacillus* isolées du lait cru de chèvre d'Algérie peuvent servir à cet objectif.

Ces résultats ouvrent des perspectives intéressantes pour lutter contre les intoxications alimentaires en utilisant des potentialités biologiques et les interactions entre les microorganismes afin de réduire ainsi l'effet secondaire indésirable des produits chimiques appelés conservateurs. Les lactobacilles isolés du lait cru de chèvre qui synthétisent des substances antimicrobiennes, seront utilisées comme un moyen efficace dans la biopréservation des aliments dans le futur proche.

Effet de l'extrait brut de *Lactobacillus plantarum* (Lb.58) sur la croissance de *S. aureus* ATCC 25923 a été testé. Les résultats obtenus montrent que les dilutions 1/2 et 1/4 et 1/8 ont montré une activité inhibitrice. Aucune évolution de la densité optique n'a été observée.

Ces résultats révèlent l'efficacité de l'extrait chauffé sur l'inhibition de *S. aureus*. A partir de la dilution 1/16 nous remarquons que le taux de survie et d'une croissance de *S. aureus* dépasse

largement les 50%. Cette activité inhibitrice de *S. aureus* par *Lb. plantarum* (Lb.58) observée en milieu synthétique riche doit être exploitée pour servir comme moyen de biopréservation des aliments pour lutter contre les intoxications alimentaires observées dans les saisons estivales.

La réduction des cas des intoxications alimentaire due aux germes nuisibles peut se réaliser par l'exploitation des potentialités des bactéries lactiques capables de produire des substances diverses dotées d'une activité antimicrobienne. Cette approche a été déjà soulignée par Topisirovic *et al.*, (2006) en exploitant les potentialités inhibitrices naturelles de *Lactobacillus helveticus* dans la biopréservation des aliments et la réduction des germes de contamination. Les espèces de *Lactobacillus* isolées du lait cru de chèvre d'Algérie peuvent servir à cet objectif.

Ces résultats préliminaires ouvrent des perspectives intéressantes pour lutter contre les intoxications alimentaires en utilisant des potentialités biologiques et les interactions entre les microorganismes afin de réduire ainsi l'effet secondaire indésirable des produits chimiques appelés conservateurs. Les *Lactobacillus* isolées du lait cru de chèvre qui synthétisent des substances antimicrobiennes, seront utilisées comme un moyen efficace dans la biopréservation des aliments dans le futur proche.

## CONCLUSION GÉNÉRALE

Le screening des bactéries lactiques appartenant au genre *Lactobacillus* a été effectué à partir du lait cru de chèvre de la région d'Oran. 252 isolats ont été caractérisés. Les isolats sont tous des bâtonnets gram positif, catalase négative, non sporulé, sont microaérophiles et poussent en anaérobiose et dans un milieu légèrement acide.

Sur 252 isolats, 64 ont produit des zones d'inhibitions par confrontation directe sur milieu solide, L'utilisation du tampon phosphate dans le milieu a réduit le nombre de souche productrices de zone d'inhibition à 8. Ces 8 isolats retenus ont subi des tests supplémentaires physiologiques et biochimiques pour identification de l'espèce. Les espèces révélées sont: *Lb. plantarum* (Lb.58, Lb.68), *Lb. casei* (Lb.13), *Lb. rhamnosus* (Lb.54, Lb.52), *Lb. paracasei subsp, paracasei* (Lb.55), *Lb. sakei subsp, sakei* (Lb.21), *Lb. plantarum* (Lb.22).

Les *Lactobocillus* identifiées ont été testées pour déterminer leurs activités antimicrobiennes vis-à-vis les souches test à Gram<sup>+</sup> (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus* sp.) et à Gram<sup>-</sup> (*Escherichia coli* ATCC 25921). Parmi les 8 espèces de *Lactobacillus*, 2 souches ont montré une activité intéressante vis-à-vis de 10 souches indicatrices et pathogènes et qui sont les suivantes: trois souches de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923, ATCC 29213 et ATCC 43300), *Listeria ivanovii* ATCC 19119, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Salmonella enterica* et *Bacillus* sp. Les deux souches performantes de *Lactobacillus plantarum* (Lb.58 et Lb.68) ont produit des profils d'inhibition différents.

La souche de *Lactobacillus plantarum* (Lb.58) a montré une activité antimicrobienne importante (diamètre supérieure à 7 mm) vis avis des bactéries test sur milieu solide par rapport aux autres espèces de lactobacilles.

Les caractères technologiques de *Lactobacillus plantarum* (Lb.58) sont satisfaisants pour une utilisation en agro-alimentaire et industrielle. Elle est thermorésistante, produit des arômes et possède une activité protéolytique. Cependant, elle ne produit pas du dextrane sur milieu MSE. La souche de Lb.58 a une cinétique de croissance et d'acidification identique dans le milieu MRS et dans le lait écrémé à 30°C.

*Lb. plantarum* (Lb.58) possède la meilleure activité antibactérienne, elle a inhibé toutes les souches étudiées. En culture mixte, la croissance de *S. aureus* ATCC 25923 avec *Lb. plantarum* (Lb.58) a été évaluée sur milieu lait. Après 9 h d'incubation la croissance de *S.*



*aureus* commence à diminuer. Cette décroissance continue est atteinte 1.64 Log ufc/ml après 24 h d'incubation. Après 48 h d'incubation le nombre de *S. aureus* été inférieur à 10 ufc/ml. A 72 h d'incubation aucune culture de *S. aureus* n'a été observée.

La sensibilité aux antibiotiques, montrent que la souche *Lb. plantarum* (Lb.58) est sensible aux antibiotiques suivants: ampicilline, ticarcilline, imipeneme, érythromycine, pristinamycine, rifampine, nitrofurantoine, triméthoprime et sulfméthoxazole. Par contre elle est résistantes aux: oxacilline, ceftaxime, ceftazidime, cefsulodine, amikacine, tobramycine, spiramycine, vancomycine, bacitracine, colistine, acide nalidixique, ciprofloxacine, ofloxacine, pefloxacine et acide fusidique.

Ce travail nous a permis de détecter *Lb. plantarum* (Lb.58) isolée à partir du lait cru de chèvre de d'Algérie capable d'inhiber *Staphylococcus aureus* de référence en milieu lait. L'intérêt de ce travail de recherche est de développer une stratégie permettant de contrôler et de limiter la croissance des germes indésirables, par l'exploitation des potentialités antibactériennes des *Lactobacillus* qui sont capables d'assurer une qualité hygiénique et bio-préservative désirable inhibant ainsi les germes nuisibles et toxigènes dans les produits alimentaires.

Le développement d'un levain spécifique contenant *Lb. plantarum* (Lb.58), doté d'un pouvoir bio-préservatif permet d'augmenter la durée de conservation des produits laitiers et d'assurer une qualité sanitaire.

L'exemple dans cette étude, des interactions entre souche *Lactobacillus plantarum* locales et *Staphylococcus aureus* conduit à une possibilité de développer un levain lactique local possédant des caractéristiques préventives et technologiques recherchés. Ce travail ouvre des perspectives sur la recherche et le screening des espèces de *Lactobacillus* indigènes à caractère probiotique afin de réduire la prolifération des germes nuisibles, d'assurer une qualité sanitaire efficace rechercher et d'améliorer la valeur nutritive du produit fermenté par les espèces de *Lactobacillus* indigènes.

## BIBLIOGRAPHIE

- Asen I.M., Moreto T., Katla T., Axelsson L. et Storro I. 2000.** Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocins production by *Lactobacillus sake* CCUG 42687. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53: 159-166.
- Abdelguerfi A. et Laouar M. 2003.** Espèces fourragères et pastorales, leurs utilisations au Maghreb (Algérie, Maroc, Tunisie). Editions FAO, 136p.
- Abee T., Klaenhammer T.R et Letellier L. 1994.** Kinetic studies of the action of lacticin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus johnsonii* that forms poration complexes in the cytoplasmic membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1006-13.
- Abriouel H.E., Valdivia A., Galvez et Maqueda M. 2001.** Influence of physico-chemical factors on the oligomerization and biological activity of bacteriocins AS-48. *Curr. Microbiol.* 42: 89-95.
- Acheson. 1999.** Independent inquiry into inequalities in health report. The Stationery Office. London.
- Adams M.R. et Hall C.J. 1988.** Growth inhibition of food borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. *Int. J. Food Sci. Technol.* 23: 287-292.
- Adams. et Moss. 2008.** Antimicrobial effectiveness of spices: an approach for use in food conservation systems. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 48 : 4.
- Aeschlimann A. et Von Stockar U. 1990.** The effect of yeast extract supplementation on the production of lactic acid from whey permeate by *Loctobacillus helveticus*. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 32:398.
- Ahrné S., Nobaek S., Jeppsson B., Adlerberth I., Wold A. et Molin G. 1998.** The normal *Lactobacillus* flora of healthy human rectal and oral mucosa. *J. App. Microbiol.* 85:88-94.
- Alais C., 1984.** Science du lait, principes des techniques laitières. Ed. SEPAIC. Paris.
- Alakomi H.L., Skytta E., Saarela M., Mattila-Sandholm T., Latva-Kala K. et Helander I.M. 2000.** Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2001–2005.
- Alexander F. 1929.** Découverte de la pénicilline. *British Journal of Experimental Pathology.*
- Alexandre D.P., Silva M.R., Souza M.R. et Santos V.L.M. 2002.** Artisanal Antimicrobial activity of lactic acid bacteria from undermined cheese against indicator microorganisms. *Arch. Bra. Med. Veter. Zoot.* 54: 424-428
- Amiali M.N., Lacroix C et Simard R.E. 1998.** High nisin Z production by *Lactococcus lactis* UL719 in whey permeate with aeration. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14: 887-894.
- Amiot J et Lapointe-vignola C. 2002.** Science et technologie du lait : transformation du lait. *Presses intl. polytechnique. quebec.* 600.
- An Y., Adachi Y. et Ogawa Y. 2004.** Classification of lactic acid bacteria isolated from chigee and mare milk collected in Inner Mongolia. *Ani. Science J.* 75: 245–252.
- Ana Belen F., López-Díaz M.C., Álvarez-Martin P. et Mayo B. 2006.** Microbienne caractérisation de la traditionnelle espagnole à pâte persillée fromage de Cabrales: identification des dominantes des bactéries lactiques. *Eur. Res. Technol. Aliment.* 223, 503-508.

