Liste des abréviations :

% : Pourcentage

°D : Degré dornic

ADH : Arginine déhydrolase

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

ATCC: American type cultures collection

ATP: Adénosine triphosphate

C° : Degré Celsius

Co_2 : Dioxyde de carbone

EMP : Embden Meyerhoff Parnas

EPS : Exopolysaccharides

FBA : Fructose 1-6 phosphate aldolase

Fe^{3+} : ion de manganèse

GC% : Pourcentage guanine +cytosine

h : Heure

H_2O :Hydroxyde d'hydrogène

H_2O_2 : Dioxyde de carbone

kDa : kilo Dalton

L.: *Listeria*

LAB: Lactic Acid Bacteria

Lb. : *Lactobacillus*

LDH : Lactate déhydrogénase

Ln. *: Leuconostoc*

mg: milligramme

Mg^{2+} : ion, de magnésium

MH : Muller Hinton

ml: milliliter

MRS BCP: Man Rogosa Sharp additioné de pourpre de bromocrésol

MRS : Man Rogosa Sharp

MSE : Mayeux sandine er Eliker

N : Normalité

NA : Norme algérienne

NaCl : chlorure de sodium

Nm : nanomètre

PEP : phosphoénolpyruvate

pH : Potentiel d'hydrogène

PM : Poids moléculaire

PTS :systéme phosphatraférase PEP-dépendant

Rpm : Rotation par minute

Stap. *Staphylococcus*

T° Température

UFC :Unité formant colonie.

V : Volume

µg: microgramme

µl : microlitre

Liste des figures :

Figure 1:la carte des effectifs camelins et leur répartition en Algérie……10

Figure 2: la répartition géographique des populations camelines en Algérie…….....11

Figure3: Observation des bactéries lactiques au microscope électronique à transmission(x10000)……18

Figure4: Arbre phylogénique des bactéries lactiques et comparaison avec les genres

Aerococcus, Bacillus, Listeria et *Staphylococcus*……*23*

Figure5: Images de *Leuconostoc*……*33*

Figure6: Arbre montrant les relations phylogénétiques entre les espèces de *leuconostoc* selon leur séquence 16S rDNA……...37

Figure7: Schéma simplifié du cométabolisme sucre-citrate de *Leuconostoc mesenteroides...38*

Figure8: Alignement de séquences peptidiques des bactériocines produites par *Leuconostoc* sp……44

Figure 9 : Schéma résumant la méthode utilisée pour l'isolement et la purification des souches……..52

Figure10: Schéma de conservation courte durée des bactéries lactiques purifiées……55

Figure11: Schéma de conservation longue durée des bactéries lactiques purifiées ……56

Figure12: schéma de la plaque d'Elisa utilisée pour les tests de fermentation des sucres…..60

Figure13: schéma explique les étapes de la méthode directe de l'interaction bactérienne ….63

Figure14: schéma explique les étapes de la méthode indirecte de l'interaction bactérienne...65

Figure 15: Présentation de l'installation type d'un titrage……69

Figure16: Aspect macroscopique des cultures bactériennes (*Leuconostocs*) ensemencée en profondeur avec MRSv……72

Figur17:L'aspect macroscopique des souchesV2 et M5 sur le milieu MRS (ensemencé en surface)……..73

Figure18: Aspect de souche pure V4 sur MRS liquide……73

Figure19:L'observation microscopique des cellules bactériennes (*Leuconostoc*) après fixation (Coloration de *Gram*) **(Gx1000)...**……74

Figure 20 : Type fermentaire des isolats (*Leuconostoc*) sur milieu MRS liquide glucosé contenant la cloche de Durham. Incubées à 30°C/24h. ……..75

Figure 21: Type fermentaire des isolats (*Leuconostoc*) sur milieu lait UHT…….76

Figure 22: test de l'hydrolyse de l'arginine……77

Figure 23: L'aspect de colonies productrices de dextrane par les souches *M7* et *V5* sur milieu MSE……..78

Figure24: la révélation de l'hydrolyse de l'esculine par nos souches isolées de lait de chamelle et lait de chèvre……79

Figure25: l'utilisation de citrate révèle par les colonies bleues sur le milieu KMK de nos isolas……80

Figure26:test de production d'acétoine……..81

Figure27: Le profil fermentaires des isolats effectué sur une galerie classique et sur plaque d'Elisa.. ……84

Figure28: L'absence de l'activité protéolytique reflétée par l'absence des zones de protéolyse autour des puits sur la gélose au lait……..85

Figure29 : L'absence des zones de lipolyse autour des puits sur la gélose nutritive au Tween80...……..85

Figure 30: Résultats du test de l'activité antibactérienne des *Leuconostoc mesenteroides* contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923……...…….86

Figure 31: Résultats du test de l'activité antibactérienne des candidats *Leuconostoc mesenteroides* contre *Escherichia coli* ATCC 25922…….……86

Figure 32: Résultats du test de l'activité antibactérienne des *Leuconostoc mesenteroides* contre *Listeria innocua* ATCC33090……87

Figure 33: Résultats du test de l'activité antibactérienne des *Leuconostoc mesenteroides* contre *Listeria ivanovii* ATCC 19119……87

Figure 34: Résultats du test d'interaction bactérienne positive de *Lactobacillus sp* 58 et *Leuconostoc mesenteroides*……..…88

Figure 35: Résultats du test d'interaction bactérienne positive de *Lactobacillus sp* 68 et *Leuconostoc mesenteroides*……...88

Figure 36: Résultats du test de l'activité antibactérienne (*methode indirecte*) des *Leuconostoc mesenteroides* contre *Staphylococcus aureus*……..*89*

Figure 37: Résultats du test de l'activité antibactérienne (*methode indirecte*) des *Leuconostoc mesenteroides* contre *E.coli*……*90*

Figure 38: Résultats du test de l'activité antibactérienne (*methode indirecte*) des *Leuconostoc mesenteroides* contre *Listeria ivanovii*……*90*

Figure 39 : Résultats du test de l'activité antibactérienne (*méthode indirecte*) des *Leuconostoc mesenteroides* contre *Listeria innocua*……*90*

Figure40: Test des phages pour les souches *M5*et*V2*. (Absence des plages de lyse)…….91

Figure 41: Sensibilité des surnageants aux protéases ……...…..92

Figure 42: Thermosensibilité des surnageants des isolats *V1, V2, V3 et M9, M5et M8...* ….93

Figure43 : Effet des solvants organiques **……94**

Figure 44: Evolution de pH chez les souches*V1, M9* et *Lb58* en culture pure et *V1+Lb58* et *M9+Lb58* en culture mixte ……96

Figure45 : Evolution de pH chez les souches*V1, M9* et *Lb68* en culture pure et *V1+Lb68* et M9+Lb68en culture mixte……..97

Figure46 : Evolution de pH chez les souches*V1, M9* et *E.coli* en culture pure et *V1+E.coli* et *M9+E.coli* en culture mixte……97

Figure47 : Evolution de pH chez les souches*V1, M9* et *LV* en culture pure et *V1+LV* et *M9+LV* en culture mixte…….98

Figure48: Evolution de pH chez les souches*V1, M9* et LI en culture pure et *V1+LI* et *M9+LI* en culture mixte……98

Figure 49: Evolution de pH chez les souches*V1, M9* et *Stap*. en culture pure et *V1+ Stap* et *M9+ Stap* en culture mixte……99

Figure50 : Cinétique d'évolution de l'acidité Dornic chez les souches *M9,V1,Lb58,Lb68, Stap, LI, LV* et *E.coli* en culture pure……...99

Figure51 : Cinétique d'évolution de l'acidité Dornic chez les souches *Lb58, Lb68, Stap, LI, LV* et *E.coli* en culture mixte avec *M9*……..100

Figure52 : Cinétique d'évolution de l'acidité Dornic chez les souches *Lb58,Lb68, Stap, LI, LV* et *E.coli* en culture mixte avec *V1*……100

Figure53 : Suivie cinétique des souches *M9* et *Stap*. en culture pure et culture mixte ……103

Figure54 : Suivie cinétique des souches M9 et *E.coli* en culture pure et culture mixte …...103

Figure55 : Suivie cinétique des souches *M9* et *LI*. en culture pure et culture mixte ……104

Figure56 : Suivie cinétique des souches *M9* et *LV*. en culture pure et culture mixte...……104

Figure57 : Suivie cinétique des souches *V1* et *Stap*. en culture pure et culture mixte …….105

Figure58: Suivie cinétique des souches *V1* et *E.coli* en culture pure et culture mixte …….105

Figure59: Suivie cinétique des souches *V1* et *LI.* en culture pure et culture mixte……...106

Figure60: Suivie cinétique des souches *V1* et *LV*. en culture pure et culture mixte…….106

Liste des tableaux :

Tableau1: Caractéristiques biométriques de quelques populations en Algérie……..…..*4*

Tableau2: Caractéristiques zootechniques de quelques populations en Algérie……..……..*5*

Tableau 3 : Composition chimique du lait de chèvre ..……6

Tableau 4: Composition minérale moyenne du lait de chèvre d'après (Eléments minéraux majeurs en mg par litre)……..……8

Tableau5: Composition minérale moyenne du lait de chèvre (Principaux oligo-éléments indispensables en µg par litre)……..……..8

Tableau6: Composition vitaminiques de lait de chèvre (pour 100g)……9

Tableau7: Indication sur la variation de la composition chimique du lait camelin (g/Kg)…13

Tableau 8: Composition moyenne en acide gras des laits de chamelle**……14**

Tableau9: Composition en sels minéraux (mg/l) du lait de chamelle……15

Tableau10: Composition en vitamines (µg/Kg) du lait de chamelle……...16

Tableau11: Caractéristiques de quelques bactéries lactiques……21

Tableau 12: Exemples d'application des bactéries lactiques productrices de bactériocine dans différents produits alimentaire……30

Tableau 13 : tests évaluant l'innocuité des bactéries lactiques probiotiques……32

Tableau14: Principales caractéristiques physiologiques et biochimiques de quelques espèces de *Leuconostoc* ……..……..*35*

Tableau15 : Bactériocines produites par des bactéries du genre *Leuconostoc*……45

Tableau16: Les caractéristiques physiologiques et biochimiques des souches de *Leuconostoc* isolées.....82

Tableau17: le profil fermentaire des 15 souches isolées……83

Tableau 18: Les diamètres des zones d'inhibition de la croissance des bactéries indicatrices……89

Tableau19: Diamètres des zones d'inhibition (mm) suite à la diffusion sur puits en gélose..91

Rapport-Gratuit.com

Tableau20: Caractérisation de l'agent inhibiteur produit par les isolas test……...94

Tableau21 : résultats d'acidité et de la production d'acide lactique dans le lait écrémé par les souches pathogènes et/ ou d'altérations en culture pure et mixte…….95

Tableau22: Résultats d'acidité et de la production d'acide lactique dans le lait écrémé par les souches lactiques *Lb58* et *Lb68* en culture pure et mixte……96

Tableau23: Cinétique de croissance en culture pure……..101

Tableau24: Cinétique de croissance en culture mixte……...102

Résumé :

Les bactéries lactiques ont acquis une grande importance par leur présence dans l'industrie agro-alimentaire et ce depuis longtemps. Elles assurent des caractéristiques particulières telles que l'arôme, la texture et une bonne sécurité alimentaire grâce aux acides organiques produits qui abaissent le pH dans le milieu.

La synthèse de bactériocines permet aussi le renforcement de la conservation des produits alimentaires contenant les bactéries lactiques.

Le genre *Leuconostoc* était ciblé dans notre isolement à partir de lait cru de chamelle et de chèvre.

Après une purification, les souches ont subi des tests biochimiques et physiologiques différents qui ont abouti a l'identification de deux sous espèces :*Ln. mesenteroides* subsp *dextranicum* et *Ln. mesenteroides* subsp *mesenteroides, tandis que* les résultats de l'évaluation des aptitudes technologiques indiquent que l'ensemble des souches ne présentent pas un bon pouvoir lipolytique ni protéolytique, mais l'étude des interactions entre les bactéries lactiques(*Ln. mesenteroides* et *Lb. plantarum*) a révélé une interaction positive qui se caractérise par La symbiose entre les deux qui a permis l'idée d'utiliser les deux espèces ensemble dans l'industrie alimentaire. Alors que l'activité antibactérienne qui a été réalisé à l'encontre de 4 souches pathogènes ou altérantes : (*Listeria inocoua* ATCC 33090 et *Listeria ivanovii* ATCC19119, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922) nous a permis de sélectionner parmi 15 isolats 6 candidats ayant un potentiel antagoniste envers les bactéries pathogènes après une élimination de l'effet de l'acide lactique, de peroxyde et la révélation de la nature protéique de la substance antibactérienne (bactériocine). A la présence des isolats les plus performants (M9 et V1) on a réalisée un suivie cinétique d'acidification et de la croissance en culture pure et mixte dans le milieu lait. L'étude de ces caractéristiques biotechnologiques ont conduit à la possibilité d'exploiter les potentialités de ce genre pour développer un levain lactique local capable de lutter contre les germes indésirables.

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

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Abstract:

Lactic acid bacteria have acquired great importance by their presence in the agri-food industry since quite a long time. They offer special features such as the aroma, texture and a good food security through organic products acid's which have lower pH in the middle. The synthesis of bacteriocins also allows the strengthening of food of conservation products containing lactic acid bacteria.

The genus Leuconostoc was targeted in our isolation from raw camel milk and goat's. After purification, the strains have been subjected to physiological and biochemical different tests which were successful. Characterization had to the identification of two species: *Ln. mesenteroides subsp. mesenteroides* and *Ln. mesenteroides subsp. dextranicum*, while technological characterization skills assessment results indicate that all strains don't have r proteolytic or lipolytic, but the study of the interactions between lactic acid bacteria (*Ln. mesenteroides* and *lb. plantarum*) revealed a positive interaction that is characterized by the symbiosis between the two strains that allowed the idea to use the two species together in the food industry. While the antibacterial activity which was directed against 4 pathogenic strains or alterative: (*Listeria inocoua* ATCC 33090 and *Listeria ivanovii* ATCC19119, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922) allowed us to select among 15 isolates 6 candidates with antagonistic potential towards pathogens after elimination of the effect of lactic acid, peroxide and the revelation of the proteinaceous nature of the antibacterial substance (bacteriocin).

At the presence of the best-performing isolates (*M9* and *V1*) kinetic study milk has been carried out followed by acidification and growth in pure and mixed culture. The studies of these biotechnological characteristics have led to the opportunity to exploit the potential of these strains to develop a local starter capable of inhibiting unwanted germ's growth.

Keywords: *Leuconostoc mesenteroides*, camel milk, goat's milk, antimicrobial effect, biotech features, bacteriocins, lactic acid.

ملخص

اكتسبت بكتيريا حمض اللاكتيك مند القدم أهمية كبيرة من خلال استخدامها في المصانع الغذائية, كما أنها تساعد على الحصول على عدة خصائص مميزة كالرائحة ,الملمس, و الأمن ألغدائي الجيد الذي يعود إلى الأحماض العضوية التي تنتجها هده الأخيرة حيث تعمل على خفض درجة حموضة الوسط (المادة الغذائية) بالإضافة إلى إفراز مجموعة متنوعة من البروتينات المسماة بالبكتريوسين التي تعزز الحفاظ على المواد العدائية على البكتيريا اللبنية .

بكتيريا (*Leuconostoc sp*) كانت النوع المراد عزله من كل من حليب الماعز النيء و حليب الإبل,و بعد العزل و التنقية أجريت عدة أجريت عدة اختبارات فيزيولوجية و بيوكيميائية بهدف معرفة نوع و سلالتها و كانت النتيجة تحديد نوعين اثنين:*Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides* و *Leuconostoc mesenteroides* subsp*dextranicum*

أظهرت نتائج مختلف الاختبارات البيوتكنولوجية التي أجريت بهدف معرفة قدرة الأثر الايجابي لاستخدام هده البكتيريا على أنها غير قادرة على تفكيك البروتين و الدسم إلا أن تفاعلها مع البكتيريا اللبنية

أظهرت تفاعل ايجابي و هدا ما يعرف بالتعايش مما يسمح باستعمال السلالتين(*Ln. mesenteroides* et *Lb. plantarum*) معا في الصناعة الغذائية.

في حين أن تفاعلها مع البكتيريا المسببة للتلوث و/أو الممرضة اتجاه الأربع سلالات الآتية (*Listeria inocoua* ATCC 33090 et *Listeria ivanovii* ATCC19119, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922) سمحت لنا بعزل 6 سلالات من بين 15 عزلة تم اختبارهم بعد إثبات قدرتها على القضاء و تأثير على الجراثيم المسببة للتلوث و/أو الممرضة وهدا بعد تثبيط كل من حمض اللبن, فوق الأكسيد و إثبات الطبيعة البروتينية لرشاحات هده العزلات المختارة.

ثم تتبعنا النمو الحركي و انخفاض درجة الحموضة في مادة الحليب للبكتيريا المسببة للتلوث و/أو المسببات للأمراض في وجود أو من دون العزلات الأكثر كفاءة(M9 وV1)

هده الدراسات البيوتكنولوجية قادتنا إلى إمكانية استغلال هدا النوع لتطوير الخمائر اللبنية المحلية لمحاربة الجراثيم الغير مرغوب فيها.