- Anderssen E.L., Diep B.D., Nes I.F., Eijsink V.G.H. et Nissen-Meyer J. 1998.** Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2269-2272.
- Andersson R. 1986.** Inhibition of *Staphylococcus aureus* and spheroplasts of gram-negative bacteria by an antagonistic compound produced by a strain of *Lactobacillus plantarum*. *Int. J. Food Microbiol.* 3:149-160.
- APRIA. 1979.** Production de nucléotides, d'arômes, d'enzymes et d'autres corps spécifiques par les micro-organismes. Microbiologie et industrie alimentaire: annales du Congrès international, Paris, 7-12 octobre. Volume 3.
- Arquès J.L., Rodriguez E., Gaya P., Medina M., Guamis B. et Nunez M. 2005.** Inactivation of *Staphylococcus aureus* in raw milk cheese by combination of high-pressure treatments and bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *Int. Dairy. J.* 15: 893-900.
- Aslim B., Yuksekdog Z.N., Sarikaya E. et Beyatli Y. 2005.** Determination of the bacteriocin-like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products. *LWT.* 38: 691-694.
- Avila M., Garde S., Medina M. et Nunez M. 2005.** Effects of milk inoculation with bacteriocin-producing lactic acid bacteria on a *Lactobacillus helveticus* adjunct cheese culture. *J. Food Prot.* 68: 1026-1033.
- Avril D. et Denis M. 1992.** Biopréservation by lactic acid bacteria. *Antonie leeuwenhoek. J.* 70: 331-345.
- Axelsson L.T. 2004.** Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In Lactic Acid Bacteria - Microbiology and functional aspects. Edited by S. Salminen, A.v. Wright et A. Ouwehand. Marcel Dekker, Inc. 1-66.
- Axelsson L.T., Chung T.C., Dobrogosz W.J. et Lindgren S.E. 1989.** Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microbiol. Ecol. Health Dis.* 2: 131-136.
- Ayad E.H.E., Nashat S., El-Sadek N., Metwaly H et El-Soda M. 2004.** Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria. *Food Microbiol.* 21, 715-725.
- Badis A., Guetarni D., Moussa-Boudjema B., Henni D.E., Tornadijo M.E. et Kihal M. 2004.** Identification of cultivable of lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and evaluation of their technological properties. *Food Microbiol.* 3: 72-78.
- Badis A., Guetarni D., Moussa-Boudjema B., Henni D.E., Tornadijo M.E. et Kihal M. 2004 a.** Identification of cultivable of lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and evaluation of their technological properties. *Food Microbiol.* 3: 72-78.
- Badis A., Guetrani D., Moussa-Boudjema B., Henni D.E. et Kihal M. 2004 b.** Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiol.* 21: 579- 588.
- Badis A., Laouabdia-Sellami N., Guetarni D., Kihal M. et Ouzrout R. 2005.** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées a partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales "Arabia et Kabyle". *Sci et Technol.* 23: 30-37.

- Badis A., Laouabdia-Sellami N., Guetarni D., Kihal M. et Ouzrout R. 2006.** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir du lait cru de chèvre de deux populations caprines locales « Arabia et Kabyle ». *Sci. Tech.* 23 : 30-37.
- Baird-Parker A.C. 1980.** Organic acids. In J. H. Silliker (Ed.), *Microbial ecology of foods*. New York: Academic press. pp. 126–135
- Balows A., Truper H.G., Dworkin M., Harder W. et Schleifer K.H. 1992.** The prokaryotes and Ed – vol 11. *Springer Verlage*, New York.
- Barefoot S.F. et Klaenhammer T.R. 1983.** Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1808-1815.
- Barefoot SF et Klaenhammer TR. 1984.** Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. *Antimicrob Agents Chemother. Pub Med.* 26(3):328–334.
- Bayoumi S. 1991.** Nisin and yoghurt manufacture. *Chem. Microbiol. Techn. Lebensin.* 13: 65-69.
- Bendimerad N., Kihal M. et Berthier F. 2012.** Isolation, Identification, and Technological Characterization of Wild *Leuconostocs* and *Lactococci* for Traditional Raib Type Milk Fermentation. *Dairy Sci. Technol.* 92: 249-264.
- Benhamouche N. 2005.** Sélection de Bactéries Lactiques Productrices de Substances Antimicrobiennes de la Collection du Laboratoire de Microbiologie Appliquée. Option: Microbiologie Fondamentale et Appliquée. *Mémoire de Magister. Département Biologie. Faculté des Sciences. Université d'Oran*: 166 p
- Benthin S. et Villadsen J. 1995.** Different inhibition of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* by D- and L-lactic acid: effects on lag phase, growth rate and cell yield. *J. Appl. Bacteriol.* 78: 647-654.
- Berry E.D., Liewen M.B., Mandigo R.M. et Hutkins R.W. 1995.** Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bacteriocin-producing *Pediococcus* during manufacture of fermented semi-dry sausage. *J. Food Protect.* 53: 194-197.
- Berthier F. et Ehrlich S.D. 1999.** Genetic diversity within *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* and design of PCR primers for its detection using randomly amplified polymorphic DNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 997–1007.
- Bissonnette F., Labrie S., Deveau H., Lamoureux M. et Moineau S., 2000.** Characterization of mesophilic mixed starter cultures used for the manufacture of aged Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 83: 620-627.
- Björkroth J. et Holzappel W. 2003.** Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. In *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*. Edited by M. Dworkin. New York, Springer-Verlag. *Epub March.* 28.
- Björkroth J. et Holzappel W. 2006 :** Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. Chap. 1. 2. 9. In *prokaryotes.* 4 :267-319.
- Bohatier J. 1991.** The rumen protozoa : taxonomy, cytology and feeding behaviour. In : Jouany J.-P. (Ed.), *Rumen microbial metabolism and ruminant digestion. Institut National de la Recherche Agronomique* : Paris, 27-38.
- Bolotin A., Wincker P., Mauger S., Jaillon O., Malarne K., Weissenbach J., Ehrlich S.D. et Sorokin A. 2001.** The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res.* 11: 731-753.
- Bonassi I.A., Matrins D. et Roca R. 1998.** Composition chimique et propriétés physico-chimiques du lait de chèvre dans l'état de Sao Paulo Brésil. *Revue des ENIL.* 217 : 21-28.

- Bottazzi V. et Dellaglio F. 1967.** Acetaldehyde and diacétyle production by *Streptococcus thermophilus* and other lactic streptococi. *J. Dairy Res.* 34: 109-113.
- Boucher I., Émond É., Parrot M. et Moineau S. 2001.** DNA Sequence Analysis of Three *Lactococcus lactis* Plasmids Encoding Phage Resistance Mechanisms. *J. Dairy Sci.* 84: 1610-1620.
- Boumehira A.Z., Mami. A., Hamedi A. R., Henni J.E. et Kihal M. 2011.** Identification and Characterization of Functional and Technological *Lactobacillus plantarum* Strains Isolated from Raw Goat and Camel Milk Collected in Algeria. *J. Pure. Appl. Microbiol.* Vol. 5(2), p. 553-566.
- Bourel B., Hedouin V., Martin-Bouyer L., Becart A., Tournel G., Deveaux M. et Gosset D. 2001.** Effects of morphine in decomposing bodies on the development of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *J. Forensic Sci.* 44: 354-358.
- Bourgeois C.M., Mescle J., Zucca J. et Larpent J.F. 1996.** Microbiologie alimentaire (tome 1) Lavoisier. Paris, P : 29-245.
- Bouziane T., Elmajdoub T., Thonart P.H et Hamdi M. 2004.** Sélection de bactéries lactiques probiotiques d'origine animale. *Microbiol. Hyg. Alim.* Vol 16. n°46.
- Branger C., Zamfir O., Geoffroy S., Laurans G., Arlet G., Thien H.V., Gouriou S., Picard B et Denamur E. 2005.** Genetic background of *Escherichia coli* and extended-spectrum  $\beta$ -Lactamase type. *Emerg. Infect. Dis.* 11(1):54-61.
- Bredholt S., Nesbakken T. et Holck A. 2001.** Industrial application of an antilisterial strain of *Lactobacillus sakei* as a protective culture and its effect on the sensory acceptability of cooked, sliced, vacuum-packaged meats. *Int. J. Food Microbiol.* 66: 191-196.
- Breukink E., van Kraaij C., van Dalen A., Demel R.A., Siezen R.J., de Kruijff B et Kuiper O.P. 1998.** The orientation of nisin in membranes. *Biochemistry.* 36: 8153-8162.
- Brillet A., Pilet M.F., Prevost H., Cardinal M. et Leroi F. 2005.** Effect of inoculation of *Carnobacterium divergens* V41, a biopreservative strain against *Listeria monocytogenes* risk, on the microbiological, chemical and sensory quality of cold-smoked salmon. *Int. J. Food Microbiol.* 104: 309-324.
- Budde B.B., Hornbaek T., Jacobsen T., Barkholt V. et Koch A.G. 2003.** *Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for use as a protective culture for vacuum-packed meats: culture isolation, bacteriocin identification, and meat application experiments. *Int. J. Food Microbiol.* 83: 171-184.
- Burrow C.D., Sandine W.E., Elliker P.R. et Speckman C. 1970.** Characterization of diacetyl negative mutants of *Streptococcus diacetylactis*. *J. Dairy Sci.* 53: 121-125.
- Byczkowski J. et Gessner T., 1988.** Biological role of superoxide ion radical. *Int. J. Biochem.* 20: 569-580.
- Cabo M.L., Braber A.F. et Koenraad P. 2002.** Apparent antifungal activity of several lactic acid bacteria against *Penicillium discolor* is due to acetic acid in the medium. *J. Food Prot.* 65: 1309-1316.
- Callewaert R. et De Vuyst L. 2000.** Bacteriocin production with *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 is improved and stabilized by fed-batch fermentation. *Appl Environ Microbiol.* 66: 606-613.

- Callewaert R., De Vuyst L., Remedios M. et Moreno F. 2002.** Isolation of bacteriocins through expanded bed adsorption using a hydrophobic interaction medium. *Bioseparation*. 10(1-3):45-50.
- Caplice E. et Fitzgerald G.F. 1999.** Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 50: 131-149.
- Carina Audisio M. et Maria C.A. 2010.** Bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus salivarius* subsp. *Salivarius* CRL 1384 with anti- *Listeria* and anti- *salmonella* effect. *Res. J. Microbio.* 5 (7): 667-675.
- Carr F.J., Chill D. et Maida N. 2002.** The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Crit. Rev. Microbiol.*, 28: 4, 281-370.
- Chafai S. 2006 :** Effet de l'addition des probiotiques dans les régimes alimentaires sur les performances zootechniques du poulet de chair, Mémoire de magister en sciences vétérinaires. *Université El-hadj-Lakhdar de Batna.*
- Chahbal M. 1991.** Antimicrobial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1901-1906.
- Chahbal M. 1993.** Isolation and characterization of acidocin A and cloning of the acteriocin gene from *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1061-1067.
- Chan W.C., Dodd H.M., Horn N., Maclean K., Lian L.Y., Bycroft B.W., Gasson M.J et Roberts G.C.K. 1996.** Structure-activity relationships in the peptide antibiotic nisin: role of dehydroalanine 5. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2966-2969.
- Charteris W.P., Kelly P.M., Morelli L. et Collins J.K. 2001.** Quality control *Lactobacillus* isolates for use with the API 50CH and API ZYM systems at 37°C. *J. Basic. Microbiol.* 41: 241-251.
- Chekroune A., Ait Hammadouche N., Kihal M., Bensoltane A., Saidi D., Mazmase F et Kheroua O. 1998.** Hydrolytic activity of lactic acid bacteria on bovine blactoglobulin. effects on its immunological reactivity. *Microbiol. Aliment. Nutr.* 16: 211-220.
- Cherrington C.A., Hinton M., Mead G.C. et Chopra I. 1991.** Organic acids: chemistry, antibacterial activity and practical applications. *Adv. Microbiol. Phys.* 32: 87-108.
- Chilliard Y et Sauvant D. 1987.** La sécrétion des constituant du lait. In : INRA-CEPIL. Le lait, Matière premier de l'industrie laitière. Paris. P13-26.
- Choisy C., Desmazeaud M., Gueguen M., Lenoir J., Schmidt J.L et Tourneur C. 1997.** Les phénomènes microbiens. In : Le fromage. Ed. Eck A, Gillis JC, Lavoisier *Tec & Doc, Paris, France.* Pp. 377-446.
- Chubb M., Morelli L. et Bottazzi V. 1985.** Drug Resistance Plasmids in *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus reuteri*. *Appl. Environ. Microbiol.* 43(1): 50-56.
- Cintas L.M., Casaus P., Holo H., Hernandez P.E., Nes I.F. et Havarstein L.S. 1998.** Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J. Bacteriol.* 180: 1988-1994.
- Cintas L.M., Herranz C., Hernández P.E., Casaus M.P., Nes I.F. et Hernández P.E. 2001.** Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Sci. Technol. Int.* 7: 4, 281-305.
- Codex alimentarius. 2003.** Norme codex pour les laits fermentés. Adopté en 2003. Révision 2008, 2010. *Codex Stan 243.*
- Cogan M.T., Dowd O. et Mellerick D. 1981.** Effects of pH and sugar on acetoin production from citrate by *Leuconostoc lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 1-8.



- Cogan T.M. 1986.** The leuconostocs: Milk products. In: Gilliland, S.E. (Ed.), *Bacterial Starter Cultures for Foods*, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 25-40.
- Cogan T.M. et Hill C. 1993.** Cheese starter cultures. In: Fox, P.F. (Ed.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Vol. 1, Second Edition, Chapman and Hall, London, pp. 193-255.
- Cogan T.M., Barbosa M., Beuquier E., Bianchi-Salvadori B., Coconcelli P.S., Fernandes I., Gomez J., Gomez R., Kalantzopoulos G., Ledda A., Medina M., Rea M.C. et Rodriguez E. 1997.** Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *J. Dairy Res.* 64: 409-421.
- Collins M.D., Ash C., Farrow J.A.E., Wallbanks S. et Williams A.M. 1989 b.** 16S ribosomal ribonucleic acid sequence analyses of lactococci and related taxa. Description of *Vagococcus fluvialis* gen. nov., sp. nov. *J. Appl. Bacteriol.* 67: 453-460.
- Collins M.D., Farrow J.A.E., Phillips B.A., Ferusu S. et Jones D. 1987.** Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola*, and Some Catalase-Negative, Asporogenous, Rod-Shaped Bacteria from Poultry in a New Genus, *Carnobacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 37: 310-316.
- Collins M.D., Samelis J., Metaxopoulos J. et Wallbanks S. 1993.** Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 595-603.
- Çon A.H. et Gökalp H.Y. 2000.** Production of bacteriocin-like metabolites by lactic acid cultures isolated from sucuk samples. *Meat Sci.* 55: 1, 89-96.
- Condon S. 1987.** Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiol. Rev.*, 46: 269-280.
- Conner D.E. 1993.** Naturally occurring compounds. In: *Antimicrobials in Foods*, 2nd edition. eds. Davidson, P.M. and Branen, A.L. pp. 441-468. Marcel Dekker Inc., New York.
- Corcy J.C. 1991.** La chèvre, Ed. La maison Rustique, Paris, P7-21.
- Corry S., Huang D.C. et Adams J.M. 2003.** The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. The walter and eliza hall. *Institute of medical res.* 22(53): 8590-607.
- Crittenden R., Bird A.R., Gopal P., Lee Y.K. et Playn M.J. 2005.** Probiotic research in Australia, New Zealand and the Asia-Pacific region. *Curr. Pharm. Design.* 11: 37-53.
- Crow V.L., Coolbear T., Holland R., Pritchard G.G. et Martley F.G. 1993.** Starters as finishers: starter properties relevant to cheese ripening. *Int. Dairy J.* 3: 423-460.
- Curk D. et MacPhail A. 1996.** Précision des mesures de vitesse de croissance des streptocoques lactiques dans le lait basées sur la méthode de dénombrement microbien par formation de colonies. Étude de référence avec *Lactococcus lactis*. *Lait.* 1989. 69: 433-447.
- Davidson B.E., Kordias N., Dobos M et Hillier A.J. 1996.** Genomic organization of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 70: 161-183.
- Dagdemiir E. et Ozdemir S. 2008.** Technological characterization of the natural lactic acid bacteria of artisanal Turkish White Pickled cheese. *Int J Dairy Technol.* 61, Issue 2, p. 133-140.
- Davidson P.M., Post L.S., Braner A.L. et Mc Curdy A.R. 1983.** Naturally occurring and miscellaneous food antimicrobials. In: *Antimicrobials in Foods*. eds. Davidson, P.M. and Branen, A.L. Marcel Dekker Inc., New York. pp. 385-392.

- Davies E.A., Bevis H.E et Delves-Broughton J. 1997.** The use of the bacteriocin, nisin, as a preservative in ricotta-type cheeses to control the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* 24:343-6.
- Davies F.L. et Law B.A. 1984.** Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk. *Elsevier. App. Sc. Publication.* New York, USA.
- De Man J.C., Rogosa M. et Sharpe M.E. 1960.** A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 23: 130-135.
- De Roissard H. et Luquet F.M. 1994.** Bactéries lactiques. 2volumes, Lorica Uriage, 600 p. par volume.
- De Vos W.M., Kuipers O.P., van der Meer J.R et Siezen R.J. 1995.** Maturation pathway of nisin and other lantibiotics: post-translationally modified antimicrobial peptides exported by gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 17:427-37.
- De Vuyst L. et Vandamme E.J. 1994 a.** Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In de Vuyst L. et Vandamme E.J (ed). Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and applications. Blackie Academic et Professional, London, United Kingdom. p. 91–142
- De Vuyst L. et Vandamme E.J. 1994 b.** Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp *lactis*. In De Vuyst L. et Vandamme E.J (Eds.), Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and application. London and New York: Blackie. pp. 151–221.
- De Vuyst Luc. et Leroy F. 2007.** Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13:194–199.
- Deegan L.H., Cotter P.D., Hill C. et Ross P. 2006.** Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.* 16: 1058-1071.
- Demarigny Y., Beuvier E., Dasen A. et Duboz G. 1996.** Influence of raw milk microflora on the characteristics of Swiss-type cheese. Evolution of microflora during ripening and characterisation of facultatively heterofermentative lactobacilli. *Le Lait*, 76: 371-387.
- Desmazeaud M. 1983.** L'état des connaissances en matière de nutrition sur les bactéries lactiques. *Le Lait.* 63, 286-310.
- Desmazeaud M. et Cogan T.M. 1996.** Role of cultures in cheese ripening. In: Cogan T.M., Accolas J.P (Eds.), Dairy Starter Cultures. *VCH Publishers, Inc.*, New York. pp. 207-231.
- Desmazeaud M.J. et De Roissard H.1992.** Métabolisme général des bactéries lactiques, Bactéries lactiques, aspects fondamentaux et technologiques. *Ed. Lorica Uriage.* 1, 169-207.
- Devandra L.M. 1975-1980.** Valeur nutritionnelle du lait en alimentation humaine in intérêt nutritionnel et diététique du lait de chèvre. *INRA.* pp10-12-26.
- Devriese L.A. et Pot, B. 1995.** The genus *Enterococcus*. In The Genera of Lactic Acid Bacteria, Edited by Wood B.J.B. et Holzapfel W.H. London: *Blackie Academic et Professional.* pp. 327-367.
- Djadouni F. et Kihal M. 2012.** Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria and the Spectrum of their Biopeptides against Spoiling Germs in Foods. *Braz. Arch. Biol and Biotechnol.* 55. (3): 435-443.
- Dortu C. et Thonart P. 2009.** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bio-conservation des produits alimentaires. *Biotech. Agro. Société et Environnement.* 13 (1) : 1-5.



- Dougherty B.A., Hill C., Weidman J.F., Richardson D.R., Venter J.C. et Ross R.P. 1998.** Sequence and analysis of the 60 kb conjugative, bacteriocin producing plasmid pMRC01 from *Lactococcus lactis* DPC3147. *Mol. Microbiol.* 29: 1029-1038.
- Drici H., Gilbert C., Kihal M. et Atlan D. 2009.** Citrate-fermenting *Lactococcus lactis* strains isolated from dromedary's milk Atypical citrate-fermenting *Lactococcus lactis* strains isolated from dromedary's milk. *J. App. Microbiol.* 108: 647–657.
- Driessen A.J.M., Van den Hooven H.W., Kuiper W., Van de Kamp M., Sahl H.G., Konings R.N.H. et Konings W.N. 1995:** Mechanistic studies of lantibiotic-induced permeabilization of phospholipid vesicles. *Biochem.* 34: 1606-1614.
- Earnshaw R.G. 1992.** The antimicrobial action of lactic acid bacteria: natural food preservation systems. In: *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*. ed. Wood B.J.B. Elsevier *Appl. Sci.* London and New York. pp. 211-232.
- Eklund H., Cambillau C., Sjoberg B.M., Holmgren A., Jornvall H., Hoog J.O et Branden C.I. 1984.** Conformational and functional similarities between glutaredoxin and thioredoxins. *EMBO. J.* 3: 1443–1449.
- Eklund T. 1989.** Organic acids and esters. In: Gould, G.W. (Ed.), *Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures*, Elsevier *Applied Science*, London, pp. 161-200.
- El Naggat M.H. 2004.** The 2002 Colloquium Address: The role of soil-structure interaction in foundation engineering. *Canad. Geotechnical J.* 41(3).p. 485-509.
- El Shafei H.A., Abdel-Sabour H., Ibrahim N. et Mostefa Y.A. 2000.** Isolation, screening and characterisation of the bacteriocin-producing Lactic and bacteria isolated from traditional fermented. *Food Microbiol. Res.* 154: 4, 321-331.
- El Soda M., Madkor S.A. et Tong P.S. 2000.** Adjunct Cultures: recent developments and potential significance to the cheese industry. *J. Dairy. Sci.* 83: 609-619.
- El-Nagger M.Y.M. 2004.** Comparative of probiotic cultures to control the growth of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Biotechnol.* 3 (2): 173-180.
- El-Soda M., Farkye N., Vuillemarad J., Simard R., Olson N., El Kholy W., Dako E., Medrano E., Gaber M. et Lim L. 1995.** Autolysis of lactic acid bacteria. Impact on flavour development in cheese. Charalambous G. (Ed.), *Food Flavour: Generation Analysis and Process Influence*. Elsevier *Science B.V.*, Amsterdam, The Netherlands, pp. 2205-2223.
- El-Ziney M.G., Jakobsen M. et Debevere J.M. 1998.** Reuterin. *Nat.Food Antimicrobial Systems.* 24: 17-25.
- Ennahar S., Sonomoto K. et Ishizaki A. 1999.** Class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria: antibacterial activity and food preservation. *J. Biosci. Bioeng.* 87: 705-716.
- Erdogan B. et Liden R.C. 2006.** Identification and functional characterization of *Lactobacillus* strains isolated from milk and Giorddu, a traditional Sardinian fermented milk. *Inter. Dairy J.* 17: 1312–1320.
- Farber J.M. 1991.** Microbiological aspects of modified-atmosphere packaging technology: a review. *J. Food Prot.* 54: 58-70.
- Fayol-Messaoudi D., Berger C.N., Coconnier-Polter M.H., Liévin-Le Moal V et Servin A.L. 2005.** pH, lactic acid and non-lactic acid-dependent activities of probiotic Lactobacilli against *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Appl. Environ. Microbiol.* Oct; 71(10):6008-13.