الكلمات الرئيسية:

Leuconostoc mesenteroides ،حليب الماعز ،حليب الإبل، تأثير على الجراثيم،الخصائص البيوتكنولوجية ، بكتريوسين، حامض اللاكتيك

Dédicace
Remerciement
Liste des abréviations
Liste des figures
Liste des tableaux
Résumé
Abstract
ملخص
Introduction
I. Généralité sur le lait ……..1
I. 1Définition du lait……..1
I. 2Composition……2
I. 3Le lait de chèvre…….3
1) Généralités sur le caprin……..……3
2)Taxonomie……..……..5
3)Localisation et effectif……..5
4)Composition du lait de chèvre……..…5
- ✓ **Eau……..……...5**
- ✓ **Matière azotée ……..……..6**
- ✓ **Matière grasse ...……6**
- ✓ **Teneur en sucre……..……7**
- ✓ **Minéraux……..……..……7**
- ✓ **Vitamines……8**

I. 4Le lait de chamelle……..9
1)Généralités sur le dromadaire……..……....9
2)Localisation et effectif……..……9
3)Taxonomie……12
4)Composition du lait de chamelle……..12
- ✓ **Eau……..13**
- ✓ **Matière protéique……13**
- ✓ **Matière grasse……14**
- ✓ **Minéraux…..……...14**
- ✓ **Vitamines...……...15**

II. Généralités sur les bactéries lactiques……17
II. 1 Définition des bactéries lactiques……..17
II. 2 Origine des bactéries lactiques ……18
II. 3 Habitat……18
II. 4 Diversité et taxonomie……..20
II. 5 Propriétés métaboliques ……24
1)Métabolisme des sucres……...24

2)Métabolisme du citrate……..24
II. 6 Les aptitudes biotechnologiques des bactéries lactiques……..25
1) Formation de l'arôme et de la saveur……27
2) Interaction avec d'autres micro-organismes……27
✓ Les acides organiques……....27
✓ Peroxyde d'hydrogène……..28
✓ Dioxyde de carbone……...……...28
✓ Le diacétyle……..……28
✓ Les bactériocines……..……..28
*3)*Propriétés probiotiques……..……..31
III. Les *Leuconostoc*……..……...33
III.1 Définition des *Leuconostoc*……..……33
III.2 Écologie……..……..33
III.3 Caractères bactériologiques……34
III.4 Taxonomie……36
III.5 Métabolisme des *Leuconostoc*……..……..38
1)Fermentation des hexoses……..38
2)Fermentation des citrates et acides carboxyliques……..…39
III.6 Les aptitudes biotechnologiques de *Leuconostoc*……..40
1)Production de dextranes……40
2)Production de substances inhibitrices……...42
3)Pouvoir acidifiant……..46
4)Pouvoir gazeux……..46
5)Utilisation des *Leuconostoc* comme levains d'arôme……...47
6)Utilisation des *Leuconostoc* Pour éliminer certains défauts de goût……..48
7) *Leuconostoc* comme agent contaminé……..49
IV. Matériel et méthode……...50
IV. 1Provenance des échantillons……...50
IV. 2Les bactéries utilisées……..……...50
IV. 3Isolement et caractérisation des souches de *Leuconostoc*……50
1)Préparation de l'échantillon……50
2)Milieux d'isolement……..……..……51
3)La coloration de Gram……...53
4)Test de la catalase……..……...53
5)Type fermentaire……..54
6)Hydrolyse d'arginine……54
IV. 4 Conservation des isolats……55
1)Conservation courte durée……..55
2)Conservation longue durée……56
IV. 5 Détermination des espèces……57
1)La croissance à différentes températures……..57
2)La tolérance à la salinité et à l'acidité……...57

3)Production de dextrane……..57
4)L'hydrolyse de l'esculine……57
5)L'utilisation de citrate……..58
6)La production d'acétoine……58
7)L'utilisation des carbohydrates……..58
IV. 6 Etude de quelques caractéristiques biotechnologiques des isolats……..61
1)Pouvoir protéolytique……..…61
2)Pouvoir lipolytique……..……..61
3)Etude des interactions……61
✓ Méthode directe……62
✓ Méthode indirecte……64
4)Recherche de la nature de la substance antimicrobienne……..66
✓ Effet des enzymes protéolytiques……....66
✓ Effet du pH……67
✓ Effet de la température……67
✓ Effet des solvants organiques……..67
IV. 7 Etude de la cinétique d'acidification et de la croissance……..68
1) En culture pure ……68
✓ Dosage d'acidité……..……68
✓ Cinétique de croissance……70
2) En culture mixte……..……71
V.Résultats……72
V. 1Isolement et caractérisation des isolats……...72
V. 2Purification et caractérisation des isolats……72
1)Aspect macroscopique……..……..73
✓ Sur milieu solide……..73
✓ Sur milieu liquide……73
2) Test de la catalase……..……..……...74
3)Aspect microscopique……..……...74
4)Type fermentaire……..……76
5)Recherche de l'Arginine dihydrolase (ADH) ……..77
V. 3 L'identification des espèces……..77
1) La croissance à différentes températures……77
2) La thermorésistance……77
3)La tolérance à la salinité et à l'acidité……...77
✓ La croissance en milieux acides……77
✓ La croissance en milieu hyper salé……77
4)La production de dextrane……..78
5)L'hydrolyse de l'esculine……79
6)L'utilisation de citrate……80
7)La production d'acétoine……81
8)L'utilisation des carbohydrates……..……83
V. 4 Les caractéristiques biotechnologiques des isolats……..……85

1) Activité protéolytique……..……..85
2) Activité lipolytique……85
3) Etude des interactions……..……...86
✓ Méthode directe……..……86
✓ Méthode indirecte……..89
4) Recherche de la nature de la substance antimicrobienne……91
✓ Les bactériophages……91
✓ Sensibilité aux enzymes protéolytiques……92
✓ Effet du pH……92
✓ Effet de la température……92
✓ Effet des solvants organiques……..93
V. 5 Etude de la cinétique d'acidification et de la croissance……..95
1) Suivi cinétique de l'évolution du pH et d'acidité Dornic……95
2) Cinétique de la croissance bactérienne……101
✓ En culture pure……101
✓ En culture mixte……..……102
Discussion……..107
Conclusion……..114
Références bibliographiques ……117
Annexes ……133

Introduction :

Le lait est un aliment dont la durée de vie est très limitée. En effet, son pH, voisin de la neutralité, le rend très facilement altérable par les micro-organismes et les enzymes. Sa richesse et sa fragilité en font un milieu idéal de reproduction pour nombreux micro-organismes tels que les moisissures, les levures et les bactéries. Bien que ces micro-organismes soient le principal facteur de dégradation du lait, ils sont historiquement utilisés dans sa transformation et sa conservation. La fermentation des produits alimentaires comme le lait est employée depuis l'antiquité en Afrique, Asie et en Europe, les premiers laits fermentés étant apparus au Moyen Orient aux alentours du XI et XV ème millénaire **(Maurizio 1932).**

Actuellement les industries laitières sont en effet très concernées par l'utilisation des bactéries lactiques comme agents de transformation pour l'obtention de lait fermenté et la réduction des microflores d'altérations et des flores pathogènes. Car la suppression de la microflore du lait cru par d'autres techniques tels que la microfiltration, la pasteurisation, … entraine une diminution du goût et des différences dans les arômes des fromages **(Bouton et Grappin., 1995 ; Beuvier *et al.*, 1997 ; Buchin *et al.*, 1998 ; Verdier *et al.*, 2005 ; Elgazzar *et al.*, 1992 ; Gay et Amgar, 2005).**

Cette préservation est conférée par la production de plusieurs métabolites ayant une activité antimicrobienne tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyl et les bactériocines ces substances bioactives présentent également une grande tolérance aux variations de pH et aux traitements thermiques. Tous ces critères suggèrent que les bactériocines peuvent être un remplaçant idéal des conservateurs chimiques **(Dortu et Thonart, 2009; Moraes *et al.*, 2010).**

Parmi les bactéries lactiques utilisés dans les industries laitière, on peut citer le genre de *leuconostoc* qui est très utilisé en technologie fromagère pour son aptitude à produire le CO_2, ce caractère est plus utilisé en technologie du fromage bleu (roquefort, bleu d'Auvergne..); il contribue à la formation des cavités Pour que la moisissure de *Penicillium* puisse se développer dans le fromage et lui donner son aspect persillé) et semble intéressant en pâte molle. Sur le plan aromatique *leuconostoc* est un levain d'arome qui produit les substances aromatiques telles que le diacétyl et l'acétoïne à partir des citrates du lait.

Certaines espèces de *Leuconostoc* ont été proposées pour la bioconservation des produits alimentaires contre les flores pathogènes et /ou d'altérations tels que *Listeria monocytogenes*. **(Budde *et al.*, 2003).**

Ce genre est également important dans les fermentations naturelles des produits d'origine végétale, par exemple la choucroute **(Eom *et al.*, 2007).**

Leuconostoc mesenteroides présente une importance majeure dans la fabrication de produits laitiers, telles que les spécialités fermentées type yogourt ou les crèmes laitières, par exemple. Il serait donc très intéressant de pouvoir utiliser de telles bactéries capables de synthétiser du dextrane, présentant une texture et un goût agréables, de manière à texturer notamment ce type de compositions alimentaires.

L'objectif de ce travail était l'étude des caractères technologiques, y compris la production de dextrane et l'utilisation de citrate vu son rôle important comme précurseur des composés aromatiques et la production des bactériocines, des espèces de *Leuconostoc mesenteroides* isolées du lait cru de chèvre et de chamelle, afin d'obtenir des souches performantes d'une production intense de bactériocines de dextrane et d'arome pour les utiliser en industrie alimentaire.

Ce mémoire est subdivisé en trois chapitres :

- Le premier chapitre présente une généralité sur le lait ; ensemble des connaissances sur les bactéries lactique, « Définition ; Origine des bactéries lactiques ; Habitat ; Diversité et taxonomie ; Les aptitudes biotechnologiques des bactéries lactiques) y compris le genre Leuconostoc et sa : « Définition ; Écologie ; Caractères bactériologiques ; Taxonomie ; Métabolisme des Leuconostoc et les aptitudes biotechnologiques de *Leuconostoc* ».
- Le second chapitre exprime les approches méthodologiques et description des techniques qui ont servi à la concrétisation de notre travail.
- Le troisième chapitre reflète comme :

-Première partie les résultats obtenus de différents tests d'identification, caractéristiques biotechnologiques des isolats ainsi que l'étude des interactions avec différentes souches, la cinétique de croissance, l'évolution de pH et d'acidité des Leuconostocs en culture pure et mixte.

-Tandis que la deuxième partie contient la discussion des résultats et leur comparaison avec les différents travaux réalisés et traitant ce genre.

En terminant avec une conclusion générale qui englobe les résultats de ce travail.

Rapport-Gratuit.com

I.Généralité sur le lait :

I. 1Définition du lait :

Le lait est une sécrétion mammaire normale d'animaux de traite obtenue à partir d'une ou de plusieurs traites sans y ajouter ou en soustraire, destinée à la consommation comme lait liquide ou à un traitement ultérieur **(FAO, 2000).**

Le lait est un liquide sécrété par les glandes mammaires des femelles mammifères après la naissance du jeune. C'est un liquide de composition complexe, blanc et opaque, d'une saveur douce, d'une réaction ionique (pH) voisin de la neutralité. La fonction naturelle du lait est d'être un aliment exclusif des jeunes mammifères pendant la période critique de leur existence, après la naissance, alors que la croissance est rapide et qu'il ne peut lui être substitué d'autres aliments. La grande complexité de la composition du lait répond à cette fonction **(Alais, 1984 ; Amiot *et al.*, 2002).**

Selon le congrès international pour la répression des fraudes alimentaires, tenu à Genève en 1908, « le lait est le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière ; (vache, jument, chèvre, brebis, etc.), bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne doit pas contenir de colostrum » **(Desjeux, 1993 ; Boudier J.F. et Luquet F.M., 1981).**

(Jeantet *et al.* ,2008) rapportent que le lait doit être en outre collecté dans de bonnes conditions hygiéniques et présenter toutes les garanties sanitaires. Il peut être commercialisé en l'état mais le plus souvent après avoir subi des traitements de standardisation lipidique et microbienne pour limiter les risques hygiéniques et assurer une plus longue conservation.

I. 2 Composition :

Franworth et Mainville (2010) évoquent que le lait est reconnu depuis longtemps comme étant un aliment bon pour la santé. Source de calcium et de protéines, il peut être ajouté à notre régime sous plusieurs formes.

Les laits sont les seuls aliments naturels complets qui existent, chacun d'eux étant adapté à la race qu'il permet de développer **(Mittaine, 1980).**

Selon **Favier (1985)** le lait est une source importante de protéines de très bonne qualité, riches en acides aminés essentiels, tout particulièrement en lysine qui est par excellence l'acide aminé de la croissance. Ses lipides, caractérisés par rapport aux autres corps gras alimentaires par une forte proportion d'acides gras à chaîne courte, sont beaucoup plus riches en acides gras saturés qu'en acides gras insaturés. Ils véhiculent par ailleurs des quantités appréciables de cholestérol et de vitamine A ainsi que de faibles quantités de vitamine D et E.

Les principaux constituants du lait par ordre croissant selon **Pougheon et Goursaud (2001)** sont :

- L'eau, très majoritaire,
- Les glucides principalement représentés par le lactose,
- Les lipides, essentiellement des triglycérides rassemblés en globules gras,
- Les sels minéraux à l'état ionique et moléculaire,
- Les protéines, caséines rassemblées en micelles, albumines et globulines solubles,
- Les éléments à l'état de trace mais au rôle biologique important, enzymes, vitamines et oligoéléments.

Fredot (2006) rappelle que le lait est constitué de quatre phases :

- Une émulsion de matières grasses ou phase grasse constituée de globules gras et de vitamines liposolubles (A, D).
- Une phase colloïdale qui est une suspension de caséines sous forme de micelle.
- Une phase aqueuse qui contient les constituants solubles du lait (protéines solubles, lactose, vitamines B et C, sels minéraux, azote non protéique).
- Une phase gazeuse composée d'O_2, d'azote et de CO_2 dissous qui représentent environ 5 ٪ du volume du lait.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Suivant les espèces animales et les races au sein d'une même espèce ; elle varie également chez une même laitière en fonction de la période de la lactation et de l'alimentation. C'est pour cette raison qu'on ne peut parler que de compositions moyennes. **(Pellerin, 2001 ;Hadadji, 2006)**.

I. 3Le lait de chèvre :

1)Généralités sur le caprin :

Domestiqué il y plus de 1000 ans avant Jésus- Christ, la chèvre (Capra Hircus), est réputée pour sa rusticité. C'est un animal adapté aux conditions rudes et a la sécheresse *(***Shkolnik *et al* ,1980).**

L'espèce Capra Hircus se présente en Algérie sous la forme d'une mosaïque de populations très variées appartenant toutes à des populations traditionnelles.
Elle comprend en plus de ces populations locales, à sang généralement Nubien, des animaux mélangés aux sangs issus de races standardisées.

D'après (**Hellal, 1986 ; Dekkiche, 1987 ; Sebaa ,1992 ; Takoucht ,1998 ; Feliachi ,2003**) La population caprine d'Algérie renferme quatre types majeurs : La race Arabia, la race Makatia, la Naine de Kabylie et la chèvre du M'zab, auxquelles s'ajoute le cheptel importé (notamment races Alpine et Saanen) et les produits de croissements **(Tableau1).**

- **La race Arbia :** La plus dominante de ces populations est la chèvre Arabe dite population Arabo-maghrébine. Elle se localise en zone steppique ou semi steppique et présente un format peu développé, brun foncé et dépourvue de cornes. Au niveau du phénotype elle manifeste des caractères plus homogènes : Robe noire à long poils, pattes blanches au dessus du genou, raies blanches et fauves sur visage, taches blanches à l'arrière des cuisses. Cet animal est parfaitement adapté aux contraintes des parcours et semble posséder de bonnes aptitudes de reproduction.
- **La race Makatia** : Aux caractères assez hétérogènes, robe polychrome aux poils courts, oreilles tombantes, la race Makatia semble être le produit de multiples croisements réalisés à partir de race est peu résistante sur parcours et son intérêt réside dans sa production laitière et son adaptation et son adaptation à l'environnement.

- **La chèvre du M'zab :** Elle se retrouve surtout dans le sud, est une bonne laitière et très fertile. Cette race est très appréciée dans l'est méditerranéen pour ses capacités laitières et fait partie du rameau Nubio-Syrien. La race **MOZABITE** est très intéressante du point de vue production laitière (2,56 Kg/j) **(Tableau2).**
- **La race Kabyle :** C'est une chèvre autochtone qui peuple les massifs montagneux de la Kabylie et de l'Aurès. Elle est robuste et massive, de petite taille, de couleur noirâtre ou blanchâtre avec de longs poils, c'est une mauvaise laitière qui est appréciée pour sa viande **(Feliachi ,2003).**

Tableau1: *Caractéristiques biométriques de quelques populations en Algérie (***Kerbaa, 1995).**

Races	Principale localisation	Hauteur au garrot moyen (cm) Mâles	Hauteur au garrot moyen (cm) Femelles	Couleurs principales	Caractères particuliers
La ARBIA	Région de laghouat	***70***	***67***	Noire	Front droit Poils longs Oreilles tombantes
La MAKATIA	Hauts plateaux	***72***	***63***	Couleurs variés	Taille grande Poils courts Pendeloques et barbe courantes
La KABYLE	Montagnes de kabylie et dahra	***68***	***55***	Unicolore et multicolores Noire et brune	Petite taille Poils longs Oreilles longues
La MOZABITE	Metliti et region de ghardaia	***68***	***65***	Unicolore chamoisée dominante	Type nubien Oreilles longues Et tombantes

Tableau2: Caractéristiques zootechniques de quelques populations en Algérie **(Kerbaa, 1995).**

Races	Durée de lactation (en jours)	Production laitière par lactation (en Kg)
L'ARBIA	*150*	*220*
La MAKATIA	*120*	*80*
La KABYLE	*150*	*105*
La MOZABITE	*180*	*460*

2)Taxonomie selon (Wilson et Reeder ,2005):

-Rène ***:*** *Animalia*

-Embranchement ***:*** *Chordata*

-Classe ***:*** *Mammalia*

-Ordre ***:*** *Artiodactyla*

-Famille ***:*** *Bovidae*

-Sous-famille ***:*** *Caprinae*

-Genre ***:*** *Capra*

3)Localisation et effectif :

Pour les trois pays du Maghreb(Tunisie, Algérie, Maroc), l'élevage caprin est pratiqué par la quasi-totalité des foyers ruraux, les chiffres suggèrent que plus d'un tiers des foyers tunisiens, la moitié des foyers marocains et trois quarts des foyers algériens sont concernés **(CHICHE,1999).**

Cet élevage constitue 26% du produit brut agricole du Maroc 30% celui de la Tunisie et 50% celui de l'Algérie **(CHICHE, 1999).**

4)Composition du lait de chèvre :

✓ **Eau :**

D'après **Amiot *et al.* (2002)**, l'eau est le constituant le plus important du lait, en proportion. La présence d'un dipôle et de doublets d'électrons libres lui confère un caractère polaire. Ce caractère polaire lui permet de former une solution vraie avec les substances polaires telles que les glucides, les minéraux et une solution colloïdale avec les protéines hydrophiles du sérum. Puisque les matières grasses possèdent un caractère non polaire (ou hydrophobe), elles ne pourront se dissoudre et formeront une émulsion

du type huile dans l'eau. Il en est de même pour les micelles de caséines qui formeront une suspension colloïdale puisqu'elles sont solides**.**

Le lait de chèvre est constitué de 90% du l'eau **(Tableau3)** mais il existe quelques variations quant à la teneur en matière sèche : le lait de chèvre en contient environ 136 grammes par kilogramme (g/kg) de lait ***(*Brugère, 2003).**

Tableau 3 : Composition chimique du lait de chèvre d'après **Guegen (1997)**

Composants chimiques	**Lait de chèvre (g/l)**
Eau	**900**
Matière protéique	**30.8**
Matière grasse	**34.4**
Lactose	**48**
Calcium	**1.25**
Phosphore	**0.95**

✓ **Matière azotée :**

Les matières azotées du lait de chèvre contient environ (30,85g/Kg);elles sont constituées à 92% par des protéines et à 8% par de l'azote non protéique. Les protéines sont composées à 25% par des protéines solubles non coagulables (albumine, globulines) qui ne participent pas à la formation du caillé. Il y a également des protéines coagulables (75%) représentées par les caséines indispensables à la formation du coagulum. **(Mietton M., 1986)**
La valeur nutritionnelle des protéines caprines est excellente car elles contiennent tous les acides aminés indispensables à l'organisme en proportions satisfaisantes **(Le Mens P., 1985).**

✓ **Matière grasse :**

La matière grasse par sa seule présence et par les transformations qu'elle subit joue un rôle déterminant sur les qualités organoleptiques des fromages. Outre son influence sur la texture, elle a un rôle de solvant des composants aromatiques.