- Ferreira MASS et Lund B.M. 1996.** The effect of nisin on *Listeria monocytogenes* in culture medium and long-life cottage cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* 22:433-448.
- Fitzsimmons N.A., Cogan T.M., Condon S. et Beresford T. 1999.** Phenotypic and genotypic characterization of non-starter lactic acid bacteria in mature cheddar cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3418-3426.
- Flamand P.K., Kastner, C.L. et Fung, D. 1985.** Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 on beef by application of organic acids. *J. Food Prot.* 59: 370-373.
- Flambard B., Richard J. et Juillard J. 1997.** Interaction between proteolytic strains of *Lactococcus lactis* influenced by different types of proteinase during growth in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2131-2135.
- Fleming H.P., Erchells J.L. et Caslilow R.N. 1975.** Microbiol inhibition on isolate *Pediococcus* from cucumber bunc. *Appl. Environ. Microbiol.* 30: 1040-1042.
- Fox P.F. et Lane C.N. 2000.** Contribution of starter and added lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *Int. Dairy. J.* 5: 720-730.
- Freese E., Sheu C.W. et Galliers E. 1973.** Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. *Nature.* 241: 321-325.
- Gaillard S., Leguériel I. et Mafart P. 1998.** Modelling combined effect of temperature and pH on the heat resistance of spores of *Bacillus cereus*. *Food. Microbiol.* 32: 225-233.
- Gaillard B., Breton A. et Bernalier A. 1989.** *Curr Microbiol.* 19: 103-107.
- Ghaly M.F., Awny N.M., Galal A.M. et Askora A., 2005.** Characterization and action of antiphytoviral agent produced by certain streptomycetes species against zucchini yellow mosaic virus. *Egypt J. Biotechnol.*, 19: 209-223.
- Gill A.O. et Halley R.A. 2003.** Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24°C. *Int. J. Food Microbiol.* 80: 251-259.
- Gilliland S.E. 1985.** Concentrated starter culture. In: Bacterial starter cultures for foods, *Ed. Gilliland SE, CRC Press, Inc. Boca Raton USA.* pp: 145-157.
- Goubau P. et Pellegrims E. 2000.** Repères en microbiologie, *Édition Garant.* P: 391.
- Gould G.W. 1991.** Antimicrobial compound. In: Biotechnology and Food Ingredients. eds. Goldberg I. et Williams R. *Van Nostrand Reinhold, New York.* pp. 461-483.
- Goursaud J. 1985.** Le lait de vache, composition et priorités physico-chimiques. In : lait et produits laitiers vache-brebis- chèvre. (Tome 1). *Ed. Masson, Paris,* p: 25-36.
- Grappin R., Jeunet R., Pillet R. et Toquin A. 1981.** A study of goat's milk contents of fat, protein and nitro-genous fractions. *Lait,* 61: 167-24.
- Grattepanche F., 2005.** Etude d'un système de préfermentation en continu du lait par une culture mixte immobilisée fonctionnelle, thèse Ph.D. Université Laval, Québec, PQ, Canada.
- Guarner F. et Schaafsman G.J. 1998.** Probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 39: 237-238.
- Gudkow A.V. 1987.** Starters as mean controlling contaminating organisms. *Milk- the vital force.* pp. 83-93.
- Gueguen B., Chamba J.F., Coulon J. et Perreard E. 1996.** Effect of milk chemical composition and clotting characteristics on chemical and sensory properties of Reblochon de Savoie cheese. *J. Dairy Res.*, 64: 157-162.

- Guerra N.P. et Pastrana L. 2003.** Influence of pH drop on both nisin and pediocin production by *Lactococcus lactis* and *Pediococcus acidilactici*. *Lett. Appl. Microbiol.* 37: 51-55.
- Guessas B. 2007.** Les potentialités métaboliques des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre dans le bio-contrôle de *Staphylococcus aureus*. Thèse de Doctorat d'Etat. Université d'Oran. 148 pp
- Guessas B. et Kihal M. 2005.** Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goats' milk. *Afr. J. Biotechnol.* 3: 6, 339-342.
- Guessas B., Hadadji M., Saidi N. et Kihal M. 2006.** Inhibition of *Staphylococcus aureus* Growth by Lactic Acid Bacteria in Milk. *Dirasat, Agricultural Sci.* 32: 3, 304-312.
- Guessas B et Kihal M. 2004.** Characterization of lactic acid bacteria isolated from raw goats' milk in Algerian arid zone. *Afr. J. biotechnol.* Vol.3, (6), pp.339-342.
- Guizani T., Nizar T. et Triki S. 2007.** Microbiology of Starter Cultures. In Dairy Microbiology Handbook. *Inc. Publication.* 261-347.
- Gulahmadov Gurban Oglu S., Batdorj B., Dalgalarondo M., Chobert J., Alekper Oglu Kuliev A et Haertlé T. 2006.** Characterization of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) from lactic acid bacteria isolated from traditional Azerbaijani cheeses. *European Food Res. Technol.* 224, 229–235.
- Gusils C., Cuozzo S., Sesma F. et Gonzalez S. 2002.** Examination of adhesive determinants in three species of *Lactobacillus* isolated from chicken. *Can. J. Microbiol.* 48: 34-42.
- Haenlein G.F.W. et Caccese R. 1984.** Goat milk versus cow milk. In: Extention goat handbook.
- Haenlein G.F.W. 1988.** Research on goat milk-not wanted. *Dairy Goat J.* 66: 243-245.
- Haenlein G.F.W. 1993.** Producing quality goat milk. *Int. J. Anim. Sci.* 8: 79-84.
- Haenlein G.F.W. 1998.** Goat milk in human nutrition. *Intern. J. Animal Sci.* (India) 6:13.
- Hammes W.P. et Hertel C. 2003.** The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community. Edited by M. Dworkin. New York. Springer-Verlag. Epub December 15<sup>th</sup>.
- Hammes W.P. et Hertel C. 2006.** The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. Chap.1.2.10. In prokaryotes. 4: 320-403.
- Hariharan H., Murphy G.A. et Kempf I. 2004.** *Campylobacter jejuni* : Public health hazards and potential control methods in poultry. *Vet. Med.* 49 (11): 441-446.
- Harris L.J., Flemming H.P., Klaenhammer T.R., Vederas J.C. et Stiles M.E. 1991.** Characterization of leucocin A-Val 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidium*. *J. Bacteriol.* 173: 7491-7500.
- Hasper H.E., Kruijff B. et Breukink E. 2004.** Assembly and stability of nisin-lipid II pores. *Biochem.* 43: 11567-11575.
- Hata A., Moller H.S., Stensballe A., Lindmark-Mansson H. et Karlsson A.H. 2010.** Effect of minor milk proteins in chymosin separated whey and casein fractions on cheese yield as determined by proteomics and multivariate data analysis. *J. Dairy Sci.* 91: 3787-3797.
- Heilig L.F., D'Ambrosia R., Drake A.L et Dellavalle R.P. 2005.** Inhibitory Effect of Metabolites from Probiotics *Lactobacillus acidophilus* Strains on Growth of Pathogenic Bacteria. *J. Pharmacol. and Toxicol.* 6: 533-540.

- Helander I.M., Von Wright A., Mattila-Sandholm T.M. 1997.** Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends. Food. Sci. Technol.* 8(5):146-50.
- Heleni S., Lefki P., Nikolaos T et Evanthia L.T. 2006.** Populations, types and biochemical activities of aerobic bacteria and lactic acid bacteria from the air of cheese factories. *Int. J. Dairy Technol.* vol. 59, no3, pp. 200-208.
- Heller Ana B. et Brosch Noah. 2001.** characterization of bacteriocin produced from *Lactobacillus plantarum*. *World J. Microbiol.* Vol. 2 (2), pp. 46-55.
- Herich R. et Levkut M., 2002.** Lactic acid bacteria, probiotics and immune system. *Vet. Med,* 47 (6) : 169-180.
- Hernandez L.H.H., Teshima S., Ishikawa M., Alam S., Koshio S. et Tanaka Y. 2005.** Dietary vitamin A requirements of juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquacult. Nutr.* 11: 3-9.
- Hirsch A., Grinsted E., Chapman H.R et Mattick A.T.R. 1951.** A note on the inhibition of an anaerobic sporeformer in Swiss-type cheese by a nisin-producing *Streptococcus*. *J. Dairy Res.* 18:205-6.
- Holzappel W.H., Haberer P., Geisen R., Björkroth J. et Schillinger U. 2001.** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73 (Suppl): 365-373.
- Holzappel W.H., Haberer P., Snel J., Schillinger U. et Huis in't Veld J.H. 1998.** Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 41: 85-101.
- Hoover DG., Dishart K.J. et Hermes M.A. 1989.** Antagonistic effect of *Pediococcus* spp. against *Listeria monocytogenes*. *Food Biotechnol.* 3: 183-96.
- Hosono A., Yastuki K. et Tokita F. 1977.** Isolation and characterization of an inhibitory substance against *E. coli* produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Milchwissenschaft.* 32: 727-730.
- Hotchkiss J.H., Chen J.H. et Lawless H.T. 1999.** Combined effects of carbon dioxide addition and barrier films on microbial and sensory changes in pasteurized milk. *J. Dairy Sci.* 82: 690-695.
- Huang L., Forsberg C.W. et Gibbins L.N. 1986.** Influence of external pH and fermentation products on *Clostridium acetobutylicum* intracellular pH and cellular distribution of fermented products. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 1230-1234.
- Hunter A. et Lawson A.W. 1984.** Continuous production of lactic acid from whey permeate by *Loctobacillus helveticus* in two chemostats in series. *Enzyme Microb. Technol.* 12:926.
- Hurst A. 1981 :** Nisin. *Adv. Appl. Microbiol.* 27: 85-123.
- J**acobsen T., Budde B.B. et Koch A.G. 2003. Application of *Leuconostoc carnosum* for biopreservation of cooked meat products. *J. Appl. Microbiol.* 95: 242-249.
- James S.M., Fannin S.L., Agee B.A., Gall B., Parker E., Vogt J., Run G., Williams J., Lieb L., Prendergast T., Werner S.B et Chin J. 1985.** Listeriosis outbreak associated with Mexican-style cheese-California. *Morbidity Mortality Weekly Report.* 34:357.
- Jaubert J. et Mourre V. 1996.** Growth of yeast contaminants in an immobilized lactic acid bacteria system. *Lett. Appl. Microbiol.* 8:207. p. 313-341.
- Jay M.J. 1982.** Antimicrobial properties of diacetyl. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 525–532.



- Jay M.J. 1986.** Modern Food Microbiology, *Fermented Foods And Related Products Of Fermentation*, 3<sup>th</sup> ed., Van Nostrand Reinhold Company, New York, New York. 239-255 and 362-406.
- Jay M.J. 1992.** Modern Microbiology, Van Nostrand Reinhold, 4th ed., New York. 371-409.
- Jay M.J. 1996.** Modern Food Microbiology, 5th Edition, Chapman and Hall, New York.
- Jeannes, R. 1980.** Composition and characteristics of goat milk: Review 1968-1979. *J. Dairy Sci.* 63: 1605-1630.
- Jeness, R. 1980.** Composition and characteristics of goat milk: Review 1968-1979. *J. Dairy Sci.* 63: 1605-1630.
- Jimenez-Diaz R., Ruiz-Barba J.L., Cathcart D.P., Holo H., Nes I.F., Sletten K.H et Warner P.J. 1995.** Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the activity of which depends on the complementary action of 2 peptides. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:44-59-63.
- Jinet A., Champagne C.P, Girard F. et Morin N. 1996.** Bacteriophage development in an immobilized lactic acid bacteria system. *Biotechnol. Lett.* 10:463.
- Joerger M.C et Klaenhammer T.R. 1986.** Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *J. Bacteriol.* 167:439-46.
- Joffin J.N. et Leyral G. 1996.** Microbiologie technique. Centre Régional de Documentation Pédagogique d'Aquitaine Bordeaux, France, pp. 219-223.
- Johnson J.L., Phelps C.F., Cummins C.S., London J. et Graser F. 1980.** Taxonomy of the *Acidophilus* Group. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30: 53-68.
- Jozala A.F., de Lencastre Novaes L.C., Cholewa O., Moraes D. et Penna T.C.V. 2005.** Increase of nisin production by *Lactococcus lactis* in different media. *Afr. J. Biotechnol.* 4: 3, 262-265.
- Juarez M et Ramnos M. 1986.** Physico-chemical characteristics of goat milk as distinct from those of cow milk. In: International Dairy Federation (Ed.), Proceedings of the IDF Seminar Production and Utilization of Ewe's and Goat's Milk, Bulletin No. 202. Athens, Greece, pp. 54-67.
- Juillard V. et Richard J. 1991.** Indirect interaction in milk between proteolytic and isogenic non proteolytic strains of *Lactococcus lactis*. II. Effect of pre-culturing by a proteolytic strain. *Lait*, 71: 55-64.
- Juillard V. et Richard J. 1994.** Mixed cultures in milk of a proteinase-positive and a proteinase-negative variant of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: influence of initial percentage of proteinase-positive cells on the growth parameters of each strain and on the rate of acidification. *Lait*. 74: 3-12.
- Juillard V. et Richard J. 1990.** Indirect interaction in milk between proteolytic and isogenic non proteolytic strains of *Lactococcus lactis*. I. Effect of pre-culturing by a non-proteolytic variant. *Lait*. 70: 425-438.
- Juillard V., Furlan S., Foucaud C. et Richard J. 1996.** Mixed cultures of proteinase-positive and proteinase-negative strains of *Lactococcus lactis* in milk. *J. Dairy Sci.* 79: 964-970.
- Juillard V., Spinnler M., Desmazeaud M.J. et Bouquien C.Y. 1987.** Phénomène de coopération et d'inhibition entre les bactéries lactiques utilisées en industrie laitière. *Lait* 67: 149-172.

- Juven Benjamin J et Pierson Merle D. 1996.** Antibacterial Effects of Hydrogen Peroxide and Methods for Its Detection and Quantitation. *J. Food Protection*. Volume 59, Number 11, November. pp. 1233-1241(9).
- Kalchayanand N., Hanilin M.B. et Ray B. 1992.** Sublethal injury makes Gram-negative and resistant Gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins pediocin AcH and nisin. *Lett. Appl. Microbiol.* 15: 239-243.
- Kalogridou-Vassiliadou D. 1991.** Mastitis-related pathogens in goat milk. *Small Rumin Res.* 4, 203–212.
- Kandler O. 1983.** Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 49: 209-224.
- Kandler O. et Weiss N. 1986.** Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901. In Bergey's manual of systematic bacteriology pp. 1209-1234. Edited by P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe et J. G. Holt. Baltimore: Williams et Wilkins.
- Kandler O. et Weiss N. 1986.** Genus *Lactobacillus*. In : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol 2, 9<sup>ième</sup> ed. Ed. Sneath PHA, Mair N.S., Sharpe M.E, Holt J.G. Williams and Wilkins, Baltimore USA.
- Karthikeyan V. et Santosh, S.W. 2009.** Isolation and partial characterization of bacteriocin produced from *Lactobacillus plantarum*. *Afr J Microbiol Res.* Vol. 3 (5), pp. 233-239.
- Kashket E.R. 1987.** Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiol. Rev.* 46: 233-244.
- Kask K., Gustafsson H., Gunnarsson A et Kindahl H. 1999.** Induction of parturition with prostaglandin F as a possible model to study impaired reproductive performance in the dairy cow. *Ani. Reprod. Sci.* 59: 2000 129–139.
- Kempler G.M. et Mc Kay L.L. 1980.** Genetic evidence for plasmid linked metabolism in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 37:1041-1043.
- Kihal M., Chekroun A., Bensoltane A., Kheroua O. et Saidi D. 1999.** Characterization of Algeria raw camel's milk: proteins content and native lactic acid bacteria, 1<sup>ères</sup> Journées sur la Recherche Cameline, 25 au 27 mai, ITAS, Ouargla.
- Kihal M., Prevost H., Lhotte M.E., Huang D.Q. et Divies C. 1996.** Instability of plasmid-encoded citrate permease in *Leuconostoc*. *J. Appl. Microbiol.* 22: 219-223.
- Klaenhammer T.R. 2000.** Probiotic bacteria : Today and tomorrow. *J. Nutr.*130: 415-416.
- Klaenhammer T.R., Fremaux C. et Hechard Y. 1993.** Activité antimicrobienne des bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques, tome 1. De Roissart. Ed Lavoisier.
- Klaenhammer TR. 1988.** Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie.* 70:337-49.
- Klaenhammer TR. 1993.** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12:39-85.
- Kleerebezem M. 2004.** Quorum sensing controls of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis. *Peptides.* 25: 1405-1414.
- Kleerebezem M. et Ouadri L.E. 2001.** Peptide pheromone-dependent regulation of antimicrobial peptide production in Gram-positive bacteria: a case of multicellular behavior. *Peptides.* 22: 1579-1596.

- Klein G. 2001.** International Committee of Systematic Bacteriology. Subcommittee on the Taxonomy of *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and Related Organisms. Minutes of the Meeting. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 259-261.
- Klein G., Pack A., Bonaparte C. et Reuter G. 1998.** Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 41: 103-125.
- Klein, S. et Kush G. 2004.** Diffusion in  $\kappa$ -carrageenan/locust bean gum gel beads with or without entrapped growing lactic acid bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* 38:1041.
- Kodama L.M. 1952.** Medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 26: 75-86.
- Kong S. et Davison A.J. 1980.** The role of interactions between O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, OH<sup>-</sup> and O<sub>2</sub> in free radical damage to biological systems. *Arch. Biochem. Biophys.* 204: 13-29.
- Kotelnikova E.A. et Gelfand M.S. 2002.** Bacteriocin Production by Gram-Positive Bacteria and the Mechanisms of Transcriptional Regulation. *Russian J. Genetics.* 38: 6, 628-641. Translated from *Genetika*, 38: 6, 758-772.
- Kulshrestha D.C. et Marth E.H. 1974.** Inhibition of bacteria by some volatile and non-volatile compounds associated with milk. I. *Escherichia coli*. *J. Milk Food Technol.* 37: 510-516.
- Lamontagne Michel Claud P., Champagne J., Reitz A., Sylvain M., Nancy G., Maryse L., Julie J. et Ismail F. (2002).** Microbiologie de lait. Science et technologie de lait. Ecole polytechnique de Montréal.
- Lancefield R.C. 1933.** A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* 57: 571-595.
- Lane C.N et Fox P.F. 1996.** Contribution of starter and added lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *Int Dairy. J.* 6: 715-728.
- Laouabdia-Sellami N., Ouzrout R. et Guetarni D. 2007.** Study of the leucocytic formula of milk in the ewes of race ouled-djellal in the east of Algeria. *Afr. J. Agr. Res.* 2(10), pp. 505-511.
- Larpent J.P. et larpent G.M. 1990.** Mémento technique de microbiologie 2<sup>ème</sup> Ed. Technique et documentaire lavoisier, Paris, P: 417.
- Larpent S.P. 1997.** Microbiologie alimentaire. Techniques de laboratoire. *Ed. Tech et Doc*, Lavoisier, Paris.
- Larsen A.G., Vogensen F.K et Josephsen J. 1993.** Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs: purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401. *J Appl. Bacteriol.* 75: 113-22.
- Larsen raúl F. et Añón maría C. 1989-1990.** Interaction of Antibiotics and Water Activity on *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Food Sci.* 54:4. p.922-924.
- Law J. et Haandrikman A. 1997.** Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 7: 1-11.
- Law J. et Kolstad A. 1988.** Proteolysis in relation to normal and accelerated cheese ripening. *Appl. Sci.* 1: 365-365.
- Le Mens P. 1985.** Le lait de chèvre : propriétés physico - chimiques, nutritionnelles et chimiques. In : Lait et produits laitiers, vache, chèvre, brebis, de la mamelle à la laiterie. Tome 2. Paris : *technique et documentation Lavoisier.* pp: 354-367.

- Lehto E.M et Salminen S. 1997.** Adhesion of two *Lactobacillus* strains, one *Lactococcus* and one Propionibacterium strains to cultured human intestinal Caco-2 cell line. *Biosci. Microflora*. 16: 15-17.
- Lenoir J; Veisseyre R et Choisy C. 1992.** Le lait réfrigéré, matière première de la fromagerie moderne. *Rev. Lait. franç.*, 322,453.
- Leveau K. et Bouix M. 1983.** Milk Coagulation and the Development of Cheese Texture. In: *Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*, Davies, F.L. and B.A. Law (Eds.). *Elsevier Applied Science Publishers Ltd.*, New York, USA.
- Lewis C.B., Kaiser A. et Montville T.J. 1991.** Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1683-1688.
- Leyral G et Vierling É. 2007.** Microbiologie et toxicologie des aliments : Hygiène et sécurité alimentaires. *Wolters Kluwer France*. p. 287.
- Liinska EA, Bevis H.E et Delves-Broughton J. 1997.** The use of the bacteriocin, nisin, as a preservative in ricotta-type cheeses to control the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* 24:343-6.
- Lilly D.M. et Stillwell R.H. 1965.** Probiotics. Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*. 147: 747-748.
- Lima E.T et Andreatti Filho R.L. 2005.** Bacteriocins: nomenclature, detection, mechanism of action and potential use in poultry production. *J. Food. Agri. Enviro.* 3 (2): 62-66.
- Lindgren S et Clevstrom G. 1978.** Antibacterial activity of lactic acid bacteria. 2. Activity in vegetable silages, Indonesian fermented foods and starter cultures. *Swed. J. Agric. Res* 8:67-73.
- Lindgren S.E. et Dobrogosz W.J. 1990.** Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Rev.* 87: 149-164.
- Lister J. 1873.** A further contribution to the natural history of bacteria and the germ theory of fermentative changes. *Quart. J. Microbiol. Sci.* 13:380-408.
- Liu W. et Hansen J.N. 1993.** The antimicrobial effect of a structural variant of subtilin against outgrowing *Bacillus cereus* T spores and vegetative cells occurs by different mechanisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 648-651.
- Lopez S. et Mayo B. 1994.** Identification and characterization of homofermentative mesophilic *Lactobacillus* isolates isolated from artisan starter-free cheeses. *Lett. Appl. Microbiol.* 25: 233-238.
- Lopez-Diaz T.M., Alonso C., Roman C., Garcia-Lopez M.L. et Moreno B. 2000.** Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. *Food Microbiol.* 17: 23-32.
- Luchansky J.B. 1999.** Overview on applications for bacteriocin producing lactic acid bacteria and their bacteriocins. *Antonie van Leeuwenhoek*. 76: 335-348.
- Magnusson J. et Schnürer J. 2001.** *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1-5.
- Magnusson J., Ström K., Roos S., Sjögren J. et Schnürer J. 2003.** Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Let.* 219: 129-135.



- Mahé S., Messing B., Thuillier F. et Tomé D. 1991.** Digestion of bovine milk proteins in patients with a high jejunostomy. *Am. J. Clin. Nutr.* 54. p: 534–538.
- Makras L., Falony G., Van der Meulen R et De Vuyst L. 2006.** Production of organic acids from fermentation of mannitol, fructooligosaccharides and inulin by a cholesterol removing *Lactobacillus acidophilus* strain' by M.T. Liong and N.P. J. *App. Microbiol.* 99: 783–793.
- Maldonado A., Ruiz-Barba J.L. et Jiménez-Díaz R. 2003.** Purification and Genetic Characterization of Plantaricin NC8, a Novel Coculture-Inducible Two-Peptide Bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* NC8. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1, 383-389.
- Malinen E. 2002.** Molecular methods for detection of probiotics in intestinal microbiota and evaluation of *Lactobacillus brevis* as a potential probiotic dietary adjunct. University of Helsinki.
- Mami A., Boumehira A.Z., Hamedi A.R., Henni J.E. et Kihal M. 2012.** Screening of autochthonous *Lactobacillus* species from Algerian raw goats' milk for the production of bacteriocin-like compounds against *Staphylococcus aureus*. *Afr. J. Biotechnol.* 11(20), pp. 4595-4607.
- Mami A., Henni J.E. et Kihal M. 2008.** Antimicrobial Activity of *Lactobacillus* Species Isolated from Algerian Raw Goat's Milk Against *Staphylococcus aureus*. *World J. Dairy and Food Sci.* 3 (2): 39-49.
- Marilley L. et Casey M.G. 2004.** Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *Int. J. Food. Microbiol.* 90: 139-159.
- Marroki A. 2010.** Caractérisation phénotypique et génotypique des souches de *lactobacillus* isolées du lait cru de chèvre et étude de leurs propriétés technologiques. Thèse de doctorat. Département de biologie, Faculté des sciences. Université d'oran.
- Marteau P. 2001.** Safety aspects of probiotic products. *Scand. J. Nutr.* 45: 8-12.
- Martinet J. et Houdebine L.M. 1993.** Biologie de la lactation, *INSERM/INRA*, Paris, 587p.
- Masle I. et Morgan F. 2001.** Aptitude du lait de chèvre à l'acidification par les ferments lactiques : facteurs de variation liés à la composition du lait. 81 : 561-569.
- Mataragas M., Metaxopoulos J., Galiotou M. et Drosinos E.H. 2003.** Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. *Meat Sci.* 64: 265-271.
- Mathara J.M., Schillinger U., Kutima P.M., Mbugua S.K. et Holzapfel W.H. 2004.** Isolation, identification and characterisation of the dominant microorganisms of *kule naoto*: the Maasai traditional fermented milk in Kenya. *Int. J. Food Microbiol.* 94: 3, 269-278.
- Mathur S. et Singh R. 2004.** Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria a review. *International J. Food Microbiol.* 105: 281– 295.
- Mayeux J., Sandine W. et Elliker P. 1962.** A selective medium for detecting *Leuconostoc* organisms in mixed strain starter cultures. *J. Dairy. Sci.* 45: 655-656.
- Mayra-Makinen A. et Bigret M. 1998.** Industrial use and production of lactic acid bacteria. In: Salminen S., Wright A. (Eds.), *Lactic Acid Bacteria Microbiology and Functional Aspects*. Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 73-102.
- Mc Auliffe O., Ross R.P et Hill C. 2001.** Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 285-308.
- Mc Kay L.L., Baldwin K.A. et Walsh P.M. 1980.** Conjugal transfer of genetic information in group N Streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 84-91.