Le taux de matière grasse ou taux butyrique moyen dans le lait de chèvre est de

33g/Kg. Elle est constituée en majorité de triglycérides, en effet ils représentent 97% de la matière grasse totale, les mono- et les diglycérides ne représentent que 0,5 %.
La matière grasse du lait de chèvre est produite principalement à partir des acides gras volatils (acides acétique et butyrique). Le premier est formé principalement à partir des glucides pariétaux des fourrages (cellulose) et le second à partir des glucides rapidement fermentescibles.
L'absence de béta-carotène confère à la matière grasse du lait de chèvre et aux produits laitiers caprins une blancheur caractéristique. La matière grasse est très altérable : au niveau de la fixation des odeurs, du rancissement, et de l'oxydation. **(Grappin *et al.*, 1981).**

- ✓ **Teneur en sucre :**

Le lait de chèvre contient un sucre particulier : le lactose. Sa teneur varie en fonction du stade de lactation entre 44 et 47 g/L **(Le Mens P., 1985).**

Le lactose est indispensable lors de la fabrication fromagère, en effet le lactose est dégradé par les bactéries lactiques en acide lactique. Cette acidification est préalable à la coagulation du lait. Cet acide est éliminé dans le lactosérum. **(Gauzère *et al.*, 2004)**

- ✓ **Minéraux :**

Le lait de chèvre, comme celui des autres espèces de mammifères, contient tous les éléments minéraux indisponibles que l'on classe habituellement en macroéléments : calcium (Ca), phosphore (P), magnésium (Mg), sodium (Na), potassium (K), chlore (Cl)), soufre (S) et en oligoéléments : fer (Fr), zinc (Zn), cuivre (Cu), manganèse (Mn), iode (I), sélénium(Se), molybdène (Mo), chrome (Cr), cobalt (Co), fluor (F) **(Tableau4).** Il s'y trouve aussi, à dose très faibles quelques éléments indésirables comme le plomb (Pb), le mercure (Hg), Le cadmium (Cd), l'arsenic (As), l'aluminium (Al), etc. et des radionucléides provenant de contaminations.

La composition minérale du lait de chèvre est légèrement plus riche en P et Na et nettement plus riche en Cl et surtout en Ca et K **(Tableau5) (Gueguen, 1997).**

Tableau 4: Composition minérale moyenne du lait de chèvre d'après **(Guegen,1997).**

(Eléments minéraux majeurs en mg par litre).

Composition minérale	**Quantité (mg/L)**
Calcium	1260
Phosphore	970
Potassium	1900
Sodium	380
Chlore	1600
Magnésium	130

Tableau5: Composition minérale moyenne du lait de chèvre d'après **Guegen,2997**.

Principaux oligo-éléments indispensables en µg par litre.

Composition minérale	**Quantité en µg/l**
Zinc	3400
Fer	550
Cuivre	300
Manganèse	800
Iode	80
Sélénium	20

✓ **Vitamines :**

Selon **Vignola (2002),** les vitamines sont des substances biologiquement indispensables à la vie puisqu'elles participent comme cofacteurs dans les réactions enzymatiques et dans les échanges à l'échelle des membranes cellulaires.

Le lait de chèvre est riche en vitamines B 1, B 2 et B 3, B 5, B 6 et B 8. Le lait de chèvre est particulièrement pauvre en vitamine A, ce qui lui donne une coloration plus blanche que les autres laits **(Tableau6) (Brugère, 2003).**

Le lait de chèvre ne contient pas de carotènes mais uniquement du rétinol **(Christel D., 2010).**

Tableau6: Composition vitaminiques de lait de chèvre (pour 100g) **(Grandpierre *et al*., 1988)**.

Vitamines liposolubles	Quantité
A rétinol	0.040mg
Carotène	00mg
D	0.06mg
E tocophérol	0.04mg
Vitamines hydrosolubles	
B1	0.05mg
B2	0.14mg
B3	0.27mg
B5	0.31mg
B6	.05mg
B8	2.0µg
B9	1.0 µg
B12	0.06 µg
Acide ascorbique	1.3mg

I. 4 Le lait de chamelle :

1)Généralités sur le dromadaire:

Le dromadaire s'est révélé à l'animal le mieux adapté à la zone aride, affrontée depuis une trentaine d'années à des sécheresses répétées.

Il est aussi le dérivé du terme grecque « dromados » qui veut dire course. Il est donné à l'espèce de chameau à une seule bosse **(Siboukeur, 2007).**

Les dromadaires d'Algérie appartiennent à la famille des camélidés, qui sont des mammifères artiodactyles d'origine nord-américaine, mais ils ont disparu de ce continent alors qu'ils se répandaient en Amérique du Sud, en Asie, puis en Afrique, continents où ils ont survécu pour donner naissance aux espèces modernes. **(Ben aissa, 1989*)*.**

2)Localisation et effectif :

La chamelle est répartie sur 17 wilayas **(Figure1),** avec prés de 92% soit 155961 têtes dans les huit wilayas sahariennes (Ouargla Ghardaia, El-Oued, Tamanrasset, Illizi, Adrar, Tindouf et Béchar), et les 8% restant (12511 têtes) dans les neuf Wilayas steppiques (Biskra, Tebessa, Khenchela, Batna, Djelfa, El-Bayad, Naâma, Laghouat et M'sila) **(M.A.D.R, 2006).**

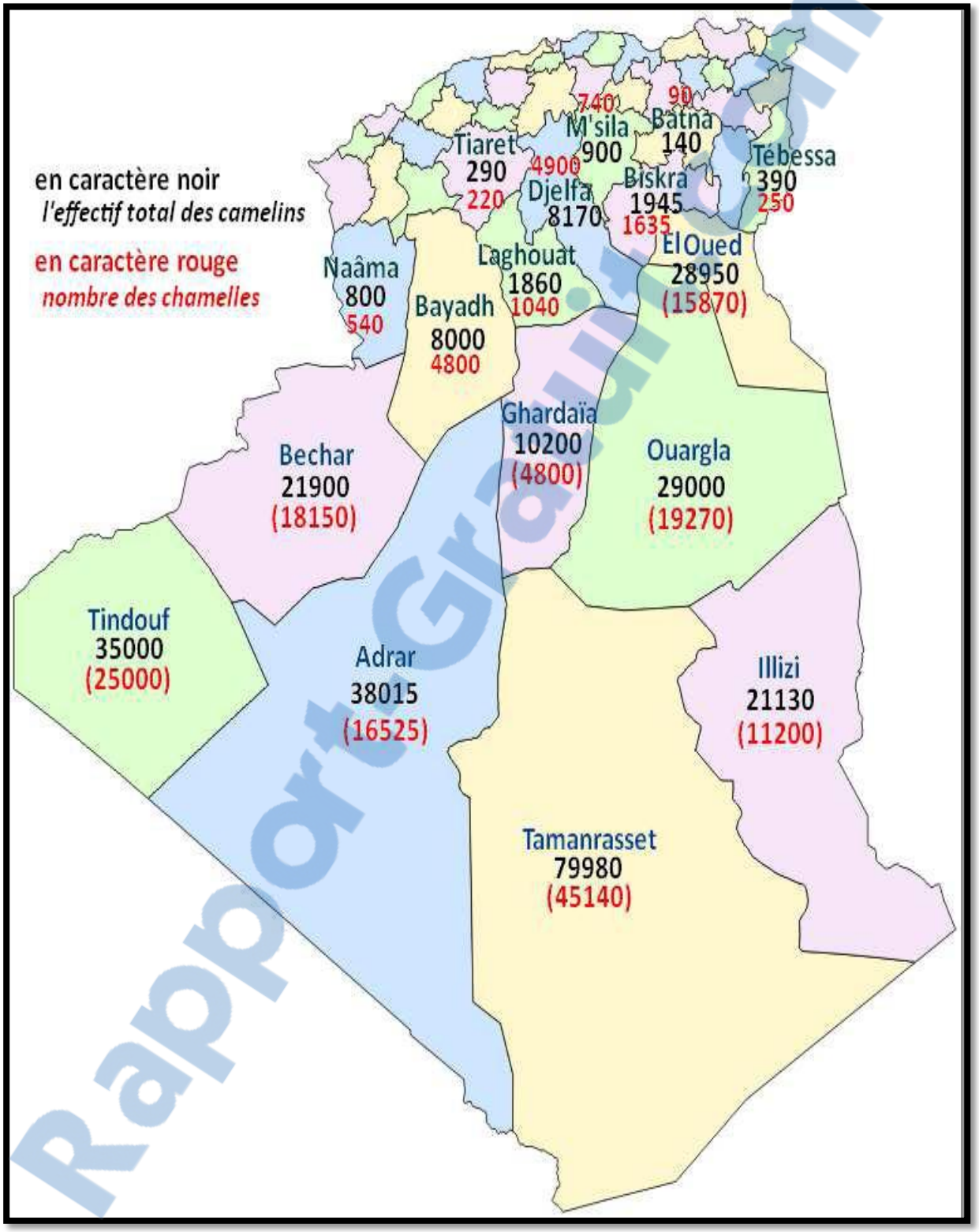
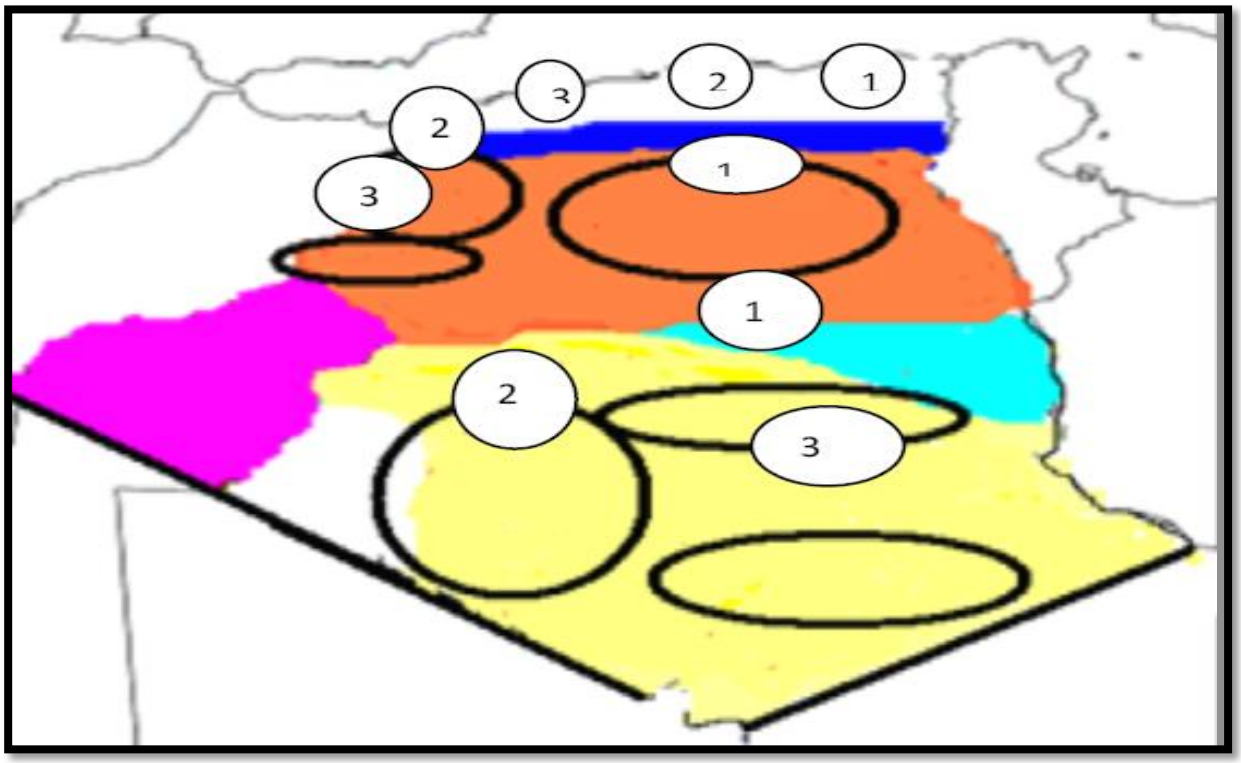


Figure1:la carte des effectifs camelins et leur répartition en Algérie (en têtes, Données **2006- M.A.D.R,** crié par **(Laameche, 2010)**

Ben aissa (1989) rapporte la présence de plusieurs races camelines en Algérie a savoir : Dromadaire des steppes, Chaâmbi, Ouled Sidi-Cheikh, Sahraoui, Ait Khebach, Targui, Ajjer, Reguibi et la race Aftouh

Alors que **(Ouled belkhir, 2008),** parle de population dont il les a regroupé en quatre (04) groupes **(Figure 2)**:

- **Telli** ou le dromadaire de la steppe (Ait Khebach,OuladNaïl et Aftouh),
- **Sahraoui** (Chaâmbi, Chaâmbi béni Abbas,Ouled Sidi-Cheikh et Sahraoui),
- **Reguibi**
- **Targui** (Amenas Nahaguar - dromadaire du Hoggar- Amenas N'Tamesna - dromadaire du Tamesna- et Amenas Nadghagh - dromadaire d'Adrar -).



Population Sahraoui (1-Chambi ; 2-Oulad sidi-chikh ; 3-Chambi de beni-abbas)
Population Tergui (1-Amenas-Nhaggar « les dromadaires de Hoggar » ;2-Amenas stamesna « les dromadaires de tamesna » ;3-Amenas nadghagh « les dromadaires d'adghagh »)
Population de Telli « population de steppe » (1-Ait khebach ;2-Ouled Nail ;3-Ftouh).
Population de Reguibi
Population Araba

Figure2: la répartition géographique des populations camelines en Algérie **(Ouled belkheir, 2008)**

3)Taxonomie

La taxonomie du dromadaire selon **Wilson (1984)** est la suivante:

Règne : Animalia

Embranchement : Chordata

Classe : Mammalia

Ordre : Artiodactyla

Sous ordre : Tylopoda

Famille : Camelidae

Sous famille : Camelinae

Genre : *Camelus*

Espèce : *Camelus dromedarius*

4)Composition du lait de chamelle :

Le lait de dromadaire est un liquide blanc opaque, de gout sucré selon le type d'alimentation et la disponibilité en eau **(Farah, 1993).**

La composition chimique globale du lait de chamelle **(Tableau7)**, même si elle change selon les auteurs (donc selon les animaux et l'environnement considéré), montre néanmoins des teneurs importantes et équilibrées en nutriments de base (protéines, matière grasse et lactose) **(Siboukeur, 2007).**

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Tableau7: Indication sur la variation de la composition chimique du lait camelin (g/Kg) ; valeurs rapportées par différents auteurs.

Extrait sec total	Matière grasse	Matières azotées totales	Cendres	Références
144	55	34	9	Knoess,(1977)
98	32	42	6	Deasal *et al.*,(1982)
119	36	44	8	Sawaya *et al.*, (1984)
130	33	56	8	Gnana *et al.*, (1986)
134	32	48	7	Abedel-Rahim,(1987)
113	33	47	9	Abu-lehia,(1987)
110	35	39	8	Hassan *et al*.,(1987)
142	38	55	8	Abu-lehia,(1989)
122	32	52	8	Farah et Ruegg,(1989)
119	32	45	8	Mehaia et Al-kanhal,(1989)
134	36	55	8	Bayoumi,(1990)
109.5	31.5	28.	8.3	Elamin et Wilcox,(1992)
113.5	32.2	29.1	7.9	Mehaia et wilcox.(1992)
128	34.5	31.5	9.5	Attia *et al*.,(2000)

✓ **Eau :**

La teneur en eau du lait camelin, qui varie selon son apport dans l'alimentation, atteint son maximum pendant la période de sécheresse. En effet, il a été montré que la restriction en eau alimentaire des chamelles se traduit par une dilution du lait : un régime riche en eau donne un lait ayant un taux de 86% alors que dans un régime déficient, celui-ci s'élève à 91%. Cette dilution pourrait être l'effet d'un mécanisme **(Yagil et Etzion, 1980; Faye et Mulato, 1991**).

✓ **Matière azotée :**

Selon **Siboukeur (2007)** la fraction azotée du lait de chamelle, est repartie en deux sous fractions : l'azote protéique et l'azote non protéique.

La première fraction azotée protéique représente 90 à 95% de l'azote total du lait de chamelle. La deuxième fraction azotée non protéique, qui représente 5 à 10%, est environ deux fois plus élevée que celle généralement retrouvée dans le lait de vache, cette dernière fraction est caractérisée par une haute valeur biologique qui est due à sa richesse en acides aminés libres, en nucléotides et en certains précurseurs de vitamines ainsi que des peptides, de l'acide urique, de l'urée, de la créatine, …etc.

✓ **Matière grasse :**

Comme dans le lait des autres espèces de mammifères, la fraction lipidique du lait camelin est constituée essentiellement de triglycérides, qui représentent 97 à 98%de la matière grasse totale. La composition **(Tableau8)** fait ressortir une faible teneur en acides gras à chaine courte et moyenne (de C4 à C12), et une teneur relativement élevée en C14 :0, C16 :1, C18 :0 et C18 :1. Ces résultats confortent la bonne digestibilité de cette matière grass, critère relativement important sur le plan nutritionnel **(Gnana et Sheriha, 1986 ; Farah et Ruegg, 1989).**

Tableau 8: Composition moyenne en acide gras des laits de chamelle **(Attia *et al.*, 2000)**

Nature des acides gras	Teneur (g/kg)
C 4:0	0.60
C 6:0	0.22
C 8:0	0.21
C 10:0	0.25
C 12:0	1.19
C 14:0	13.11
C 14:	0.70
C 15:0	0.10
C 16:0	31.45
C 16:1	11.62
C 18 :0	16.12
C 18:1	20.70
C 18:2	1.91
C 18:3	1.33
C 20 :0	0.49
C4-C12 :	2.47
Insaturé/Saturé	0.57

✓ ***Minéraux :***

Les sels minéraux présents dans le lait de chamelle **(Tableau9)** sont diversifiés on y dénombre en effet des macros et des oligo-éléments qui se trouvent sous forme de sels (phosphates, chlorures et citrates) ou de métaux divers (sodium, potassium, magnésium, calcium, fer, cuivre, zinc...etc.) **(Elamin et Wilcox, 1992 ; Mehaia *et al*, 1995 ; Gorban et Izzeldin, 1997 ; Bengoumi *et al*, 1994).**

Farah (1993), a rapporté que la variation de la composition minérale du lait camelin est influencée par la saison, l'etat sanitaire de la mamelle et le stade de lactation.