- Meghrouh J., Lacroix C. et Simard R.E. 1999.** The effects on vegetative cells and spores of the three bacteriocins from lactic acid bacteria. *Food Microbiol.* 16: 105-114.
- Mijacovic S., Van Zeijl H.W et Nanver. L.K. 2001.** Electrical detection and simulation of stress in silicon nitride spacer technology. *J. Mater. Sci. Mater. Electron.* 12 339–41.
- Mikelsaar M. et Zilmer M. 2004.** *Lactobacillus fermentum* ME-3-an antimicrobial and antioxidative probiotic. *Micr. Ecol. Health Dis.* 1: 1–27.
- Moll G.N., Roberts G.C.K., Konings W.N. et Driessen A.J.M. 1996.** Mechanism of lantibiotic-induced pore-formation. *Antonie van Leeuwenhoek.* 69: 185-191.
- Montel M.C., Talon R., Fournaud J et Champomier M.C. 2005.** A Simplified Key for Identifying Homofermentative *Lactobacillus* and *Carnobacterium* spp. from meat. *J. Appl. Bacteriol.* 70: 469-472.
- Montville T.J. et Bruno M.E.C. 1994.** Evidence that dissipation of proton motive force is a common mechanism of action for bacteriocins and other antimicrobial proteins. *Int. J. Food Microbiol.* 24: 53-74.
- Moreno I., Lerayer A.L.S. et de Freitas Leitão M.F. 1999.** Detection and characterization of bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* strains. *Rev. Microbiol.* 30: 2-19,
- Morris J.G. 1976.** Oxygen and the obligate anaerobe. *J. Appl. Bacteriol.* 40: 229-244.
- Mota-Meira M., LaPointe G., Lacroix C. et Lavoie M.C. 2000.** MICs of mutacin BNY266, nisin A, vancomycin, and oxacillin against bacterid pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 1, 24-29.
- Mulders. J.W.M., Boerrieger I.J., Rollema H.S., Siezen R.J. et de Vos W.M. 1991.** Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. *Eur. J. Biochem.* 201: 581-584.
- Muriana P.M et Klaenhammer T.R. 1991.** Purification and partial characterization of lacticin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(1):114–121.
- N**annen N.L et Huntkins R.W. 1991. Proton-translocating adenosine triphosphatase activity in lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 74: 747-751.
- Naidu A., Riley D., Ravi K., Chaisuekul C. et Adkins S. 2006.** Genomics of probiotic lactic acid bacteria: impacts on functional foods. In *Bioprocesses and biotechnology for functional foods and nutraceuticals. Marcel Dekker, NY*, pp 63-78.
- Nauciel C et Vildé J.L. 2005.** Bactériologie médicale: Abrégés Connaissances et pratique. *Elsevier Masson. Paris.* pp : 257.
- Navarro L., Zarazaga M., Saenz J., Ruiz-Larrea F. et Torres C. 2000.** Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from Rioja red wines. *J. Appl. Microbiol.* 88: 44-51.
- Nedjraoui D. 2002.** Les ressources pastorales en Algérie.
- Nes I.F et Holo H. 2000.** Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers* 55:50-61.
- Nes I.F., Diep D.B., Håvarstein L.S., Brurberg M.B., Eijsink V.G.H. et Holo H. 1996.** Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Leeuwenhoek.* 70: 113-128.
- Nettles C.G. et Barefoot S.F. 1993.** Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. *J. Food Prot.* 56: 338-356.

- Neves A.R., Ramos A., Nunes M.C., Kleerebezem M., Hugenholtz J., de Vos WAL, Almeida J. et Santos. 1999.** In vivo nuclear magnetic resonance studies of glycolytic kinetics in *Lactococcus lactis*. *Biotechnology and Bioengineering*. 64: 200-212.
- Noonpakdee W., Santivarangkna C., Jumriangrit P., Sonomoto K. et Panyim S. 2003.** Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from nham, a traditional Thai fermented sausage. *Int. J. Food Microbiol.* 81: 137– 145.
- Orla-Jensen S. 1919.** The lactic acid bacteria. A.F. hostand son, Koenighichen Hof-Boghamdel, Copenhagen.
- Olasupo N.A., Olukoya D.K. et Odunfa S.A. 1996.** Studies on local strains of Amylolytic *Lactobacillus* from Nigerian fermented foods. *Int. J. Food. Res. Dev.* 40: 45-46.
- Ortu M., Kim J.W. et Rajagopal S.N. 2001.** Antibacterial activities of *Lactobacillus crispatus* ATCC 33820 and *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323. *J. Microbiol.* 39:146–148.
- Ott R., Vije T., Ten Brink B., Mont B. et Konings W.N. 1997.** Energy metabolism in *Streptococcus cremoris* during lactose starvation. *Archives of Microbiol.* 141: 348-352.
- Ouwehand A.C. 1998.** Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: Salminen, S. and Von Wright A. (Ed.), lactic acid bacteria: Microbiology and functional aspects, 2nd edition (edited by). *Marcel Dekker Inc*, New York. 139-159.
- Ouwehand A.C. et Vesterlund S. 2004.** 11 Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: Salminen S., Ouwehand A., Von Wright A. (eds.). *Lactic Acid Bacteria: Microbial and Functional Aspects*, 3rd ed. *Marcel Dekker, New York*. 375–395.
- Oyetayo V.O., Adetuyi F.C. et Akinyosoye F.A. 2003.** Safety and protective effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* used as probiotic agent *in vivo*. *Afr. J. Biotech.* 2: 448-452.
- Parente E., Ricciardi A. et Addario G. 1994.** Influence of pH on growth and bacteriocin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 140NWC during batch fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41: 388-394.
- Park E., Agee B.A., Gall B., Vogt J., Run G., Williams J., Lieb L. et Werner S.B. 1985.** Listeriosis outbreak associated with Mexican-style cheese-California. *Morbidity Mortality Weekly Report*. 34:357.
- Park E.Y., Anh P.N. et Okuda N. 1994.** Bioconversion of waste office paper to L (+) lactic acid by the filamentous fungus *Rhizopus oryzae*. *Bioresource Technol.* 93 : 77-83.
- Park E.Y., Kosakai Y. et Okabe M. 1986.** Efficient production of L(+) lactic acid using mycelial cotton-like flots of *Rhisopus oryzae* in an air-liftbioreactor. *Biotechnol. Prog.* 14: 699-704.
- Peláez S.M. et Martín O. 2009.** Bacteriocin production and sensitivity. *Folia Microbiol.* 49: 172–174.
- Pereira D.I.A., Mc Cartney A.L. et Gibson G.R. 2003.** An invitro study of the probiotic potential of a bile-salt-hydrolyzing of *Lactobacillus fermentum* strains, and determination of its chlesterol-lowering proprieties. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (8): 4743-4752.
- Perrin P., de Franco T., Jallet M., Fouque C., F., Morgeaux S., Tordo N. et Colle J.H. 1996.** Characterization of intestinal lactobacilli as putative probiotic candidates. *J. App Microbiol.* 94 : 403-412.

- Piard J.C. et Desmazeand M., 1991.** Inhibiting factors produced by lactic and bacteria part L. oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait*. 71: 525-541.
- Piard J.C., Delorme F., Giraffa G., Commissaire J. et Desmazeaud M.J. 1990.** Evidence for a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* CNRZ 481. *Neth. Milk Dairy J.* 44: 143-158.
- Podolak P.K., Zayas J.F., Kastner C.L. et Fung D.Y.C. 1996.** Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 on beef by application of organic acids. *J. Food Prot.* 59: 370-373.
- Prescott C.E., Hope G.D. et Blevins L.L. 2003.** Identification of newly isolated lactobacilli from stomach mucus of lamb. *Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae.* 55: 64-72.
- Prioult G. 2003 :** Effet des probiotiques sur l'induction et le maintien de la tolérance orale à la  $\beta$ -lactoglobuline chez la souris et étude de leurs mécanismes d'action .Thèse Ph.D. Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation. Université Laval, Québec, PQ, Canada.
- Pritchard G.G. et Coolbear T. 1993.** The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*12: 179-206.
- Pruitt K.M., Tenovuo J., Mansson-Rahemtulla B., Harrington P. et Baldone D.C. 1986.** Is thiocyanate peroxidation at equilibrium in vivo? *Biochim. Biophys. Acta.* 870: 385-391.
- Psono L., Kotzamanides C., Andrighetto C., Lombardi A., Tzanetakis N., Litopoulou-Tzanetaki E. 2006.** Genotypic and phenotypic heterogeneity in Enterococcus isolated from Batzos, a raw goat milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 109: 109-120.
- Raccach M., Mc Grath R. et Daftarian H. 1989.** Antibiosis of some lactic acid bacteria including *Lactobacillus acidophilus* toward *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 9: 25-32.
- Rajaram G., Manivasagan P., Gunasekaran U., Ramesh S., Ashokkumar S., Thilagavathi B. et Saravanakumar A. 2010.** Isolation, identification and characterization of bacteriocin from *Lactobacillus lactis* and its antimicrobial and cytotoxic properties. *Afr. J. Pharmacy and Pharmacol.* 4(12) : p. 895-902.
- Ramet J.P. 1993.** The Technology of Cheese from Camel Milk (*Camelus dromedarius*). *FAO Booklet Production and Animal Health*, Rome, Italy. p:118.
- Rampal M., Ouwehand A.C. et Vesterlund S. 2000.** Antimicrobial components from lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 57(1):114-121.
- Rao D.R., Reddy A.V., Pulusani S.R. et Cornwell P.E. 1984.** Biosynthesis and utilisation of folic acid and vitamin B<sub>12</sub> by lactic cultures in skim milk. *J. Dairy Sci.* 67: 1169-1174.
- Rauch P.J.G., Beerthuyzen M.M. et de Vos W.M. 1994.** Distribution and evolution of nisinsucrose elements in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1798-1804.
- Reeves PR. 1972.** The Bacteriocins. New York: *Springer-Verlag.* 142 p.
- Reisinger P., Seidel H., Tscheche H. et Hammes W.P., 1980.** The effect of nisin on murein synthesis. *Arch. Microbiol.* 127: 187-193.
- Reiter B. et Härnultv B.G. 1984.** Lactoperoxidase antibacterial systems: natural occurrence, biological functions and practical applications. *J. Food Prot.* 47: 724-732.
- Reque E.F., Pandey A., Franco S.G. et Soccol C.R. 2000.** Isolation, identification and physiological study of *Lactobacillus fermentum* lpb fot use as probiotic in chickens. *Braz. J. Microbiol.* Vol. 31, N° 4

- Richards R.M.E., Xing D.K.L. et King T.P. 1995.** Activity of *p*-aminobenzoic acid compared with other organic acids against selected bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 78: 209-215.
- Riley M.A. et Wertz J.E. 2002.** Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie.* 84: 357-364.
- Rodriguez E., Calzada J., Arquès J.L., Rodrigues J.M., Nunez M. et Medina M. 2005.** Antimicrobial activity of Pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157 :H7 in cheese. *Int. Dairy Jl.* 15: 51-57.
- Rodriguez J.M., Martínez M.I et Kok J. 2002.** Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 42: 91-121.
- Rogosa M., Wiseman R.F., Mitchel J.A., Disraely M.N. et Beaman A.J. 1953.** Species Differentiation of Oral Lactobacilli from man including descriptions of *Lactobacillus salivarius nov. spec.* and *L. cellobiosus nov spec.* *J. Bacteriol.* 65: 681-699.
- Roissard et Luquet. 1985.** Les bactéries lactiques édition Lorisa, volume 1, Luquet F. M, lait et produits laitiers, *Tec et Doc*, édition Lavoisier, Paris, p362-400-402.
- Rollema H.S., Kuipers O.P., Both P., de Vos W.M. et Siezen R.J. 1995 :** Improvement of solubility and stability of the antimicrobial peptide nisin by protein engineering. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2873-2878.
- Rose N.L., Sporns P et Mc Mullen L.M. 1999.** Detection of bacteriocins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2238-42.
- Ross A.G.P., Bartley P.B., Sleight A.C., Olds G.R., Li Y.S., Williams G.M. et Mc Manus D.P. 2002.** Schistosomiasis. *N. Engl. J. Med.* 346: 1212-1220.
- Ryan M.P., Rea M.C., Hill C et Ross R.P. 1996.** An application in cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 612-619.
- Sahl H.G., Bierbaum G. 1998.** Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 52:41-79.
- Sahl H.G., Jack R.W. et Bierbaum G. 1995.** Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique posttranslational modifications. *Eur. J. Biochem.* 230: 827-53.
- Sahl. H.G. et Bierbaum G. 1998.** Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 52: 41-79.
- Saidi N., Guessas B., Bensalah F., Badis A., Hadadji M., Henni D.E., Prevost H. et Kihal M. 2002.** Caractérisation des bactéries lactiques isolées du lait de chèvre des régions arides. *J. Alg. Reg. Arides.* 1: 1-11.
- Saidi N., Hadadji. et Guessas B. 2011.** Screening of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria Isolated from West Algerian Goat's Milk. *Global J. Biotechnol. Bioch.* 6 (3): 154-16.
- Saidi Noureddine. 2007.** La microflore lactique du lait cru de chèvre local : études, microbiologique, biochimique et génétique des bactéries lactiques d'intérêt bio-préservateur Thèse de Doctorat. Université d'Oran. 216 pp.
- Salminen S., Bouley M.C., Boutron-Rualt M.C., Cummings J., Franck A., Gibson G., Isolauri E., Moreau M.C., Roberfroid M. et Rowland I. 1998.** Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Brit. J. Nutr. Suppl.* 1: 147-171.

- Salminen S., Ouwehand A. et von Wright A. 2004.** Lactic Acid Bacteria: Microbial and Functional Aspects, 3rd ed. *Marcel Dekker*. New York. 375-395.
- Sambrook J., Fritsh E.F. et Maniatis T. 1986.** Molecular Cloning : A Laboratory Manual . Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2<sup>ème</sup> Edition, New York. p.96.
- Sanna V., Di Giacomo A., La Cava A., Lechler R.I., Fontana S., Zappacosta S. et Matarese G. 2002.** Bacteriophage-triggered defense systems: phage adaptation and design improvements. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4370-4376.
- Sanz B., Selgas D., Parejo I. et Ordóñez J.A. 1988.** Characteristics of lactobacilli isolated from dry fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 6: 199-205.
- Schillinger U. et Lücke F.K. 1987.** Identification of Lactobacilli from meat and meat products. *J. Food Microbiol.* 4: 199-208.
- Schillinger U. et Lücke K. 1989.** Antimicrobial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1901-1906.
- Schillinger U., Geisen R. et Holzapel W.H. 1996.** Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends Food Sci. Technol.* 7: 158-64.
- Schirch V., Hopkins S., Villar E. et Angelaccio S. 1985.** Serine hydroxymethyltransferase from *Escherichia coli*: purification and properties; *J. Bacteriol.* 163: 1-7.
- Schleifer K.H. et Kilpper-Balz R. 1987.** Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: a review. *Syst. Appl. Microbiol.* 10: 1-19.
- Schleifer K.H. et Ludwig W. 1995.** Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria. In *The genera of lactic acid bacteria*, Edited by B.J.B. Wood & W. H. Holzapel. London: *Blackie Academic and Professional*. pp. 7-18.
- Schnürer J. et Magnusson J. 2005.** Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Food Sc. Technol.* 16: 70-78.
- Schved F., Lalazar A., Lindner P. et Juven B.J. 1994.** Interaction of the bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* SJ-1 with the cell envelope of *Lactobacillus* spp. *Lett. Appl. Microbiol.* 19: 281-283.
- Schved, F.M., Lalazar, A., Henis, Y. et Juven B.J. 1993.** Purification, partial characterization and plasmid-linkage of pediocin S J- 1, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Appl. Bacteriol.* 74: 1, 67-77.
- Seifu L., Souza A.M.L., Lopes R.V., Nunes A.C et Nicoli R.J. 2007.** Comparison of antagonistic ability against enteropathogens by G+ and G- anaerobic dominant components of human fecal microbiota. *Folia Microbiol.* 51:141-145.
- Selmer-Olsen E. et Sorhaug T. 1998.** Comparative studies of the growth of *Lactobacillus plantarum* in whey supplemented with autolysate from brewery yeast biomass or commercial yeast extract. *Milchwissenschaft.* 53: 7. p: 367-370.
- Sharpe M.E. 1962.** Taxonomy of the Lactobacilli. *Dairy Sci. Abstracts.* 24: 109-118.
- Sheu C.W., Konings W.N. et Freese E. 1972.** Effects of acetate and other short-chain fatty acids on sugars and amino acid uptake of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 111: 525-530.
- Shihata A. et Shah N.P. 2000.** Proteolytic profiles of yogurt and probiotic bacteria. *Int. Dairy J.* 10: 401-408.



- Sholeva Z., Stefanova S. et Chipeva V. 1998.** Screening of antimicrobial activities among Bulgarian *lactobacilli* strains. *J. Culture Collections*. 2: 15-20.
- Siegmund H., Rechner K.B. et Jakobsen M. 2000.** Dynamic changes of intracellular pH in individual lactic acid bacterium cells in response to a rapid drop in extracellular pH. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2330-2335.
- Smith J.L. et Palumbo S.A. 1983.** Use of starter cultures in meats. *J. Food Prot.* 46: 11, 997-1006.
- Smith L. et Palumbo M. 1983.** De Bacterias Lacticas: Novel approaches for the development of lactic acid bacteria resistant to phages. Aniverario. *Technologia Lactea Latinoamericana*.7.
- Smulders F.J.M., Barendsen P., Van logtestijn J.G., Mossel D.A.A. et Van Der Marel G.M. 1986.** Review: Lactic acid: considerations in favor of its acceptance as a meat decontaminant. *J. Food Technol.* 21: 419-436.
- Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E. et Holt J.G. 1986.** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Sneath S. 1973.** Numerical Taxonomy Freeman and Company. San Francisco. 230-234.
- Somers S.T. et Taylor M. 1987.** Inhibitory efficacy of nisin and bacteriocins from *Lactobacillus* isolates against food spoilage and pathogenic organisms in model and food systems. *Food. Microbiol.* 22: 449-454.
- Sownd T., Nunes A.C et Hill C. 2005.** Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Food Microbiol.* 2:150-162.
- Spelhaug S.R et Harlander S.K. 1989.** Inhibition of foodborne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*. *J. Food Prot.* 52:856-62.
- Stackebrandt E. et Goebel B.M. 1994.** Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 846-849.
- Stackebrandt E. et Teuber M. 1988.** Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochimie.* 70: 317-324.
- Stamer J.R. 1976.** Lactic Acid Bacteria, Defigueiredo M.P. and Splittstoesser D.F., Eds., *Food Microbiology; Public Health and Spoilage Aspects*, AVI Publishing Co. Inc., Westport, Connecticut. 404-426.
- Stevens K.A., Sheldon B.W., Klapes N.A et Klaenhammer T.R. 1991.** Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria. *Appl. Environ Microbiol.* 57:3612-5.
- Stiles M.E. 1996.** Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Leeuwenhoek.* 70: 331-345.
- Stiles M.E. et Holzapfel W.H. 1997.** Review article Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36: 1-29.
- Strompfová V. et Lauková A. 2004.** Antibiotic Resistance of Lactic Acid Bacteria from Canine Faeces. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 48: 215-218.
- Suvarna V. et Boby V.U. 2005.** Probiotics in human health: A current assessment. *Current. Sci.* 88, 10, 11.
- Tagg J.R., Dajani A.S. et Wannamaker L.W. 1976.** Bacteriocins of Gram-positive bacteria, *Bacteriol. Rev.* 40: 722-756.

- Taheri H., Fatemeh T., Hossein M., Mojtaba Z., Mahmood S. et Parvin S. 2009.** Potential probiotic of *Lactobacillus johnsonii* LT171 for chicken nutrition. *Afr. J. Biotechnol.* 8(21). p: 5833-5837.
- Talarico T.L. et Dobrogosz W.J 1989.** Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 674-679.
- Talarico T.L., Casas I.A., Chung T.C. et Dobrogosz W.J. 1988.** Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 1854-1858.
- Tamime A.Y. 1990.** Microbiology of starter cultures. In: Robinson, R. K. (Ed), Dairy Microbiology, vol. 2. *Elsevier, London.* pp. 131- 201.
- Taylor M.J., Bandi C. et Hoerauf A. 2005.** Wolbachia bacterial endosymbionts of filarial nematodes. *Adv in Parasitol.* 60: 245-284.
- Teuber M. et Lembke J. 1983.** The bacteriophages of lactic acid bacteria with emphasis on genetic aspects of group N lactic streptococci. *J. Microbiol. Serol.* 49: 283-295.
- Thomas T.D. 1973.** Agar medium for differentiation of *Streptococcus cremoris* from the other bacteria. *NZJ. Dairy. Sci. Technol.* 8: 70-71.
- Thompson J. et Torchia., D.A. 1984.** Use of <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance spectroscopy and <sup>14</sup>C fluorography in studies of glycolysis and regulation of pyruvate kinase in *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 158: 791–800.
- Thonart P. et Hilgsmann S. 2009.** Identification of newly isolated lactobacilli from stomach mucus of lamb. *Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae.* 55: 64-72.
- Todorov S.D. et Dicks L.M.T. 2005.** Production of bacteriocin ST33LD, produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, as recorded in the presence of different medium components. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21: 1585-1590.
- Todorov S.D., van Reenen C.A et Dicks L.M. 2004.** Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST13BR, a strain isolated from barely beer. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 50: 149-157.
- Topisirovic L., Milan k., Djordje f., Natasa G., Ivana S et jelena L. 2006.** Potentil of lactic acid bacteria isolated from specific naturel niched in food production and preservation. *Int. J. food Microbiol.* 112: 230-235
- V**alle J., Gomez- Lucia E., Piriz S., Goyache J., Orden J.A. et Vadillo S. 1990. Enterotoxin production by staphylococci isolated from healthy goats. *Appl. Env. Microbiol.* 56: 1323-1326.
- Van Den Hooven H.W., Sponk C.A.E.M., Van De Camp M., Konings R.N.H., Hilbers C.W. et Van Den Ven F.J.M. 1996.** Surface location and orientation of the lantibiotic nisin bound to membrane-mimicking micelles of dodecylphosphocholine and of sodium dodecylsulphate. *Eur. J. Biochem.* 235: 394-403.
- Vassiliadou K., Monolkidis D. et Tsigoida A.1991.** Somatic cell count in relation to infection status of goat udder. *J. Dairy Res.* 159: 21-28.
- Vermeiren L., Devlieghere F. et Debevere J. 2004.** Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 96: 149-164.