Tableau9: Composition en sels minéraux (mg/l) du lait de chamelle (selon différent auteurs cité par **Siboukeur.,2007).**

Ca	Mg	P	Na	K	Fe	Zn	Cu	Mn	I	Pb	Références
300	45	--	431	725	2,8	--	--	--	--	1,8	**ELAMIN et WILCOX, (1992)**
1462	108	784	902	2110	3,4	2,9	0,1	2,0	0,1	--	**BENGOUMI *et al,* (1994)**
1180	125	889	688	1464	2,34	6,00	1,42	0,80	--	--	**MEHAIA *et al,* (1995)**
1182	74	769	581	1704	1,3	5	--	0,1	--	--	**GORBAN et IZZELDIN, (1997)**
1230	90	1020	660	1720	--	--	--	--	--	--	**ATTIA *et al,* (2000)**

N.B : (--) : non déterminé

✓ **Vitamines :**

Le lait de chamelle se singularise par sa richesse relative en vitamines B3 (niacine) et en vitamine C **(Tableau10).** Cette caractéristique est particulièrement intéressante, car elle permet au lait de cette espèce, par son apport important en cette vitamine, de répondre aux besoins nutritionnels, aussi bien du jeune chamelon que des populations locales, qui vivent dans un environnement où l'apport en ce type de vitamine est particulièrement limité **(Siboukeur, 2007).** Ella expliquerait également l'utilisation du lait de dromadaire comme « médicament » dans certains pays asiatiques pour stimuler les fonctions du foie et lutter contre la fatigue générale **(Farah *et al.*,1993)**

Tableau10: Composition en vitamines (µg/Kg) du lait de chamelle, **(**sellons auteurs cité par **Siboukeur., 2007)**

Nature des vitamines	**Lait de chamelle**		
	SAWAYA *et al* (1984)	FARAH *et al* (1992)	KAPPELER (1998)
A (Rétinol)	150	100	150
B1 (Thiamine)	330	-	600
B2 (Riboflavine)	416	570	800
B3 (Niacine)	4610	-	4600
B6 (Pyridoxine)	523	-	520
B12 (Cobalamine)	1,5	-	2
B9 (Acide folique)	4,1	-	4
E (Tocophérol)	-	560	530
C (Acide ascorbique)*	24	37	24-36

N.B : (-) : non déterminé ; (*) : en mg / kg

II. Généralités sur les bactéries lactiques :

II. 1 Définition des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques sont des coques ou des bâtonnets **(Figure3)**, Gram positif, immobiles, non sporulées, catalase négative. Elles synthétisent leur ATP grâce à la fermentation lactique des glucides. Lorsque l'acide lactique est le seul produit terminal, il s'agit des bactéries lactiques homofermentaires (Certaines espèces peuvent produire au moins 18 moles d'acide lactique par mole de glucose fermenté). Parfois, en plus de l'acide lactique, d'autres composés constitués principalement d'acide acétique, d'éthanol et de gaz carbonique sont produits : c'est le cas des hétérofermentaires (produisent uniquement 1 mole d'acide lactique par mole de glucose fermenté) **(Larpent, 1989 ; Novel,1993)**.

Les bactéries lactiques sont aéro-anaérobies facultatives ou micro-aerophiles. En présence d'oxygène, elles sont incapables de phosphorylation oxydatives car elles ne peuvent synthétiser les cytochromes et les enzymes à noyau hème *(***Hardie, 1986 ; Zarour *et al.*, 2013)**. Elles ont des besoins complexes en facteurs de croissance, acides aminés, peptides, bases puriques et pyrimidiques, des vitamines B et des acides gras. C'est la raison qui explique leur abondance dans le lait **(Larpent, 1989 ; Novel,1993).**

Les bactéries lactiques regroupent 13 genres dont les : *Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus , Streptococcus, Bifidobacterium, Carnobacterium, Oenococcus, Weissella, Aerococcus, Tetragenococcus et Vagococcus.* **(Dortu, 2009)**

Ces bactéries ont la capacité de fermenter les sucres (glucose, fructose, mannose, galactose, saccharose et lactose) en acide lactique *(***Kandler et Weiss, 1986).**

Les bactéries lactiques utilisées dans l'alimentation sont considérées comme non pathogènes. Cependant, parmi elles quelques espèces du genre *Streptococcus* et *Enterococcus* sont considérées comme des pathogènes opportunistes **(Aguirre et Collins, 1993).**

A) B)

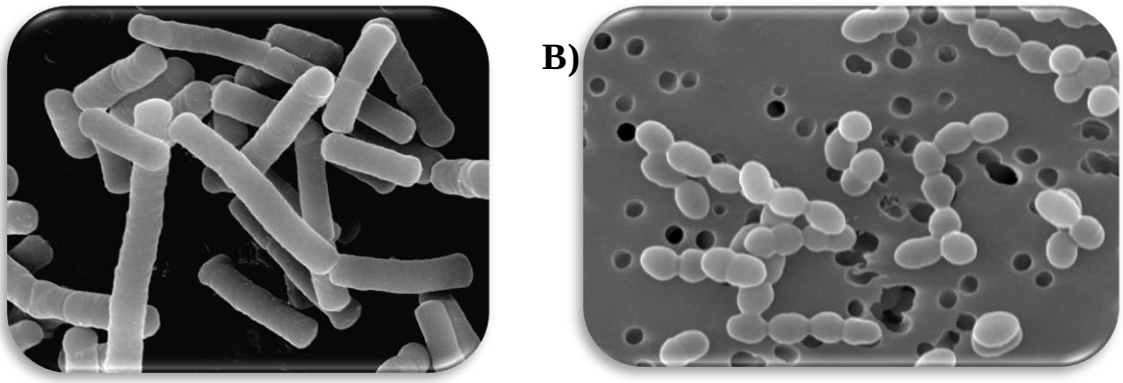


Figure3: Observation des bactéries lactiques au microscope électronique à transmission(x10000)

A)-*Lactobacillus* Rosell- 11 (forme de bacille)
B)- : Leuconostoc *lactis (forme de cocci)*

II. 2 Origine des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques ont été retrouvées dans des sédiments datant de 2,75 milliards d'années bien avant l'apparition d'oxygène dans l'atmosphère, ce qui pourrait expliquer leur caractère anaérobie. De plus, des études sur la phylogénie bactérienne mentionnent leur apparition avant celle des cyanobactéries **(Quiberoni *et al.*, 2001).** D'autres études montrent que certaines bactéries lactiques, comme *Lactobacillus lactis,* sont en voie d'acquérir une chaîne respiratoire **(Duwat *et al.*, 2001).**

II. 3 Habitat :

Les bactéries lactiques sont ubiquistes : elles sont retrouvées dans différentes niches écologiques comme le lait et les produits laitiers, les végétaux, la viande, le poisson, les muqueuses humaines et animales ainsi que dans le tractus digestif, ce qui explique leur température de croissance hétérogène **(Mayo *et al*., 2010 ; Klein *et al.*, 1998)**
Mais certaines espèces semblent s'adapter à un environnement spécifique et ne sont guère trouvées ailleurs que dans leurs habitats naturels **(de Roissart, 1986).**

- Les espèces du genre ***Lactococcus*** sont isolées du lait ou des végétaux qui sont les réservoirs naturels de la plupart de ses espèces. L'espèce *Lactococcus lactis subsp. lactis* est

isolée pour la première fois à partir du lait fermenté par Lister en 1873 et reconnue comme agent primaire de l'acidification du lait caillé **(Sandine, 1988).**

Parmi les espèces du genre ***Streptococcus***, *Streptococcus thermophilus* est isolée du lait pasteurisé, du matériel de laiterie et de levains artisanaux **(Jones, 1978).**

- Les espèces du genre ***Leuconostoc*** sont isolées du lait, des produits laitiers, des fruits, des légumes (en particulier la betterave), des végétaux en fermentation (comme la choucroute), des produits de la panification (Suhigara, 1985) et des solutions visqueuses de sucre dans les sucreries (Devoyod et Poullain, 1988).

Boubekri et Yoshiyuki (1996) ont isolé deux souches de *Leuconostoc* sp. à partir de fromage traditionnel El-Klila fabriqué à Batna (Algérie). Tandis que, **Ryhänen *et al.* (1996)** ont identifié trois espèces (*Leuconostoc curvatus, Ln. Citreum* et *Ln. Mesenteroides subsp. Mesenteroides*) isolées à partir de blé fermenté**.** Seule l'espèce *Leuconostoc oenos* est isolée du vin **(Fleming *et al.*, 1985 ; Sugihara, 1985 ; Devoyod et Poullain, 1988 ; Hounhoïgan *et al.*, 1993).**

- Les espèces du genre ***Pediococcus*** sont présentes surtout dans les végétaux en décomposition, parfois dans les boissons alcoolisées, le lait, les différents fromages (Parmesan et autres fromages italiens) et les préparations culinaires (Saucisses, anchois salés ou sauce de soja)

(**Chapman et Sharpe, 1981; Dellaglio *et al.*, 1981A ; Uchida, 1982; Bacus et Brown, 1985 ; Villar *et al.*, 1985).**

- Les espèces du genre ***Lactobacillus*** sont présentes dans plusieurs milieux différents : dans le lait et les fromages (*Lb. casei subsp. casei, Lb. plantarum, Lb. curvatus et Lb. brevis*), dans les laits fermentés (*Lb. kefir, Lb. brevis et Lb. fermentum),* dans les produits végétaux fermentés, les marinades, l'ensilage, le vin et les viandes fraîches ou fermentées (*Lb. brevis, Lb. curvatus, Lb. buchneri et Lb. san franscisco*) **(Demazeaud, 1996).**

II. 4 Diversité et taxonomie :

La classification des levures, des bactéries, des virus et des protistes est basée sur la taxonomie polyphasique. Ce terme est apparu dans les années 70 défini par (**Colwell, 1970)** et se réfère à une taxonomie basée sur un large ensemble de critères regroupant les caractéristiques écologiques, phénotypiques, biochimiques et génétiques **(Pot, 2008).**

Les bactéries lactiques forment un groupe hétérogène en raison non seulement de leur métabolisme mais aussi de leur aspect, leur habitat,… Cette hétérogénéité confère aux bactéries lactiques une diversité qui a permis de leur dresser une taxonomie **(Tableau11).**

De nombreuses classifications des bactéries lactiques ont été proposées. Parmi elles, figure :

- La classification selon la composition de la paroi cellulaire bactérienne **(de Ambrosini *et al.*, 1996),** incluant la nature des acides gras, tels que l'acide lactobacillique (C19:0) et les acides gras insaturés (C14:0, C16:0, C18:0) qui la composent **(Gilarová *et al.*, 1994).**

- Une autre classification, basée sur les différents modèles de fermentation du glucose définit 3 groupes ***(McLeod et al., 2008)*.**

Le groupe I renferme les bactéries réalisant exclusivement l'homofermentation. Ce groupe comporte majoritairement des *Lactobacillus*.

Le groupe II inclut les bactéries réalisant l'hétérofermentation et regroupe les *Leuconostoc*, les *Oenococcus*, les *Weissella* et quelques espèces appartenant au genre *Lactobacillus.*

Le groupe III regroupe quant à lui quelques espèces appartenant au genre *Lactobacillus* et la majorité des espèces appartenant au genre *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus*.
Ce groupe présente une position intermédiaire entre le groupe I et II réalisant ainsi l'homofermentation ou l'hétérofermentation selon les conditions environnementales **(McLeod *et al.*, 2008).**

Tableau11: Caractéristiques de quelques bactéries lactiques.

Bactéries lactique	Propriété cellulaires		Propriétés biochimiques			Informations génétiques		Référence
	Aspect	Habitat	T° optimale(C°)	CO2	Configuration acide lactique	%GC	Taille génome (Mpb)	
Bifidobactérium aldolescentis ATCC15703	Bacille	Intestin	37	-	D,L(D+L)	59	2.1	Suzuki *et al.*,2006
Bifidobactérium Longum DJO10A	Bacille	Intestin, tractus génital	37-41	-	D,L(D+L)	60	2.3	Lee *et al.*,2008
Carnobactérium sp.AT7	Bacille chaine	Viande, poisson	25-43	-	L	35	2.4	Bartlett *et al.*,2007
Entérococcus faecalis AR01/DG	Coque isolé	Intestin	37	-	L	37	2.8	Feldgarden et al.,2006
Lactobacillus casei ATCC334	Bacille chaine	Lait, tractus gastro-intestinal et vaginal	25-42	+/-	D,L(D+L)	46	2.9	Makarova *et al.*,2006
Lactobacillus fermentum IFO3956	Bacille	Lait, tractus gastro-intestinal et vaginal	25-41	+/-	D,L(D+L)	51	2.1	Morita *et al.*,2008
Lactobacillus helveticus DPCe4571	Bacille	Fromage	25-36	+/-	D,L(D+L)	37	2.	Callanan *et al.*,2008
Lactobacillus plantarum WCFS1	Bacille isolé	Plantes,tractus gastrointestinal	25-35	+/-	D,L(D+L)	44	3.3	Kleerebezem *et al.*,2003
Lactobacillus reutteri DSM20016	Bacille chaine	Lait, tractus gastro-intestinal et vaginal	25-37	+/-	D,L(D+L)	38	2	Copeland *et al.*, 2007
Lactobacillus rhamnosus GG	Bacille	Lait, tractus gastro-intestinal et vaginal	25-38	+/-	D,L(D+L)	46	3	Kankainen *et al.*,2009
Lactobacillus sakei subsp. *Sakei*23K	Bacille	Lait, tractus gastro-intestinal et vaginal	25-39	+/-	D,L(D+L)	41	1.9	Chaillou *et al.*,2005
Lactobacillus salivarius UCC118	Bacille	gastro-intestinal et vaginal	25-40	+/-	D,L(D+L)	32	1.8	Claesson *et al.*, 2006
Lactococus lactis subsp.cremoris SK11	Coque chaine, paire	Lait, fromage,yaourt	40	-	L	35	2.4	Makarova *et al.*, 2006
Leuconostoc citreum KM20	Coque isolé	Viande, plante	20-30	+	D	38	1.8	Kim *et al.*, 2008
Leuconostoc mesenteroides subesp. mesenteroides ATCC8293	Coque isolé, chaine, paire	Viande, plante	40	+	D	37	2	Makarova *et al.*, 2006
Oenococcus oeni PSU-1	Coque isolé,chaine	Vin	17-25	+	D	37	1.8	Makarova *et al.*, 2006
Pediococcus pentosaceus ATCC25745	Tétrade	Viande, plante, fromage	30	-	D,L	37	1.8	Makarova *et al.*, 2006
Streptcoccus agalactiae A909	Coque isolé	peau	37	-	L	35	2.1	Tettelin *et al.*,2005
Weissella paramesenteroides ATCC33313	Coque isolé	plante	30	+	D,L(D+L)	37	1.9	Qin *et al.*,2009

+ : Production de dioxyde de carbone (CO_2)/ - : Absence de production de CO_2.
D : L'isomère optique formé de l'acide lactique est de configuration D ; L : L'isomère optique formé de l'acide lactique est de configuration L ; D+L : L'acide lactique est sous forme racémique.
* : Une tétrade est formée lorsque quatre bactéries sont associées entre elles.

- Les études d'hybridation ADN ÷ ADN, puis des structures et des séquences d'ARN ribosomaux sont aussi devenues depuis quelques années des éléments essentiels permettant l'identification et ainsi la classification taxonomique des bactéries lactiques **(Mäkelä *et al.*, 1992, Stanckebrandt et Teuber, 1988, Vandamme *et al.*, 1996, Woese *et al.*, 1990).**

- Une étude basée sur la comparaison des séquences d'ARN 16S et/ ou 23S des bactéries lactiques propose une classification en 3 groupes restreinte à certaines bactéries lactiques :

groupe des *Leuconostoc,* groupe des *Lactobacillus delbrueckii* (*Lb. delbrueckii*) et groupe des *Lb. casei- Pediococcus* **(Rodrigues *et al.*, 1991 ; Vandamme *et al.*, 1996).**

Les bactéries lactiques regroupent de nombreux genres bactériens tels que *Bifidobacterium, Carnobacterium, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Oenococcus, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus, Vagococcus, Weissella*,…**(Figure4**).

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

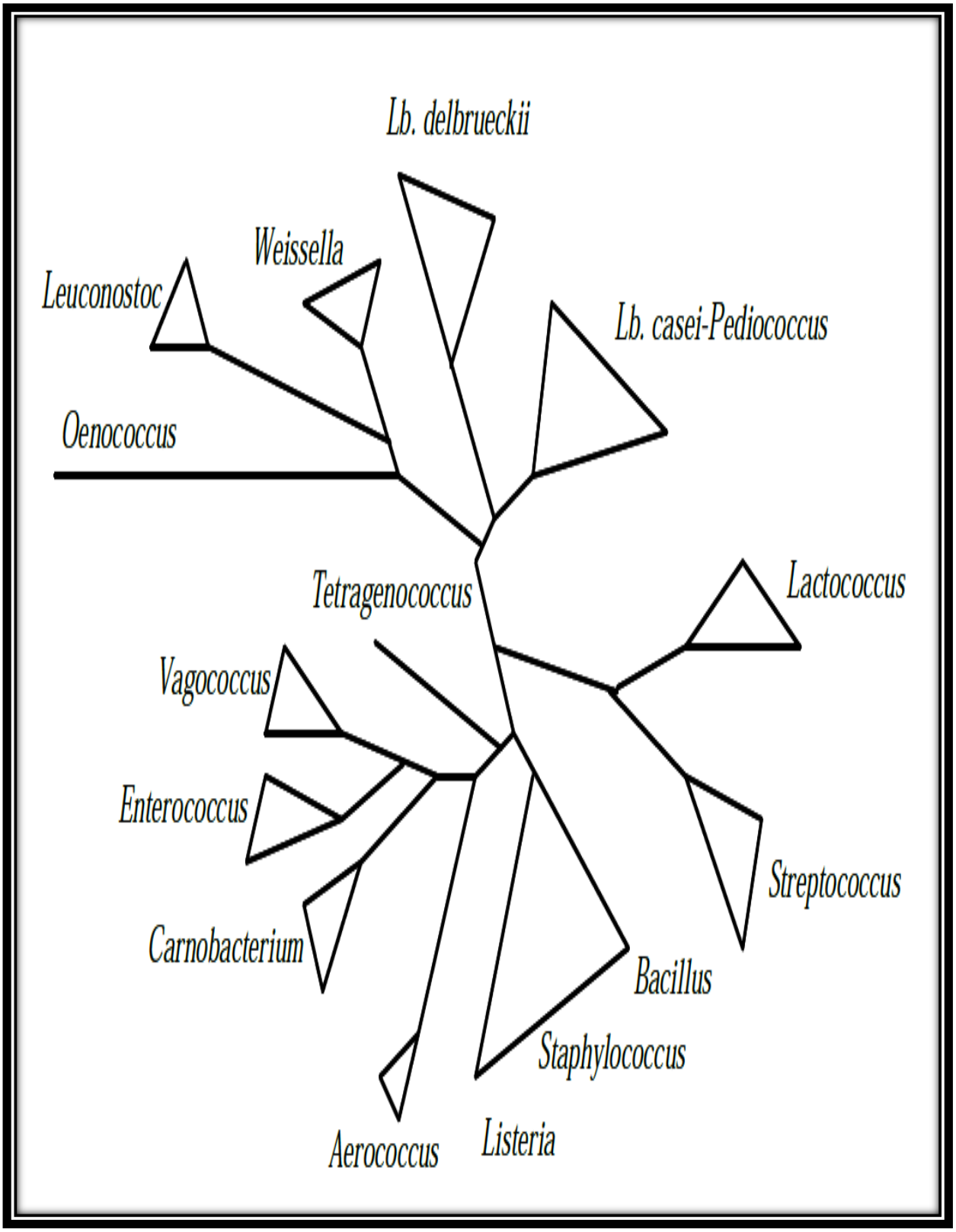


Figure4: Arbre phylogénique des bactéries lactiques et comparaison avec les genres *Aerococcus*, *Bacillus*, *Listeria* et *Staphylococcus* d'après **Axelsson (2004)**.

II. 5 Propriétés métaboliques :

1)Métabolisme des sucres :

Les bactéries lactiques homofermentaires transforment tout le glucose en excès en acide lactique. Le transport du glucose ou du lactose vers les cellules diffèrent selon les espèces. Elles utilisent la voie EMP dans la dernière étape de la glycolyse, convertissent le pyruvate en lactate et régénèrent ainsi du NAD^+ à partir du NADH formé auparavant. Dans cette dernière étape les bactéries font intervenir une lactate-déhydrogénase.