- Vescovo K., Javorský P., Nemcová R., Kopečný J. et Boda K. 1982. Occurrence of conjugative amyolytic activity in rumen *Lactobacilli*. Elsevier. 144, Issue 1. p : 53–57.
- Vollenweider L., Zarazaga M., Saenz J., Ruiz-Larrea F. et Torres C. 2000. Bacteriocin production by lactic acid isolated from rioja red wines. *J. Appl. Microbiol.* 21: 305-314.
- W**agner M.K. et Moberg L.J. 1989. Present and future use of traditional antimicrobials. *Food Technol.* 1: 143-147.
- Walsh M.C., Gardiner G.E., Hart O.M., Lawlor P.G., Daly M., Lynch B., Richert B.T., Radcliffe S., Giblin L., Hill C., Fitzgerald G.F., Stanton C. et Ross P. 2008. Predominance of bacteriocin-producing *Lactobacillus salivarius* component of a faecal strain probiotic in the porcine ileum and effects on host immune phenotype, *FEMS Microbiol. Ecol.* 64: 317–327.
- West C.A. et Warner P.J. 1985. Plasmid Profiles and Transfer of Plasmid-Encoded. Antibiotic Resistance in *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, Nov. 1985, p. 1319-1321.
- Who 1974. Toxicological evaluation of some food additives including anticaking agents, antimicrobials, antioxidants, emulsifiers and thickening agents. *WHO Food Additives.* 5: 461-465.
- Wilson A.R., Sigeo D. et Epton H.A.S. 2005. Anti-bacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strain SK1 against *Listeria monocytogenes* is due to lactic acid production. *J. Appl. Microbiol.* 99: 1516-1522.
- Winkowski. K et Ludescher R.D. 1995. Models and Mechanisms for Bacteriocin Action and Application. *Int Dairy. J.* 5: 797-814.
- Wong H.C. et Chen Y.L. 1988. Effects of lactic acid bacteria and organic acids on growth and germination of *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2179-2184.
- Woolford M.K. 1975. Microbiological screening of food preservatives, cold sterilants and specific antimicrobial agents as potential silage additives. *J. Sci. Food Agric.* 26: 229-237.
- Wouters J.T.M., Ayad E.H.E., Hugenholtz J. et Smit G. 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *Int. J.* 12: 91-109.
- X**anthopoulos V., Litopoulou-Tzanetaki E et Tzanetakis N. 1997. In vitro study of *Lactobacillus* species strains on bile tolerance and cholesterol removal, in *Lactic Acid Bacteria – Lactic 97*. Caen, Presses Universitaires de Caen. France.
- Y**ang G Z., 2000. Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: structure and properties. Academic Dissertation. Faculty of Agriculture and Forestry of the University of Helsinki, Department of Food Technology, University of Helsinki 24:227-38. MS 200205
- Yu W., Gillies K., Kondo J.K., Broadbent J.R. et Mc Kay L.L. 1996. Loss of plasmid-mediated oligopeptide transport system in Lactococci: another reason for slow milk coagulation. *Plasmid*, 35: 145-155.
- Z**hennai Y. 2000. Antimicrobial compounds and Extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: structures and properties. Academic Dissertation. *Department of Food Technology*, University of Helsinki. 61p.

- Zhou J.S., Pillidge C.G., Gopal P. K. et Gill H.S. 2005.** Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Inter. J. Food Microbiol.* 98 : 211-217.
- Zottola E.A., Yezzi T.L., Ajao D.B. et Roberts R.F. 1994.** Utilization of cheddar cheese containing nisin as an antimicrobial agent in other foods. *Int. J. Food Microbiol.* 24: 227-38. MS 20020567.
- Zourari A., Accolas J.P. et Desmazeaud M.J. 1992.** Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria. *A review. Lait.* 72: 1-34.

## ANNEXE

### Milieu MRS (De Man, Rogosa and Sharpe, 1960)

|                                 |         |
|---------------------------------|---------|
| Extrait de levure               | 5 g     |
| Extrait de viande               | 10 g    |
| Peptone                         | 10 g    |
| Acétate de sodium               | 5 g     |
| Citrate de sodium               | 2 g     |
| Glucose                         | 20 g    |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 2 g     |
| MgSO <sub>4</sub>               | 0,25 g  |
| MnSO <sub>4</sub>               | 0,05 g  |
| Cystéine-HCl                    | 0,5 g   |
| Eau distillée                   | 1000 ml |
| pH =6,8                         |         |
| Autoclavage 120°C, 20 min       |         |

### Milieu MRS-BCP Sans Extrait De Viande

|                                 |          |
|---------------------------------|----------|
| Extrait de levure               | 5 g      |
| Extrait de viande               | 10 g     |
| Peptone                         | 10 g     |
| Acétate de sodium               | 5 g      |
| Citrate de sodium               | 2 g      |
| Glucose                         | 20 g     |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 2 g      |
| MgSO <sub>4</sub>               | 0,25 g   |
| MnSO <sub>4</sub>               | 0,05 g   |
| Pourpre de bromocrésol          | 0,025 mg |
| Eau distillée                   | 1000 ml  |
| pH =6,8                         |          |
| Autoclavage 120°C, 20 min       |          |

### Milieu KMK (Kempler et Mc Kay, 1980)

|                   |         |
|-------------------|---------|
| Extrait de levure | 3 g     |
| Biopolytone       | 2,5 g   |
| Glucose           | 5 g     |
| Eau distillée qsp | 1000 ml |
| pH=6.6            |         |

Le milieu est réparti à raison de 100 ml par flacon, puis autoclavé (121°C, 15mn). Au moment de l'emploi, 1 ml d'une solution aqueuse de ferricyanide de potassium 10 % (p/v) et 1 ml d'une solution aqueuse à 2.5 % (p/v) de citrate ferrique et citrate de sodium (p/p) sont ajoutés. Ces solutions sont stérilisées par filtration (millipores 0.22 µm) et sont conservées à l'obscurité à +4°C.

**Milieu M16 BCP (Thomas, 1973)**

|                            |         |
|----------------------------|---------|
| Extrait de levure          | 2,5 g   |
| Extrait de viande          | 5 g     |
| Lactose                    | 2 g     |
| Biopolytone                | 5 g     |
| Peptone papainique de soja | 5 g     |
| Acide ascorbique           | 0,5 g   |
| Acétate de sodium          | 1,8 g   |
| L-Arginine                 | 4 g     |
| Pourpre de bromocrésol     | 0,05 g  |
| Agar                       | 10 g    |
| Eau distillée qsp          | 1000 ml |
| pH 6,5                     |         |
| Autoclavage 120°C, 20 min  |         |

**Milieu MSE (Mayeux, Sandine et Elliker, 1962)**

|                           |         |
|---------------------------|---------|
| Tryptone                  | 10 g    |
| Extrait de levure         | 5 g     |
| Saccharose                | 100 g   |
| Citrate de sodium         | 1 g     |
| Glucose                   | 5 g     |
| Gélatine                  | 2,5 g   |
| Azothydrate de sodium     | 0,075 g |
| Eau distillée qsp         | 1000 ml |
| pH 6,5                    |         |
| Autoclavage 120°C, 20 min |         |

**Milieu Chapman**

|                         |        |
|-------------------------|--------|
| Peptone                 | 10g    |
| Extrait de viande       | 1g     |
| Chlorure de sodium      | 75g    |
| Mannitol                | 10g    |
| Rouge de phenol         | 0.025g |
| Agar                    | 15g    |
| pH 7.4                  |        |
| Autoclave 120° C, 20min |        |

**Milieu Mueller-Hinton (Mueller et Hinton, 1941)**

|                            |                      |
|----------------------------|----------------------|
| Infusion de viande de bœuf | 3000 cm <sup>3</sup> |
| Peptone de caséine         | 17,5 g               |
| Amidon de maïs             | 1,5 g                |
| Agar-agar                  | 17 g                 |
| pH=7.4                     |                      |
| Autoclavage 120°C, 20 min  |                      |

**Bouillon nutritif**

|                           |     |
|---------------------------|-----|
| EXTRAIT DE VIANDE         | 1 g |
| EXTRAIT DE LEVURE         | 2 g |
| PEPTONE                   | 5 g |
| CHLORURE DE SODIUM        | 5 g |
| pH =7.4                   |     |
| Autoclavage 120°C, 20 min |     |

**Gélose nutritive**

|                           |      |
|---------------------------|------|
| EXTRAIT DE VIANDE         | 1 g  |
| EXTRAIT DE LEVURE         | 2 g  |
| PEPTONE                   | 5 g  |
| CHLORURE DE SODIUM        | 5 g  |
| AGAR                      | 15 g |
| pH =7.4                   |      |
| Autoclavage 120°C, 20 min |      |

**Eau physiologique**

|  |         |
|--|---------|
| Chlorure de sodium                     | 8,5 g   |
| PEPTONE                                | 0,5 g   |
| EAU DISTILLEE                          | 1000 ml |
| pH =7                                  |         |
| AUTOCLAVAGE : 120° C PENDANT 20 MINUTE |         |

**Lait écrémé**

|                           |        |
|---------------------------|--------|
| LAIT ECREME               | 10 g   |
| EXTRAIT DE LEVURE         | 0.5 g  |
| Eau distillée             | 100 ml |
| pH =7                     |        |
| Autoclavage 120°C, 20 min |        |

**MILIEU M17 (TERZAGHI ET SANDINE, 1975)**

|                            |         |
|----------------------------|---------|
| Peptone de caséine         | 10 g    |
| PEPTONE PEPSIQUE DE VIANDE | 2,5 g   |
| PEPTONE PAPAÏNE DE SOJA    | 5 g     |
| Extrait de levure          | 2,5 g   |
| EXTRAIT DE VIANDE          | 5 g     |
| B-GLYCEROPHOSPHATE         | 19 g    |
| MGSO4                      | 0,25 G  |
| LACTOSE                    | 5 g     |
| ACIDE ASCORBIQUE           | 0,5 g   |
| AGAR-AGAR                  | 20 g    |
| EAU DISTILLEE              | 1000 ML |
| pH=7.2                     |         |
| Autoclavage 120°C, 20 min  |         |

**Eau peptonée**

PEPTONE EXEMPLE D'INDOLE 10 g  
CHLORURE DE SODIUM 5 g  
pH=7.2  
Autoclavage 120°C, 20 min

**Tampon phosphate de sodium**

Solution (a): 27,8 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  dans 100ml d'eau distillée  
Solution (b): 53,65g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 7  $\text{H}_2\text{O}$  dans 100ml d'eau distillée  
Tampon 0,1 M: 39ml (a) + 61 ml (b) + eau distillée  
Stérilisation à 110° pendant 20mn

Tous les milieux sont stérilisés par autoclavage à 121°C pendant 20mn sauf ceux contenant le lait (110° C pendant 10 min).