Les bactéries lactiques hétérofermentaires utilisent les voies du galactose-6-phosphate, de la glycolyse et des pentoses phosphates. Le résultat de la fermentation lactique aboutit à la formation de quantité équimolaire de lactate, d'éthanol et de gaz carbonique. Une production de formate et d'acétate peut avoir lieu, notamment en aérobiose **(Kandler, 1983** *;* **Desmazeaud, 1996).**

- **Chez les lactocoques**, les sucres sont transportés par un système actif mettant en jeu une phosphotransférase (PTS) qui phosphoryle les sucres aux dépend du phospho-énolpyruvate (PEP). Le PEP dans ce cas intervient surtout dans le métabolisme des sucres transportés. Le lactose (dans le cas du lait), apparaît dans la cellule sous forme de glucosyl-β-(1-4)-galactoside-6-P (ou lactose-P) et prêt à être hydrolysé par une β-D-phosphogalactosidase (**Lee *et al.*, 1973 ; Molskness *et al.*,1973 ; Thompson, 1979).**
- **Chez les lactobacilles et les *leuconostocs***, le transport du lactose se fait librement par l'intermédiaire d'une perméase, puisque la présence systématique d'une β-galactosidase a été démontrée dans 28 souches **(Somkuti et Steinberg, 1979).** Le glucose et le galactose, issus de la dégradation du lactose sont transformés respectivement en glucose-6-P selon la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas et en galactose-6-P selon la voie du D-tagatose-6-P.
- **Chez les streptocoques thermophiles**, le même système enzymatique de transport, que celui des lactobacilles et des *leuconostocs*, est utilisé mais seul le glucose est rapidement dégradé par la voie de la glycolyse (**Tinson *et al.*, 1982A ; Hutkins et Morris, 1987).**

2)Métabolisme du citrate :

L'acide citrique est utilisé par de nombreuses espèces des genres *Streptococcus* (*Streptococcus thermophilus*), *Lactococcus* (*Lc. Lactis subsp. lactis biovar diacetylactis*), *Enterococcus* (*Ec. faecium*), *Pediococcus, Leuconostoc* (*Ln. lactis, Ln. cremoris*) et

Lactobacillus (*Lb. plantarum. Lb. casei*). Cependant il ne peut être dégradé qu'en présence d'un substrat fermentescible et d'une source d'azote (**Leveau et Bouix, 1993).**

Le citrate est transporté à l'intérieur des cellules par une citrate-perméase, où il est scindé en acétate (en majeure partie excrétés) et en oxaloacétate par le complexe enzymatique citrate-lyase.

L'oxaloacetate est ensuite converti en pyruvate et en CO_2 par une oxaloacétate décarboxylase.

Des transformations successives du pyruvate aboutissent à la formation de composés aromatisants et le produit fini est le 2,3-butylen-glycol (2,3-butanediol) **(Cogan, 1981 et 1982).**

II. 6 Les aptitudes biotechnologiques des bactéries lactiques :

Le secteur des industries agroalimentaires utilise un certain nombre d'auxiliaires technologiques, parmi lesquels les bactéries lactiques, pour élaborer des aliments fermentés.

Elles sont principalement utilisées en tant que starter dans les produits alimentaires fermentés où elles permettent de développer certaines caractéristiques organoleptiques et d'augmenter la durée de conservation **(Abee, 1995 ; Hugenholtz *et al.*, 1999).**

Les cultures *starters* peuvent être définies comme des préparations microbiennes concentrées constituées de un ou plusieurs micro-organismes viables, se caractérisant par des propriétés physiologiques et métaboliques particulières et capables d'induire les changements désirés dans le substrat **(Holzapfel, 1997).**

L'introduction de cultures *starters* de bactéries lactiques au cours de la fermentation doit tenir compte des critères d'amélioration du procédé de transformation et de la qualité des produits à travers :

- une accélération des activités métaboliques (acidification ou production d'alcool),
- l'amélioration et le contrôle du processus de fermentation,
- la formation des caractéristiques organoleptiques désirées,
- une amélioration de la sécurité et la réduction des risques hygiéniques et toxicologiques **(Holzapfel, 1997).**

Selon ce dernier, la sélection des souches doit aussi tenir compte des interactions possibles dans des cultures mixtes, de leur comportement dans des conditions définies et sur la

matière première. Toujours selon le même auteur, d'autres facteurs peuvent aussi intervenir, notamment :

- la compétitivité, la viabilité et la survie,
- l'antagonisme avec les agents pathogènes et la flore microbienne de détérioration,
- le taux de production d'acide ou d'alcool,
- les modifications organoleptiques,
- les métabolites primaires de la fermentation,
- la dégradation des facteurs antinutritionnels,
- la détoxification,
- les propriétés probiotiques.

Les cultures *starters* peuvent être définies comme des préparations microbiennes concentrées constituées de un ou plusieurs micro-organismes viables, se caractérisant par des propriétés physiologiques et métaboliques particulières et capables d'induire les changements désirés dans le substrat **(Holzapfel, 1997).** L'introduction de cultures *starters* de bactéries lactiques au cours de la fermentation doit tenir compte des critères d'amélioration du procédé de transformation et de la qualité des produits à travers :

- une accélération des activités métaboliques (acidification ou production d'alcool),
- l'amélioration et le contrôle du processus de fermentation,
- la formation des caractéristiques organoleptiques désirées,
- une amélioration de la sécurité et la réduction des risques hygiéniques et toxicologiques **(Holzapfel, 1997).**

Selon ce dernier, la sélection des souches doit aussi tenir compte des interactions possibles dans des cultures mixtes, de leur comportement dans des conditions définies et sur la matière première. Toujours selon le même auteur, d'autres facteurs peuvent aussi intervenir, notamment :

- la compétitivité, la viabilité et la survie,
- l'antagonisme avec les agents pathogènes et la flore microbienne de détérioration,
- le taux de production d'acide ou d'alcool,
- les modifications organoleptiques,
- les métabolites primaires de la fermentation,
- la dégradation des facteurs antinutritionnels,
- la détoxification,
- les propriétés probiotiques.

1) Formation de l'arôme et de la saveur :

La conversion des sources en des acides organiques, alcools et autres composés d'arôme tels que des esters et des composés carbonylés a été étudiée au cours de la fermentation lactique pour la production d'aliments et de boissons fermentés. **(Plahar et Leung, 1982 ; Halm *et al.*, 1993).** Ces auteurs ont aussi montré que leur concentration était importante dans l'élaboration du goût acide et piquant ainsi que l'acceptabilité de l'aliment. **Ekundayo, (1969)** faisait observer que le goût piquant des bières « *pito* » et « *burukutu* » pourrait être dû à l'acide lactique produit par les bactéries lactiques présentes dans le moût de fermentation. Les acides oxalique, citrique, malique, lactique, fumarique et propionique ont été détectés durant la phase de fermentation alcoolique et leur présence pourrait être due à l'action des bactéries lactiques.

L'action des bactéries lactiques au cours de la fermentation a aussi un impact sur la valeur nutritionnelle des produits fermentés, à travers la réduction de facteurs antinutritionnels qui affectent la biodisponibilité des minéraux. Récemment, les travaux de **Tou *et al.*, (2006)** ont montré que la réduction de la teneur en phytates (approximativement 95 %) observée, serait due à l'action des bactéries lactiques (ajouté comme ferment au cours de la fermentation). Parallèlement à ces modifications, une meilleure solubilité du fer a été observée, et une corrélation entre la solubilité du fer et les phytates a été établie (R2 = 0,85).

2)Interaction avec d'autres micro-organismes :

Les bactéries lactiques synthétisent des molécules à action bactéricide/bactériostatique comme les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyle, la reutérine et les bactériocines (**De Vuyst et Vandamme, 1994 ; Messens et De Vuyst, 2002)**. Ces mécanismes antimicrobiens ont été exploités pour améliorer la préservation des aliments.

- ✓ **Les acides organiques :**

Les acides organiques comme l'acide lactique, l'acide acétique ou l'acide propionique, sont produits pas les bactéries lactiques au cours de processus de fermentation alimentaire. Leurs effets antimicrobiens sont bien connus à l'heure actuelle **(Davison, 1997 ; Tou *et al.*, 2006 ; Djè *et al.*, 2008).** Ces acides, sous leur forme dissociée ou non dissociée, agissent au niveau de la membrane cytoplasmique en perturbant le maintien du potentiel de membrane et en inhibant les systèmes membranaires de transport actif **(Alakomi *et al.*, 2000 ; Mensah *et al.*, 1991 ; Annan-Prah et Agyeman, 1997).** L'activité antimicrobienne d'un acide organique dépend de sa nature (acide fort, acide faible). L'acide acétique, par exemple, est plus inhibiteur

que l'acide lactique ; il inhibe les levures, les moisissures et les bactéries **(Blom et Mortvedt, 1991).**

- ✓ **Peroxyde d'hydrogène :**

Les bactéries lactiques sont dépourvues de catalases catalysant la décomposition du **peroxyde d'hydrogène** (H_2O_2) en eau et en oxygène. En conséquence, l'H_2O_2 produit s'accumule dans l'environnement et peut inhiber certains microorganismes présents **(Condon, 1987).**

L'action inhibitrice du peroxyde d'hydrogène est principalement due à son fort effet oxydant sur les lipides membranaires et les protéines cellulaires **(Caplice et Fitzgerald, 1999).**

- ✓ **Dioxyde de carbone :**

Les bactéries lactiques hétérofermentaires synthétisent du **dioxyde de carbone** (CO_2) comme métabolite secondaire. Son accumulation dans le milieu extérieur crée une anaérobiose qui peut être toxique pour les microorganismes aérobies présents dans l'aliment. Toutefois, le dioxyde de carbone peut aussi, à faible concentration, stimuler la croissance de certaines bactéries **(Lindgren et Dobrogosz, 1990).**

- ✓ **Le diacétyle :**

Le diacétyle est un produit du métabolisme du citrate qui est responsable de l'arôme « beurre » des produits laitiers. Les bactéries à Gram négatif, les levures et les moisissures sont plus sensibles au diacétyle que les bactéries à Gram positif. Le diacétyle inhibe la croissance bactérienne en interférant probablement avec les mécanismes gouvernant l'utilisation de l'arginine **(Motlagh *et al.*, 1991).** Toutefois, le diacétyle est rarement présent dans l'aliment en quantité suffisante pour y exercer une activité antimicrobienne importante **(Caplice et Fitzgerald, 1999).**

- ✓ **Les bactériocines**

Les bactériocines sont des produits de la synthèse ribosomique bactérienne libérés dans le milieu extracellulaire sous forme native, ou modifiée. Elles possèdent une activité bactéricide à large spectre **(Jack *et al.*, 1995).** Cette définition exclut la substance à activité antimicrobienne produite par *Lactobacillus reuteri*, la reutérine (3-hydroxypropionaldéhyde), de la famille des bactériocines car cette molécule est :

1. Non protéique,

2. Capable d'inhiber également les virus, les champignons, et les protozoaires **(Caplice et Fitzgerald, 1999).**

La capacité à produire des substances antimicrobiennes de type bactériocine est un phénomène commun à de nombreux microorganismes isolés d'aliments fermentés. Un grand nombre de bactériocines ont été caractérisées chez les bactéries lactiques ; elles sont classées dans trois groupes distincts suivant leurs différences structurales **(Cleveland *et al.*, 2001).**

La classe I (lantibiotique) comprend des petits peptides modifiés de façon posttranscriptionnelle qui sont caractérisés par la présence d'acides aminés thioesters modifiés et d'acides aminés insaturés.

La classe II est composée de peptides non modifiés, thermostables.

La classe III comprend, quant à elle, les bactériocines thermolabiles. La plupart des bactériocines produites par les bactéries lactiques partagent le meme mode d'action, basé sur la formation de pores dans la membrane de la bactérie cible **(O'Sullivan *et al.*, 2002)**

L'utilisation de ferments lactiques capables de produire des substances antimicrobiennes comme les bactériocines, pourrait permettre d'améliorer la qualité et la sécurité des aliments fermentés **(Tableau12).**La seule bactériocine dont l'utilisation est actuellement autorisée en tant qu'additif alimentaire est nisine (E234). L'emploi intensif de telles substances est freiné par l'apparition de phénomènes de **résistance (Kuipers *et al.*, 2000).** L'analyse de deux mutants de *Listéria monocytogenes* (pédiocine-résistant et leucocine A-résistant) montre que des systèmes de transport de sucres snt impliqués dans le phénomène de résistances à ces bactériocines **(Gravesen *et al.*, Ramnath *et al.*, 2000).**

Certaines bactéries lactiques appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Pediococcus* sont capables de produire des **molécules à activité antifongique :** des acides organiques (acide propionique, acide phényl-lactique, acide 4-hydroxyphenyl-lactique **(Lavermicocca *et al.*, 2000 ;Magnusson *et al.*, 2003),** des petits peptides cycliques **(Strom *et al.*, 2002 ;Magnusson *et al.*, 2003)** ou des bactériocine-like **(Okkers *et al.*, 1999**).

Tableau12: exemples d'application des bactéries lactiques productrices de bactériocine dans différents produits alimentaire **(d'après O'Sullivan *et al.*, 2002).**

Bactériocine	**Application**	**Résultats**	**Références**
	Produits laitiers et fromages		
Pediocine PA1 (AcH)	-Utilisation d'un *Lc. lactis* producteur de pédiocine en tant que ferment dans la production de cheddar -Utilisation d'un *Lb. plantarum* producteur de pédiocine en pulvérisation à la surface du Munster	-Réduction du nombre de *L. monocytogenes* à 102 UFC/g en 1 semaine -Suppression de la croissance de *L. monocytogenes* après 11 jours de maturation et élimination définitive après 21 jours	-Ennahar *et al.*, 1998 - Buyong *et al.*, 1998
Pediocine 5	Incorporation d'un *P. acidilactici* producteur de pédiocine dans le lait	-Réduction du nombre de *L. monocytogenes* viable	Huang *et al.*, 1994
Enterocine	Utilisation d'un Entérocoque producteur d'entérocine dans la production de Talegior Utilisation d'un *Ent. faecalis* producteur d'entérocine en tant que ferment dans la production de Manchego	-Inhibition de *L. innocua* -Inhibition de *L. monocytogenes* Ohio mais pas de *L. monocytogenes* Scott A	Giraffa *et al.*, 1993 Nunes *et al.*, 1997
Nisine	Utilisation d'un *Lc. lactis* producteur de nisine dans la préparation d'un dessert lacté (quarg)	-Réduction du nombre de -bactéries sporulantes durant la conservation à 4°C et 20°C	Plockovà *et al.*, 1998
Lacticine 3147	Utilisation d'un *Lc. lactis* producteur de lacticine dans la production du « cottage cheese »	-Réduction de 99,9% du nombre de *L. monocytogenes* Scott A *L. monocytogenes* Scott A après 5 jours à 4°C	McAuliffe *et al.*, 1994
	Produits carnés		
Leucocine A	Inoculation du bœuf emballé sous vide avec de *Lc gelium*	-Retard de l'altération de la viande par *Lb. sakei* producteur de sulfites jusqu'à 6 semaines	Leisner *et al.*, 1996
Lactocine 705	Utilisation d'un *Lb. casei* producteur de lactocine pour contrôler la présence de *L. monocytogenes* dans la viande	-Inhibition de la croissance de *L. monocytogenes* dans la viande cuite	Vignolo *et al.*, 1996
Sakacine A	Incorporation d'un *Lb. sakei* producteur de skacine dans la viande hachée et le porc cru	-Inhibition de *L. monocytogenes*	Schillinger *et al.*, 1991

Support-Gratuit.com

3)Propriétés probiotiques :

Fuller(1989) définit les probiotiques comme étant des « préparations microbiennes vivantes, utilisées comme additif alimentaire, ayant une action bénéfique sur l'animal hote en améliorant la digestion et l'hygiène intestinale ». **Guarner et Schhfsma (1998)** proposent de modifier cette définition en incluant tous les « microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en un certain nombre, exercent des effets bénéfique dans le tractus intestinal suffit à conférer un effet positif sur l'hote. Le sujet doit toutefois ingérer 10^9 UFC par jour pour qu'un effet probiotique soit observé **(Ouwehanf *et al.*, 2002)**

En **2001,** un comité d'experts de **l'Organisation des Nations Unies** pour l'alimentation et l'Agriculture (Food and Agricultural Organization, **FAO**) et de **l'Organisation mondiale de la Santé** (**OMS**) définissait les probiotiques comme des micro-organismes vivants, qui, lorsqu'ils sont consommés en quantité suffisante dans l'alimentation, ont un effet bénéfique sur la santé de l'hôte **(Food and Agricultural Organization et World Health Organization, 2001).** Cette dernière définition comprend les hôtes tant humains qu'animaux et ne se limite plus aux activités de la microflore colique, mais concerne aussi d'autres parties du corps et certains paramètres immunologiques. L'aptitude à être actif dans le site d'action visé et à apporter un réel bénéfice pour le consommateur détermine donc la véritable efficacité d'un probiotique. Les souches de bactéries lactiques probiotiques proviennent des aliments et appartiennent principalement aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. Les effets bénéfiques de ces souches probiotiques sur la santé du consommateur, notamment l'amélioration de la digestion du lactose, l'équilibration de la microflore intestinale, la prévention ou le raccourcissement de la durée de la diarrhée (notamment les diarrhées provoquées par le rota virus et par *Clostridium difficile*), la diminution du risque d'allergie alimentaire, la stimulation et la modulation du système immunitaire, l'amélioration de la maladie inflammatoire intestinale et la prévention du cancer n'ont toute fois été démontrées que pour un nombre limité de souches. Ces effets sur la santé peuvent s'expliquer par des mécanismes tels que certaines activités microbiennes spécifiques (production de certaines enzymes ou facteurs de croissance), des interactions microbiennes (production de peroxyde d'hydrogène, acides organiques et peptides antibactériens), des interactions avec l'épithélium intestinal (concurrence pour les récepteurs situés sur l'épithélium intestinal) et des interactions avec le système immunitaire. Si certains de ces effets sur la santé sont déjà largement établis, d'autres ne le sont pas du tout encore **(De Vuyst *et al.*, 2004).**

Les données épidémiologiques des dernières années indiquent que la consommation de bactéries lactiques probiotiques est sans danger pour la santé de l'hôte. Dans un souci de sécurité alimentaire, un ensemble de tests visant à controler l'innocuité des souches probiotiques a été proposé par (**Salminen *et al.*, 1996) (Tableau13)** En l'absence de modèles précis permettant l'évaluation des modes d'actions, les microorganismes employés aujourd'hui comme probiotiques en alimentation humaine doivent :

- Etre résistants aux enzymes pancréatiques, à l'acidité et aux sels biliaires (survie au passage dans le tractus intestinal) ;
- Etre capable d'adhérer aux muqueuses intestinales (rôle immuno-modulateur, exclusion des pathogènes, aide à la guérison des muqueuses, colonisation),
- Etre d'origine humaine (spécificité des intéractions avec l'hote) ;
- Avoir une action prouvée sur la santé ;
- Etre d'origine pour l'hôte ;
- Posséder des bonnes propriétés technologiques (stabilité de la souche, production à grande échelle, tolérance à l'oxygène) **(Ouwehand *et al.*, 2002).**

Tableau 13 : Tests évaluant l'innocuité des bactéries lactiques probiotiques **(d'après Salminen *et al.*, 1996**

Domaines étudiés	**Test d'innocuité à réaliser**
Propriétés intrinsèques	existence de facteurs d'adhésion capacité à résister aux antibiotiques existence de plasmides et de possibilité de transfert plasmidique existence des enzymes nuisibles
Métabolites produits	estimation de la concentration en métabolites estimation de l'innocuité des métabolites existence d'effets autres que probiotiques
Toxicité	estimation des effets (aigus et subaigus) de 'ingestion d'une grande quantité de bactéries test
Effets sur les muqueuses	capacité d'adhésion existence d'un potentiel invasif capacité de dégrader le mucus intestinal capacité à infecter des animaux immunodéprimés (irradiés)
Effet dose-réponse	étude dose-réponse lors d'administration orale sur des volontaires
Evaluation clinique	existence d'effets secondaires potentiels évaluation clinique sur des volontaires bien portants études spécifiques sur la maladie ciblée
Etudes épidémiologiques	surveillance d'une large population après introduction de nouvelles souches probiotiques ou de nouveaux produits probiotiques.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

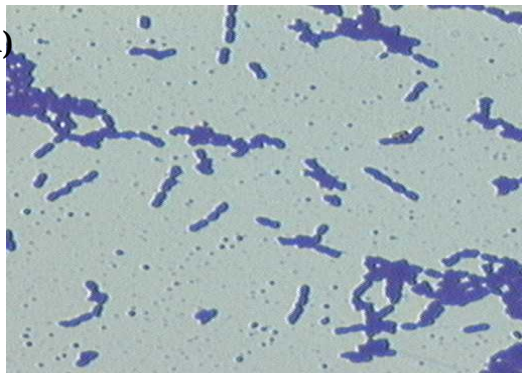
III. Les *Leuconostoc*:

III.1 Définition des *Leuconostoc*:

Les ***Leuconostocs*** (le genre ***Leuconostoc***) sont des bactéries lactiques à Gram positif, de la famille des Leuconostocaceae de l'ordre Lactobacillales. Ils sont reliés sur le plan phénotypique aux *Lactobacillus* et aux *Pediococcus* et partagent beaucoup de caractères avec les lactobacilles hétérofermentaires **(Wilhelm et Wood, 1995***)*.

Le terme scientifique *Leuconostoc* est dérivé du grec *leukos* « clair, blanc » et *nostoc* « algue », car les leuconostocs peuvent apparaître à l'examen microscopique **(Figure5)**, sous forme de cellules sphériques immobiles, non pigmentés souvent lenticulaires après culture sur gélose, regroupées par deux ou en chaînes **(Devoyod J.J. et Françoise Poullain, 1988).**

A)



B)

Figure5: Images de *Leuconostoc*

A)-Observation des *Leuconostoc carnosum* au microscope optique (x100)
B)-Observation des *Leuconostoc lactis* au microscope électronique.

III.2 Écologie :

Les *Leuconostoc* se rencontrent dans la nature et font partie de la microflore de la plupart des champs cultivés. On les retrouve souvent sur les plantes(en particulier la betterave à sucre d'où leur ancien nom de *Betacoccus)* et dans divers aliments comme le lait et les produits laitiers fermentés (fromages, kéfir) **(Devoyod et Poullain, 1988)**, les végétaux fermentés (vin, cidre, olives, choucroute), la viande réfrigérée **(Wilhelm et Wood, 1995)** et le sang humain **(Thunell' R.K. *et al.*, 1995)** et de panification.

Les espèces couramment trouvées dans le lait et les fromages fabriqués au lait cru sont les espèces *L. mesenteroides,* avec les sous-espèces *dextranicum* et *mesenteroides,* puis *L. citreum* **(Cibik *et al.*, 2000).**

Leuconostoc n'est généralement pas considéré comme faisant partie de flore humaine bien que des souches ont été isolées à partir de déchets humaine, des échantillons vaginaux et des échantillons de lait maternel **(Hemme et Foucaud - Scheunmann, 2004).**

III.3 Caractères bactériologiques :

Les *Leuconostoc* "laitiers" se développent le mieux à un pH proche de celui du lait et sont inhibés en milieu acide. Leur croissance s'arrête lorsque le pH interne de la cellule atteint 5,4-5,7 **(Mc Donald *et al.*, 1990).** Le pH externe d'inhibition dépend de la nature de l'acide organique présent **(Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004).** En présence d'acide lactique, des souches sauvages de *Leuconostoc* sp., isolées de fromage au lait cru, ne se développent quasiment plus à un pH de 4,6 **(Sánchez *et al.*, 2005)**. L'activité des *Leuconostocs* "laitiers" aura dès lors lieu en début de fermentation et sera d'autant plus importante que l'acidification du lait est lente.

Les *Leuconostoc* sont généralement mésophiles, avec une température optimale de croissance de 25 - 30°C **;(Garvie ,1984),** et anaérobies facultatifs ; Cependant, l'espèce *Ln carnosum*, isolée de viandes fraîches lors de leur conservation, est une bactérie anaérobie ayant une température optimale de croissance de 2°C. Ils ne produisent pas d'ammoniac à partir d'arginine, et sont hétérofermentaires stricts, produisant à partir des glucides de l'acide lactique du type (D), du CO_2, de l'éthanol et parfois même de l'acétate. Leur pouvoir protéolytique est nul. Ils sont intrinsèquement résistants à la vancomycine **(Tableau14) (Hodwitz *et al.*, 1987; Dyas et Chauhan, 1988).**

Ils sont exigeants du point de vue nutritionnel (acides aminés et vitamines). Les souches ne formant pas de dextranes réclamant plus de huit acides aminés. En particulier, les *Leuconostoc* laitiers nécessitent pour leur développement les trois acides aminés branchés et la glutamine **(Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004),** ainsi que les vitamines acide nicotinique, biotine, thiamine et acide pantothénique **(Garvie ,1984).** Seule, l'espèce *Ln. lactis* est capable d'acidifier le lait ; au contraire, l'espèce *Ln. mesenteroides* n'acidifie le lait que très lentement **(Garvie, 1984)** ou en présence d'extrait de levures **(Sandine *et al.*, 1962).**

Tableau14: Principales caractéristiques physiologiques et biochimiques de quelques espèces de *Leuconostoc* **(Dellaglio *et al.*, 1994)**

Espèces	Croissance dans/à						Gaz a partit de glucose	Isomère de l'acide lactique	Production de dxtrane	Hydrolyse	
	NaCl 3%	NaCl 3%	15°C	30°C	37°C	45°C				Arginine	Esculine
Ln.lactis	±	-	-		+	-	+	**D(-)**	-	-	-
Ln.mesenteroides ssp.crémoris	-	-	+	+	-		+	**D(-)**	-	-	-
Ln.mesenteroides ssp.dextranicum	±	-	+		+		+	**D(-)**	+	-	±
Ln.mesenteroides ssp..mesenteroides	+	±	+		±	-	+	**D(-)**	+	-	±
Ln.paramesenteroides	±	±		+	±		+	**D(-)**	-	-	±

+ : plus de 90% de réactions positives ; - moins de 10% de réactions positives ; ± : réactions positives faibles ou tardives.

Dans le lait, *Ln. mesenteroides* fonctionnent obligatoirement en association avec les *Lactocoque*, qui initient leur croissance **(Vedamuthu, 1994).**

En association, les *Lactocoque* acidifient et les *Leuconostocs* produisent des composés volatils à partir du citrate. Les *Lactocoque* peuvent donc apporter aux *Leuconostoc* des nutriments qui manquent à ces derniers dans le lait. A noter que cette association bénéfique a été décrite au profit de quelques souches de *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris* seulement parmi plusieurs testées **(Vedamuthu, 1994).** Ainsi, les *Leuconostocs* servent peu à acidifier, mais sont complémentaires des *Lactocoque* pour les caractéristiques sensorielles du produit laitier fini (Ouverture et flaveur). Par exemple, ***(Keenan et al., 1966),*** *Ln. citrovorum* s'appelle actuellement *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris* et les streptocoques lactiques sont des *Lactocoque*) ont montré l'importance des interactions

Lactocoque /*Leuconostoc* et du maintien d'un certain rapport entre les *Leuconostoc* et les *Lactocoque* pour que les *Leuconostoc* puissent exprimer pleinement leur métabolisme lors de la transformation de l'acétaldéhyde en éthanol.

Ln. mesenteroides subps. *cremoris* est utilisé comme levain pour le beurre, la crème et les fromages frais, mais n'a aucun intérêt pour les autres fromages car il ne peut pas s'y

maintenir et s'y développer **(Hemme et Foucaud-Scheneumann, 2004)***;* dans les fromages, il est préférable d'ensemencer au moins 10^7 cellules de *Ln. mesenteroides* subps. *dextranicum* ou *mesenteroides* / ml de lait, ou 10^6 cellules/ ml de lait puis de faire maturer le lait pendant 15 h à 13 °C **(Hemme et Foucaud-Scheneumann, 2004***).* Même ainsi et en présence de *Lactocoques, Ln. mesenteroides* subps. *dextranicum* ou *mesenteroides* ne se multiplient pas ou peu dans le lait puis le caillé.

Par ailleurs, les *Leuconostoc* laitiers ont besoin de traces de manganèse pour avoir une croissance et une production de composés de flaveur correcte **(Vedamuthu, 1994).**
Les *Leuconostoc* possèdent un métabolisme de l'O2, revue par **(Hemme et Foucaud-Scheunemann (2004)** qui leur permet de se développer plus vite, d'atteindre une biomasse plus importante et de réduire les quantités d'éthanol produites au profit de celles d'acétate.

III.4 Taxonomie :

Le genre *Leuconostoc* est un groupe de bactéries lactiques, il regroupe 15 espèces **(Figure6)**:

Ln. carnosum ;Ln. citreum ;Ln. durionis ;Ln. fallax ;Ln. ficulneum :Ln. fructosum ;Ln. garlicum ;Ln. gasicomitatum ;Ln. gelidum ;Ln. inhae ;Ln. kimchii ;Ln. lactis ;Ln. mesenteroides ;Ln. pseudoficulneum ;Ln. Pseudomesenteroides **(Gu *et al.*, 2012).**

Leuconostoc.mesenteroides regroupe quatre (4) sous-espèces: *Leuconostoc.mesenteroides subsp cremoris, Leuconostoc mesenteroides subsp dextranicum, Leuconostoc mesenteroides subsp mesenteroides. et Leuconostoc mesenteroides* subsp *suionicum,* proposée et décrite par **(Lee *et al.*, 2012).**

Les espèces couramment trouvées dans le lait et les fromages fabriqués au lait cru sont les espèces *Ln. mesenteroides,* avec les sous-espèces *dextranicum* et *mesenteroides,* puis *Ln. citreum* **(Cibik *et al.*, 2000)**

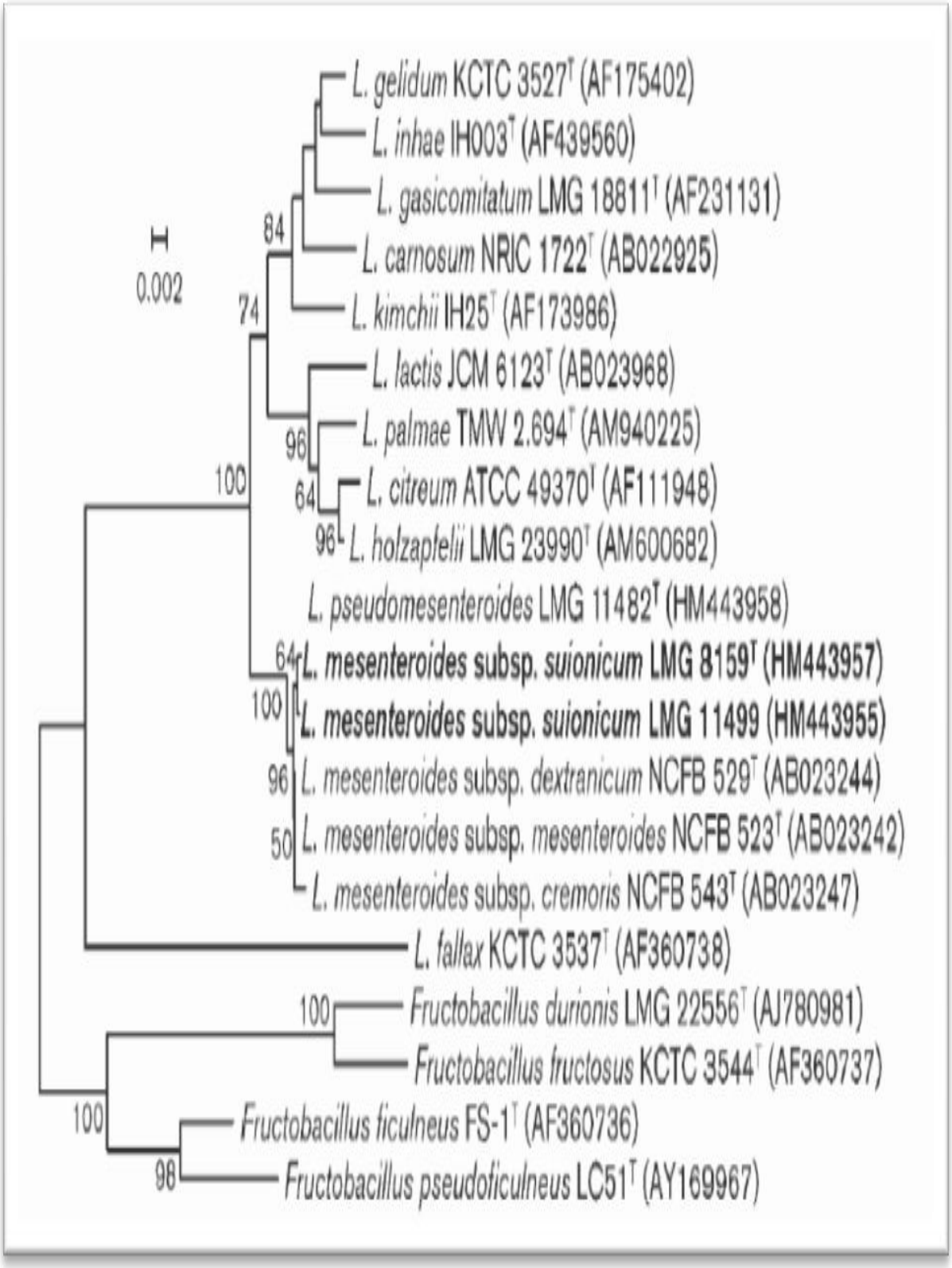


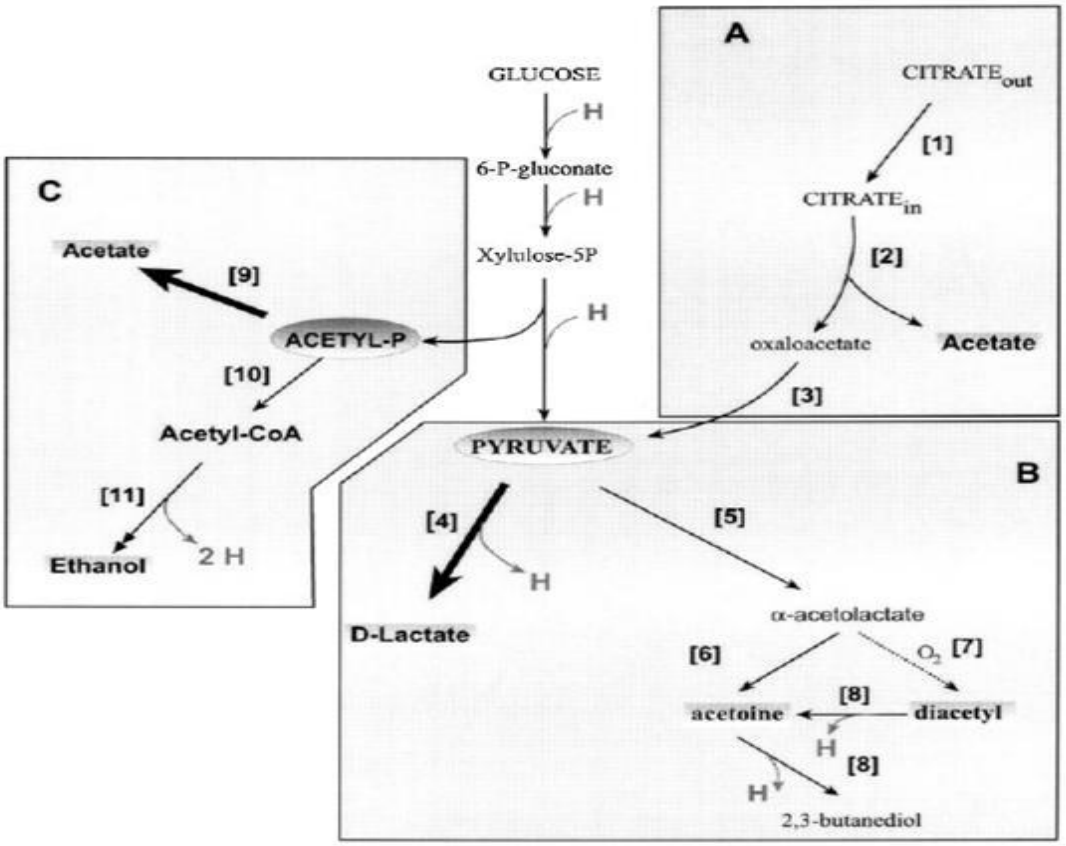
Figure6: Arbre montrant les relations phylogénétiques entre les espèces de leuconostocs selon leur séquence 16S rDNA **(Gu *et al,* 2012)**

III.5 Métabolisme des Leuconostoc :

1)Fermentation des hexoses :

Les bactéries lactiques sont capables de produire de l'acétaldéhyde et de l'éthanol à partir du glucose **(Lees et Jago, 1976).** Trois voies principales existent pour la synthèse de l'acétaldéhyde à partir du glucose: la voie d'Embden-Meyerhof, celle d'Etner Doudoroff et la voie des hexoses monophosphates.

Les *Leuconostoc* fermentent le glucose en utilisant cette troisième possibilité. Ils clivent le xylose-5-phosphate en acétyl-phosphate et en glycéraldéhyde- 3-phosphate par action de la phosphocétolase **(Figure7) (Goldberg *et al.*, 1966).**



1 citrate perméase, 2 citrate lyase, 3 oxaloacétate décarboxylase, 4 lactate déshydrogénase, 5 α-acétolactate synthase, 6 α-acétolactate décarboxylase, 7 décarboxylation non enzymatique, 8 2,3-butanediol déshydrogénase, 9 acétate kinase, 10 phosphotransacétylase, 11 alcool déshydrogénase.

Figure7: Schéma simplifié du cométabolisme sucre-citrate de *Leuconostoc mesenteroides* **(Bourel *et al.*, 2001).**

Les Leuconostocs ne peuvent pas décarboxyler directement, comme certain microorganismes, le pyruvate en acétaldéhyde car ils ne possèdent pas de pyruvate décarboxylase *(***De moss *et al.*, 1951)**. La réduction de l'acétate et de l'acétaldéhyde est l'un des mécanismes principaux de la réoxydation de pyridine nucléotide réduite chez *L. mesenteroides* **(Galesloot, 1962***).*

L. mesenteroides possède deux alcool-déshydrogénases **(De moss, 1954).**

L'acétate est le principal produit terminal du métabolisme des hexoses des souches de Leuconostocs par voie oxydative **(Ito *et al.*, 1983).**

Selon **Lucey et Condon (1986)** les cultures aérées de Leuconostocs croissent plus vite et produisent plus de biomasse, aux dépens du glucose et d'autres sucres, que les cultures non aérées. Ces dernières ne produisent que peu ou pas d'acétate.

2)Fermentation des citrates et acides carboxyliques :

Les *Leuconostocs* ne peuvent utiliser le citrate comme seule source d'énergie (comme *Str. lactis subsp. diacetylactis),* ils ne peuvent le métaboliser qu'en présence d'un sucre fermentescible **(Kempler et Mckay, 1981).**

D'autres espèces de *Leuconostocs* sont capables d'utiliser le citrate mais sans produire de diacétyle ni d'acétoïne. La presque totalité des 210 souches de *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* et *Ln. mesenteroides* ssp. *dextranicum* isolées par des produits laitiers, du matériel et de la vaisselle laitière, donnaient une réaction positive lorsqu'elles étaient cultivées sur le milieu de **Kempler et Mckay (1980)** mais elles ne produisaient pas d'acétoïne lorsque nous utilisions la technique de **Swartling (1951).** Par contre les deux souches de *Str. lactis* ssp. *diacetylactis* et *Ln. cremoris* utilisées comme témoins donnaient, dans les mêmes conditions de culture, un résultat positif. En technologie laitière il est reconnu que le principal rôle des *Leuconostocs* est de produire des composés d'arôme; c'est la raison pour laquelle les voies métaboliques d'utilisation du citrate par *Ln.mesenteroides* ssp. *mesenteroides* ou *Ln. mesenteroides* ssp. *dextranicum* n'ont pas été étudiées.

Radler et Brohl, (1984) ont montré que *Ln. mesenteroides* étaient capables de métaboliser plusieurs acides carboxyliques: fumarate, gluconate, malate, 2-oxoglutarate et pyruvate. Ce dernier acide est métabolisé sans formation de diacétyle ou d'acétoïne comme le fait *L. cremoris* **(Hegazi et Abo-Elnaga,1980).**

III.6 Les aptitudes biotechnologiques de *Leuconostoc :*

1)Production de dextranes :

De nombreux microorganismes sont capables de produire des exopolysaccharides c'est-à-dire des polysaccharides à l'extérieur de la paroi cellulaire qui sont, soit attachés à cette paroi sous forme de capsule, soit excrétés dans l'environnement extracellulaire sous forme de gomme. **(Sutherland,1982)** a classé les exopolysaccharides selon leur composition.

Le premier groupe comprend les dextranes et polysaccharides voisins. Ce sont des homopolysaccharides produits par des bactéries utilisant le saccharose comme substrat spécifique. Les bactéries qui synthétisent de tels polymères comprennent, entre autres, des espèces du genre *Streptococcus* et *Leuconostoc.* En absence de saccharose (ou de substrats très voisins) ces bactéries peuvent se développer mais ne peuvent former de polysaccharides. Les dextranes ont une grande importance dans l'industrie, la médecine et la recherche et de nombreuses études ont été faites sur la production de dextrane par *Ln. mesenteroides,* mais toutes ces études portent essentiellement sur des souches isolées de sucrerie ou plus exactement de matière première de sucrerie (mélasse ou bagasse). Les polymères produits varient énormément dans la longueur des chaînes et le degré de liaison.

L'activité des dextrane-sucrases de *Ln. mesenteroides* a pour résultat la formation de dextranes de bas poids moléculaire et d'oligosaccharides **(Robyt et Walseth,1978).** Les dextrane-sucrases de *Ln. mesenteroides* sont inductibles **(Kobayashi et Matsuda,1974***)* et de ce fait ne peuvent être produites en l'absence de saccharose à l'inverse de ce que l'on rencontre pour les dextranesucrases de *Str. sanguis* et *Str. mutans.* Par examen au microscope électronique **(Brooker, 1977)** a montré que la paroi cellulaire de *Ln. mesenteroides* qui présente la structure classique à trois couches des bactéries Gram-positives lorsque ce microorganisme est cultivé en bouillon MRS **(De Man *et al.*, 1960)** est modifiée en présence de saccharose. Après deux heures de contact, il se forme une couche uniforme à la surface de la paroi cellulaire (110 à 130 nm d'épaisseur). Pour 85 à 90 % des cellules maintenues en présence de saccharose aucun changement apparent n'est notable, par contre les autres cellules commencent à accumuler des dextranes capsulaires insolubles à la surface de cette couche uniforme. Après 18 heures, ces cellules produisent une capsule (diamètre maximum 6 urn) composée principalement d'un ample réticulum de filaments fins. Pour **(Brooker, 1976)** la couche extérieure dérive du dextrane globulaire de la capsule selon un processus de dispersion. Cette couche superficielle des cellules croissant en

Rapport-Gratuit.com

présence de saccharose, représente un complexe dextrane fixé à la cellule. Les cellules ne présentant pas cette capsule produisent du dextrane relativement soluble ce qui avait été déjà noté par **(Smith, 1970).** D'après **(Garvie, 1984)**, *Ln. mesenteroides* se développe bien sur milieu contenant du saccharose et forme de grandes quantités de dextrane, tandis que *Ln. dextranicum* est moins actif et forme seulement de petites quantités de dextrane. Parmi les *Leuconostocs* producteurs de dextrane que nous avons étudié, nous avons pu différencier, parmi *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides,* deux types de colonies sur le milieu au saccharose de **(Mayeux, Sandine et Lliker, 1962) :**

a) de grosses colonies gluantes, devenant rapidement confluentes au fur et à mesure que l'incubation se prolonge;

b) de petites colonies (2 mm environ de diamètre) bombées et adhérant fortement à la surface de la gélose.

Ces différences morphologiques correspondent à des différences nettes dans la viscosité mesurée après incubation en bouillon saccharosé à 10 % (quelques centipoises pour les Leuconostocs de la première catégorie, viscosité supérieure à 30 centipoises pour les autres).

Les souches du 2eme groupe ne représentent qu'une petite fraction des Leuconostocs producteurs de dextrane isolés des produits laitiers, de l'ordre de 2 à 3 % **(Coé et Robyt, 1983)** .

Il est donc possible pour *Ln. mesenteroides* de produire des dextranes de structure et de composition très différentes d'autant qu'il existe une relation biosynthétique entre les dextranes solubles et les dextranes insolubles produits par une même souche de *Ln. mesenteroides* **(Smith, 1970)** et que la dextranesucrase de ce microorganisme peut prendre des formes multiples **(Kobayashi et Matsuda, 1986).**

La production de dextrane à partir de saccharose est un caractère important de différenciation des espèces de *Leuconostoc* **(Garvie, 1967).**

(Pederson et Albury, 1955) ont montré que des souches de *Ln. mesenteroides* non productrices de dextranes, souches isolées de choucroute, retrouvaient ce caractère après plusieurs repiquages en milieux acides contenant soit du jus de tomate, soit du jus d'orange. Inversement, des souches productrices de dextrane perdaient ce caractère après plusieurs repiquages successifs dans des milieux de concentration croissante en chlorure de sodium (les dextranesucrases de *Leuconostoc* sont inductibles).

Le dextrane est un groupe de polysaccharides de haut poids moléculaire qui sont synthétisés à partir du saccharose et composée par des chaines d'unités de D-glucose (**Kim et Robyt, 1995 in : Shah Ali UL *et al.*, 2005).**

Les dextranes industriels sont actuellement utilisés dans la fabrication de gel de filtration et comme diluant de volume sanguin et améliorant de la circulation sanguine **(Hemme *et al.*, 2004).** En technologie laitière, le dextrane comme autre exopolysacchrides, est utilisé comme additif alimentaire, comme gélifiant par l'augmentation de la viscosité et comme stabilisant à travers le renforcement de rigidité du réseau de la caséine. En conséquence, les EPS améliore la stabilité du produit, ils jouent un rôle important dans la fabrication des laits fermentés, les crèmes, dessert à base du lait et du lait aromatisé **(Pucci *et al.*, 1995; Duboc *et al.*, 2001 ; Cooke *et al.*, 2002., Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004).**

2)Production de substances inhibitrices :

L'antibiose est le résultat d'un antagonisme entre des microorganismes au détriment de l'un d'entre eux. En technologie laitière, l'antibiose est bénéfique dans certains cas, néfaste dans d'autres. Si une association de microorganismes provoque l'inhibition d'un germe pathogène ou d'un organisme capable d'altérer un produit laitier, l'antibiose sera favorable. Par contre, si une association de microorganismes empêche le développement d'organismes utiles, elle sera nuisible.

L'effet antimicrobien dû aux bactériocines produites par *Leuconostoc* sp. a été observé pour la première fois dans les années 90 **(Ahn et Stiles, 1990).** Plus tard, différentes bactériocines produites par *Leuconostoc* sp. ont été isolées (**Tableau15**) parmi lesquelles quelques unes ont été caractérisées (**Figure 8**).

Parmi ces bactériocines, la leucocine A-UAL 187, produite par *Ln. gelidum* A-UAL 187 **(Hastings *et al.*, 1991),** la leucocine B-Ta11a produite par *Ln. carnosum* Ta11a **(Felix *et al.*,1994),** la mésentéricine Y105 produite par *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* Y105 **(Héchard *et al.*, 1992),…** (**Figure 8**). Depuis, de nouvelles bactériocines ont été et sont toujours découvertes **(Sawa *et al.*, 2010).** La détermination des séquences peptidiques des bactériocines produites par *Leuconostoc* sp. a permis de montrer qu'elles faisaient

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

partie de la classe II et présentaient, par conséquent, une activité antimicrobienne dirigée contre des bactéries pathogènes incluant en particulier *Listeria* sp. **(Stiles, 1994)** (**Figure 8**). En se basant sur les homologies de séquences observées (**Figure8**) nous pouvons constater que les bactériocines produites par *Leuconostoc* appartiennent à deux classes (classeIIa ou classe IId). Les leucocines A (UAL-187 et TA33a) et les leucocines B-Ta11a et AQU15 ont la même séquence en acides aminés et ne diffèrent que par la séquence de la région leader de leurs précurseurs. Les séquences en acides aminés des leucocines A et B sont homologues à 95% à celle de la mésentéricine Y105 et s'en distinguent seulement par la région leader du précurseur et deux acides aminés de la bactériocine proprement dite. La leucocine C (-TA33a) se différencie des leucocines de classe IIa par la séquence de sa région *C*-terminale. En se basant sur les homologies de séquences, deux sous-groupes se dessinent à l'intérieur des bactériocines de classe IId produites par des *Leuconostoc*. D'une part les leucocines Q et N et d'autre part la mésentéricine B105 et la leucocine B-TA33a. Les fortes homologies de séquences peptidiques entre les bactériocines produites par *Leuconostoc* sp. suggèrent la possibilité d'un transfert génétique horizontal des clusters de gènes impliqués dans la biosynthèse des bactériocines entre bactéries du même genre.

Il a été montré que les bactéries du genre *Leuconostoc* renfermaient un ou plusieurs plasmides de différentes tailles **(Dessart et Steenson, 1995).** Ces plasmides portent différents systèmes génétiques parmi lesquels celui impliqué dans la biosynthèse des bactériocines **(Dessart et Steenson, 1995, Fremaux *et al.*, 1995).**

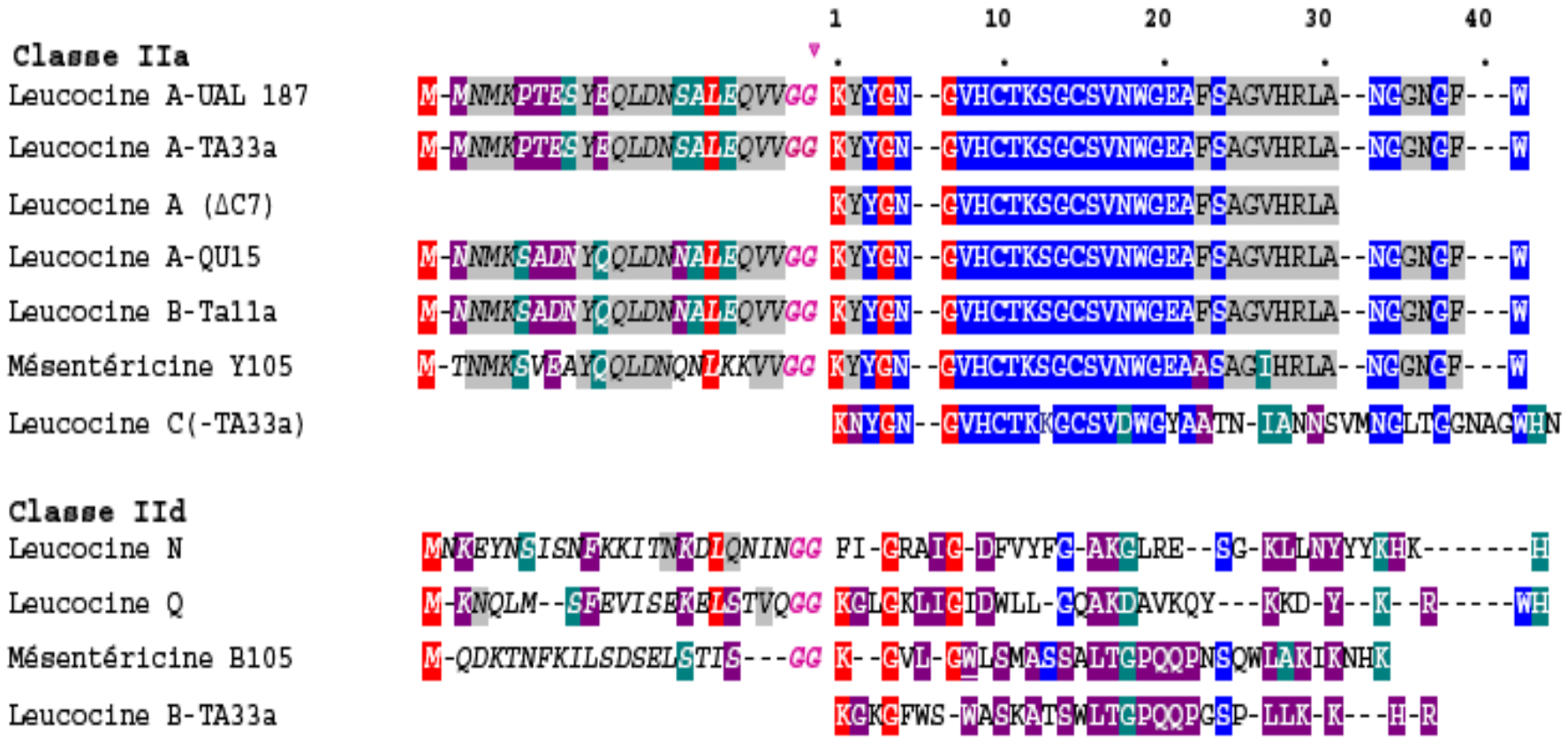


Figure 8 : Alignement de séquences peptidiques des bactériocines produites par *Leuconostoc* sp.

Sont surlignés en rouge, les acides aminés conservés à 80-100 % ; en bleu les acides aminés conservés à 60-80 % ; en gris, les acides aminés conservés à 40-50 % ; en vert les acides aminés conservés à 20-30 % et en violet les acides aminés conservés entre deux bactériocines. La séquence peptidique spécifique au précurseur de la bactériocine est représentée en italique, les séquences des précurseurs de bactériocines manquantes indiquent que le gène codant la bactériocine n'a toujours pas été identifié. Le site de clivage (motif GG) est représenté en violet.

: Site de clivage

Tableau15 : Bactériocines produites par des bactéries du genre Leuconostoc.

bactériocine	Bactérie productrice	classe	Origine	Référence
Leucocine 4010(AetB)	*Leuconostoc* carnosum4010	II a	Viande	(Budde *et al.*, 2003)
LeucocineA-UAL187*	*Leuconostoc g elidum A-UAL187*	IIa	Viande	(Hastings et al., 1991)
LeucocineB-Talla*	*Leuconostoc carnosum Talla*	IIa	Viande	(Felix *et al.*,1994)
LeucocineA-TA33a*	*Leuconostoc mesenteroidesTA33a*	IIa	Viande	Papathanasopoulos *et al.*,
LeucocineB-TA33a*	*Leuconostoc mesenteroidesTA33a*	IIa	viande	1998)
Leucocine C(-TA33a)2*	*Leuconostoc mesenteroidesTA33a*	IIa	Viande	(Fimland *et al.*, 2002a)
Leucocine A(Δ C7)*	*Leuconostoc pseudomesenteroidesQU15*	IIa	Riz	(Fimland *et al.*, 2002a)
Leucocine A-QU15*	*Leuconostoc pseudomesenteroidesQU15*	IIa	Riz	
Leucocine Q*	*Leuconostoc pseudomesenteroidesQU15*	IId	Riz	(Sawwa *et al.*, 2010).
Leucocine N*	*Leuconostoc pseudomesenteroidesQU15*	IId	Riz	
LeucocineH'(α etβ)	Leuconostoc MF 215B	IIb	ND	(Blom *et al.*, 1999)
LeucocineJ	Leuconostoc sp.J2	ND	Kimchi[1]	(Choi *et al.*, 1999)
Kimchicine GJ7	Leuconostoc citreum GJ7	?	Kimchi	(Chang *et al.*, 2007)
Mésentérocine 52A	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides FR52.	IId	Lait	
Mésentérocine 52B	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides FR52	IId	lait	(Revol-Junelles *et al.*, 1996)
MésentérocineST99	Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum ST99	ND	Boza	
MésentérocineY105*	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides Y105	IIa	Lait fermenté	(Todorov et Dicks, 2004)
MésentérocineB105*	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides Y105	IIa	Lait fermenté	(Héchard *et al.*, 1992)
				(Héchard *et al.*, 1992)

3)Pouvoir acidifiant :

Le pH normal du lait est de 6,6. La plupart des microorganismes du lait sont capables de fermenter le lactose en produisant une acidification qui entraine la coagulation de la caséine. Cette coagulation se produit à partir du pH 4,6. Les fermentations microbiennes responsables de l'acidification sont de type homo ou hétérolactique **(Guiraud ,2003)**.

Les *Leuconostoc* produisant à partir des glucides de l'acide lactique du type (D), du CO2, de l'éthanol et parfois même de l'acétate. Seule, l'espèce *Ln. lactis* est capable d'acidifier le lait ; au contraire, l'espèce *Ln. mesenteroides* n'acidifie le lait que très lentement **(Garvie, 1960).**

La présence de *Leuconostoc* stimule également la croissance des *Lactococcu*. Ces deux raisons expliquent pourquoi on inclut les *Leuconostoc* dans les starters de fermentation pour la production de beurre ou de fromages. **(Savadogo et Traore, 2011).**
Dans le lait, *Ln. mesenteroides* fonctionnent obligatoirement en association avec les *Lactocoqus*, qui initient leur croissance (**Vedamuthu, 1994**). En association, les *Lactocoque* acidifient et les *Leuconostoc* produisent des composés volatils à partir du citrate. Les *Lactocoque* peuvent donc apporter aux *Leuconostoc* des nutriments qui manquent à ces derniers dans le lait.

A noter que cette association bénéfique a été décrite au profit de quelques souches de *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris* seulement parmi plusieurs testées **(Vedamuthu, 1994).** Ainsi, les *Leuconostoc* servent peu à acidifier, mais sont complémentaires des *Lactocoque* pour les caractéristiques sensorielles du produit laitier fini (ouverture et flaveur) **(Bellangier *et al.*, 1999; Admanabhan et Kim, 2002 in :Kihal *et al.*, 2009).**

4) Pouvoir gazeux :

Leur métabolisme du citrate et des oses participent à l'aromatisation des produits laitiers fermentés. Leur production d'acide acétique, de diacétyl et de CO_2, en inhibant les bactéries psychrotrophes, permettrait d'augmenter la durée de vie de fromages **(Vedamuthu, 1994).**

Les *Leuconostoc* sont utilisés pour améliorer l'ouverture des fromages.

Par leur production de CO_2, les *Leuconostoc* jouent un rôle important dans la fabrication du roquefort. Pour que la moisissure de *Penicillium* puisse se développer dans le fromage et lui donner son aspect persillé, il est nécessaire que le caillé soit « ouvert ». Suivant *Devoyod et Muller ,1969 ;* l'ouverture que l'on observe au cours des 48 premières heures qui suivent l'emprésurage, semble être due à l'action des *Leuconostoc* (*Ln. mesentoroides* subsp. *dextranicum* et *Ln. mesentoroides* subsp. *mesenteroides* sont les deux sous-espèces dominantes).

Pour **Stadhouders*(1986*),** lorsque l'on recherche des ouvertures dans le fromage l'emploi de levains BD est préférable car les levains BD montrent dans le fromage une fermentation de l'acide citrique plus active et par conséquent produisent plus de CO_2 donc plus d'yeux que les levains B (ouverture normale des fromages d'Edam et de Gouda). Dans ce cas on utilise des souches de *Ln. cremoris* qui sont des souches faibles productrices de gaz dans le lait.

5)Utilisation des *Leuconostoc* comme levains d'arôme :

La production de diacétyle et d'acétoïne est sans doute le caractère le plus utilisé des *Leuconostoc* **(Cogan, 1975***).*

Les cultures pures de *Leuconostoc* utilisent le citrate très rapidement, par contre elles ne produisent du diacétyle et de l'acétoïne que tardivement, lorsque le milieu est devenu suffisamment acide **(Hemme. Foucaud-Scheunemann, 2004).**

Les *Leuconostoc* entrent couramment dans la composition de levains utilisés pour la fabrication de nombreux produits laitiers, tels le fromage de Roquefort **(Devoyod *et al.*, 1988),** le fromage de Laguiole **(Didienne *et al.*, 1978),** le fromage de Manchego **(Ramos *et al.*, 1981). Mostert et Hus- Mann (1975)** ont trouvé des Leuconostocs dans des levains commerciaux utilisés pour la fabrication du Gouda en Afrique du Sud.

Les Leuconostoc rentrent dans la composition de la flore bactérienne des levains lactiques mésophiles. **(Cogan ,1980)** subdivisent les levains mixtes en quatre groupes selon leur composition en bactéries d'arôme:

- les levains du type B (B comme *Betacoccus)* contiennent des Leuconostocs producteurs d'arôme tels que *L. cremoris, L. dextranicum* et/ ou *L. lactis ;*
- les levains du type D contiennent *S. lactis subsp. diacetylactis* comme producteur d'arôme;

- les levains du type BD contiennent à la fois des Leuconostocs et *S. lactis subsp. diacetylactis* comme producteurs d'arôme;
- les levains du type N ou 0 ne contiennent pas de bactéries aromatiques.

Les principales fonctions demandées aux levains lactiques sont d'après **(Stadhouders, 1974):** la production d'acide, la protéolyse, la lipolyse, la production de gaz et d'arôme et l'inhibition des bactéries indésirables (pathogènes entre autres).
C'est pourquoi les *Leuconostocs* sont toujours utilisés dans des levains mixtes en association avec des bactéries lactiques acidifiantes, notamment des lactocoques **(André Eck *et al.*, 2006).**

6)Utilisation des *Leuconostoc* Pour éliminer certains défauts de goût :

L'acétaldéhyde est un produit du métabolisme des streptocoques lactiques mésophiles. Les souches de *Str. diacetylactis* en produisent plus que *Str. Lactis* ou *Str. cremoris.* Une petite quantité d'acétaldéhyde est reconnue comme participant à l'obtention d'un bon arôme; par contre une surproduction de ce composé par rapport au diacétyle provoque un défaut dit de «vert» ou d'« âcre» **(Lindsay *et al.*, 1965).** Ce défaut peut être ralenti par l'emploi de souches de levains qui métabolisent l'acétaldéhyde. Parmi les microorganismes qui rentrent dans la composition des levains *Ln. mesentoroides* s'est trouvé être le plus actif **(Keenan et Lindsay, 1966 ; Lawrence *et al.*, 1976).** Selon **Keenan *et al.* (1966)** il est possible d'éliminer le défaut de «vert» d'une culture de bactéries lactiques en utilisant les *Leuconostoc* ; mais pour cela il est nécessaire d'en ajouter une grande quantité. L'addition de petites quantités d'une culture de *Ln. mesentoroides* à une culture de bactéries lactiques n'a que peu d'effet sur la teneur en acétaldéhyde de la culture maturée parce que la population de *Leuconostoc* est très faible par rapport à celle de bactéries lactiques. Les quelques cellules de *Leuconostoc* sont vraisemblablement rapidement surpassées par les *streptocoque* qui métabolisent activement, et elles doivent s'adapter pour se développer et croître dans de nouvelles conditions **(Kozak *et al.*, 1978).**

7)*Leuconostoc* comme agent contaminé :

Ils ont été associés à des défauts de présentation, gonflement, de certaines variétés de fromages **(Devoyod J.J. et Françoise Poullain, 1988).**

Certaines espèces peuvent produire des amines biogènes qui peuvent provoquer des intoxications alimentaires, comme cela a été rapporté dans les vins **(Moreno - Arribas *et al.*, 2003)**. Par contre, aucune étude, à notre connaissance, n'a identifié d'amines biogènes produites par les *Leuconostoc*s dans les fromages **(Gonzalez de Llano *et al.*, 1998 ; Bover-Cid and Holzapfel, 1999).**

Ils provoquent des altérations dans les boissons sucrées et les sirops, mais ils ne sont ni hémolytiques ni pathogènes. Les *Leuconostocs*, cités parfois comme des pathogènes opportunistes chez l'homme, sont cependant reconnus comme inoffensifs et peuvent donc être utilisés pour fermenter des produits laitiers **(Ogier et Serror, 2008).**

Quelques autres espèces Leuconostoc peuvent induire une altération par production de composés indésirables (amines biogènes) dans les aliments, ou dextrane dans les processus de fermentation du sucre **(Hemme et Foucaud-Scheunmann, 2004)**

IV. Matériel et méthode :

IV. 1Provenance des échantillons :

Les échantillons de lait cru de chèvre et de chamelle proviennent de la localité d'**El Kheiter** une commune de la wilaya d'El Bayadh de l'ouest de l'Algérie.

Le matériel de prélèvement est constitué de deux flacons de 250 ml stériles contenant le lait placés dans une glacière avec des outres réfrigérées. A fin d'assurer une température de 4°C au cours du transport jusqu'au laboratoire de microbiologie appliquée de l'université d'Oran Es-Sénia, ne dépassant pas les 24h après le prélèvement.

IV. 2Les bactéries utilisées :

Les souches tests utilisées sont les bactéries pathogènes à gram positif :

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Escherichia coli* ATCC 25922

Proviennent du l'hôpital d'Oran.

Les souches suivantes :

- *Listeria ivanovii* ATCC 19119.
- *Listeria innocua* ATCC 33090.
- *Lactobacillus plantarum*. (Lb58,Lb68)

Proviennent du laboratoire da la microbiologie appliquée (LMA) de l'université d'Oran ES - Senia.

IV. 3 Isolement et caractérisation des souches de *Leuconostoc :*

1)Préparation de l'échantillon :

1ml de l'échantillon est pipeté aseptiquement dans 9ml d'eau physiologique et des dilutions décimales sont réalisées (10^{-1} à 10^{-7}) seules les dilutions ,10^{-4},10^{-5},10^{-6},10^{-7} sont retenues et ensemencées en profondeur sur boites (1ml).

Rapport-Gratuit.com

2)Milieux d'isolement :

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

On utilise communément la capacité à consommer le citrate, ou la capacité à résister à la vancomycine (milieu MRS + 30µg/ml vancomycine **(Mathot *et al.*, 1994)** ou la capacité à produire du dextrane à partir de saccharose (milieu MSE; **Mayeux *et al.*, 1962**).

Dix colonies typiques à savoir leur apparence macroscopique (une forme circulaire de contour régulier, très petite de taille environ 0.5 et 1mm) sont isolées de chaque échantillon à partir des boites contenant le milieu MRSV et repiquées dans le bouillon MRS et incubé à 30°C.

Après incubation ces cultures sont réensemencées sur le milieu MRSV solide (en stries).

La purification des bactéries isolées a été établie par la réalisation des subcultures sur bouillon (apparition de trouble dans le milieu liquide) et milieu MRS solide jusqu'à l'obtention des colonies bien distincte et homogène. (Selon le plan dans la **figure9**)

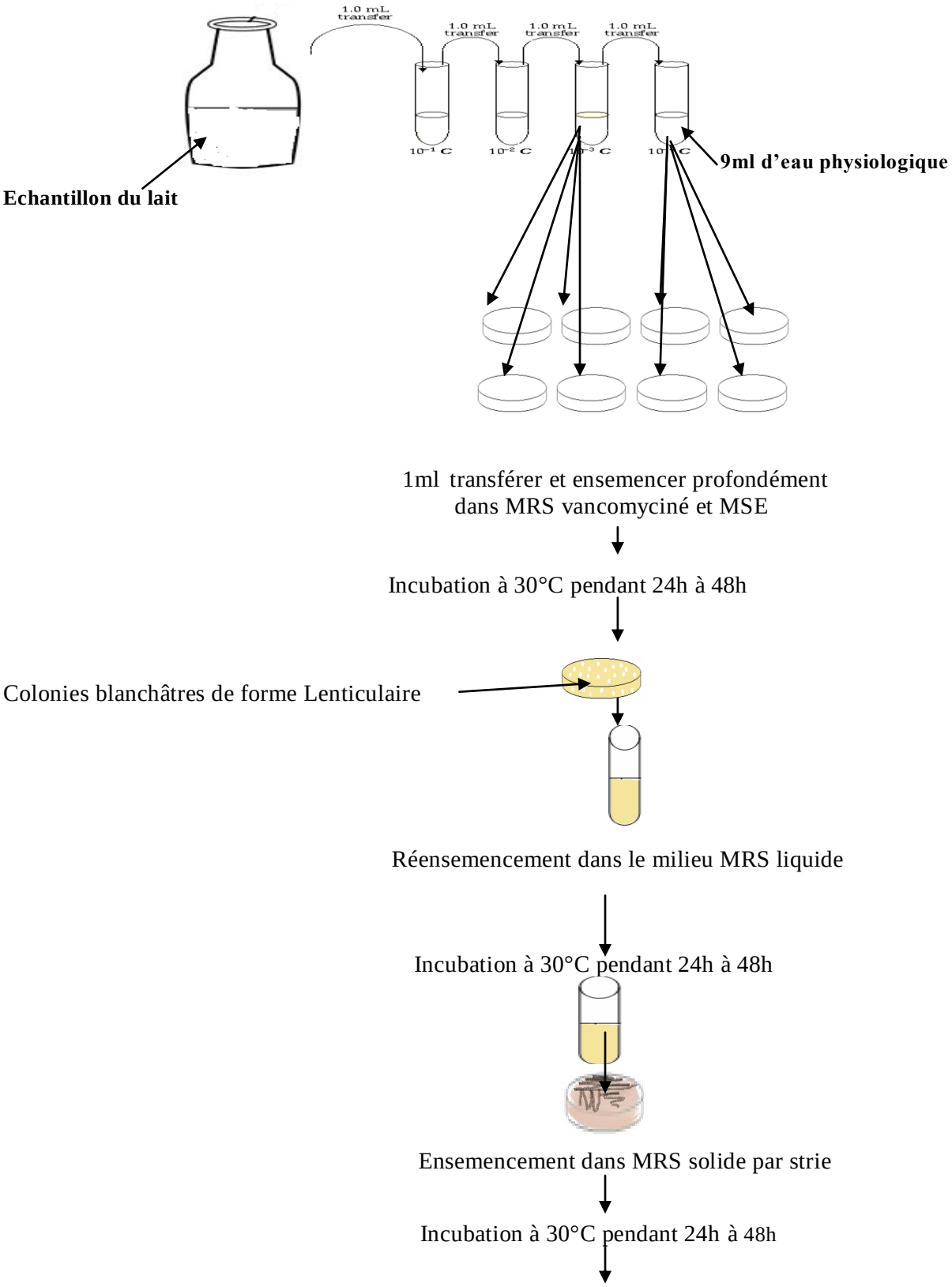


Figure 9 : Schéma résumant la méthode utilisée pour l'isolement et la purification des souches.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Les colonies subissent deux tests comme une pré-identification :

3)La coloration de Gram (Larpent et Larpent, 1990) :

La coloration de Gram est une coloration classique en microbiologie. Elle permet de distinguer deux (2) types de bactéries, les bactéries Gram négatifs (G-) et les bactéries Gram positives (G+). Celles-ci diffèrent de part la composition de leur paroi, notamment par l'épaisseur du peptidoglycane, ou la présence d'une membrane externe.

Technique :

- La première étape de la coloration consiste à réaliser une suspension en eau physiologique à partir d'une culture jeune (sur un milieu solide) et prélever un aliquote de suspension à l'anse de platine (ou à la pipette stérile) puis on étale sur 1 à 2 cm par un mouvement circulaire en partant du centre de la lame ;
- La seconde étape nécessite le séchage et la fixation par la chaleur (pour tuer les bactéries, fixer leur structure cytologique, et les faire adhérer à la lame).
- La troisième étape nécessite quelques gouttes de violet de gentiane sur un frotti fixé pendant une minute, après rinçage, on ajoute de Lugol (solution aqueuse d'iode et d'iodure de potassium) pendant 30 secondes ;
- La quatrième étape, à savoir le bain d'alcool 90°, (ne va traverser que la paroi de certaines bactéries « les Gram⁻ », et décolorer leur cytoplasme). Puis on rince avec de l'eau distillée.
- En fin, quelques gouttes de fuchsine de Ziehl sont versées sur la lame qu'on laisse agir une minute. La lame est lavée à l'eau distillée. Après séchage, on passe à l'observation microscopique.

Les *Leuconostocs* sont généralement des cocci ovoïdes et se regroupe en paire et chaînette ***(*Rodolphe *et al., 2002 ;* Khedid *et al., 2006).***

4)Test de la catalase (Marchal *et al.*, 1991) :

La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), produit toxique du métabolisme aérobie de nombreuses bactéries, en H_2O et 1/2 O_2.

$$H_2O_2 \longrightarrow H_2O + 1/2\ O_2$$

La recherche de la catalase est un **test fondamental pour l'identification des bactéries à Gram positif.**

NB: pratiquement toutes les bactéries à Gram négatif sont catalase +.

Technique :

- Déposer une goutte d'eau oxygénée sur une lame.
- Y déposer, à l'aide de l'anse de platine ou d'une pipette Pasteur boulée, **une colonie isolée (ou plusieurs si petites colonies)** de la souche à tester.
- Observer l'apparition de bulles.

Les *Leuconostocs* ont une catalase négative **(Thunell, 1995).**

5)Type fermentaire :

Ce test permet de s'avoir le type du métabolisme (homofermentaire ou heterofermentaire) par le quel le substrat carboné est transformé, et la production du gaz à partir de la dégradation du glucose.

Technique :

- Un tube contenant le bouillon MRS (contient le glucose au lieu de lactose) et une cloche de Durham est inoculé avec la souche à étudier après incubation de 24h à 30°C, la présence du gaz dans la cloche indique un métabolisme hétérofermentaire ***(Hariri et al., 2009)*.** Alors que leur absence indique les bactéries homofermentaires.

Le type fermentaire des *Leuconostocs* est hétérofermentaire (le métabolisme de glucose produit des quantités équimolaires d'acide lactique, d'éthanol et de CO_2) **(Thunell, 1995).**

6)Hydrolyse d'arginine:

L'**arginine dihydrolase** (ADH) est une enzyme capable de dégrader l'arginine en ammoniac, et des amines (composés basiques) mis en évidence en bactériologie dans les M16 BCP.Pour l'identification bactérienne ce milieu fait parti des milieux d'étude du métabolisme protidique. Il permet de révéler les décarboxylases liées à l'acide aminé étudié (Arginine) **(Thomas, 1973).**

Les bactéries lactiques utilisent le lactose en acidifiant le milieu, les colonies donnant ainsi une coloration jaunâtre. D'autres bactéries lactiques sont capables d'utiliser l'arginine et ré-alcalinisent le milieu, leurs colonies apparaissent blanchâtres. La couleur de l'indicateur de pH demeure inchangée.

Technique :

➢ On à réaliser des ensemencements sur milieu M16 BCP (solide) par des cultures jeunes de 18h et incuber à 30°C pendant 24h à 48h.

IV. 4 Conservation des isolats :

1)Conservation courte durée :

La conservation à court terme des souches pures est effectuée sur milieu solide MRS incliné. Après croissance à température optimale, les cultures sont maintenues à 4°C et le renouvellement des souches se fait par repiquage toutes les quatre semaines **(Figure10) (Badis *et al*., 2005).**

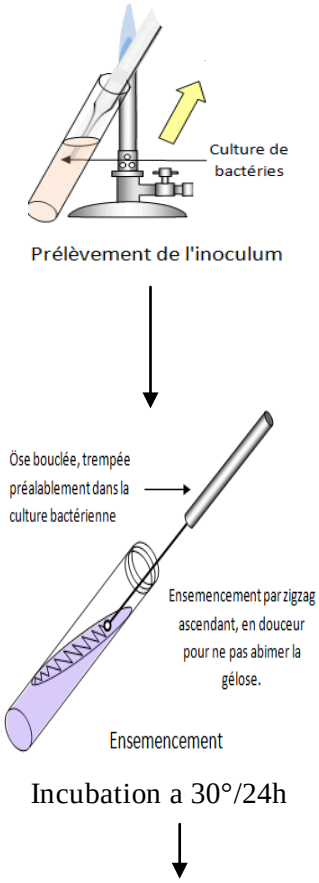


Figure10: Schéma de conservation courte durée des bactéries lactiques purifiées.

2)Conservation longue durée :

A partir des cultures de 18h (milieu liquide), les cellules sont récupérées par centrifugation à 4000 tours par minute pendant 10 min. Une fois le surnageant est éliminé, on ajoute le milieu de culture de conservation sur le culot.

Le milieu de conservation contient 70% de lait écrémé et 30% de glycérol. Les cultures sont conservées en suspension dense et en tubes éppendorfs à -20°C. En cas de besoin, les cultures sont repiquées dans du lait écrémé enrichi avec l'extrait de levure, deux fois avant l'utilisation *(***Badis *et al.*,2005).**

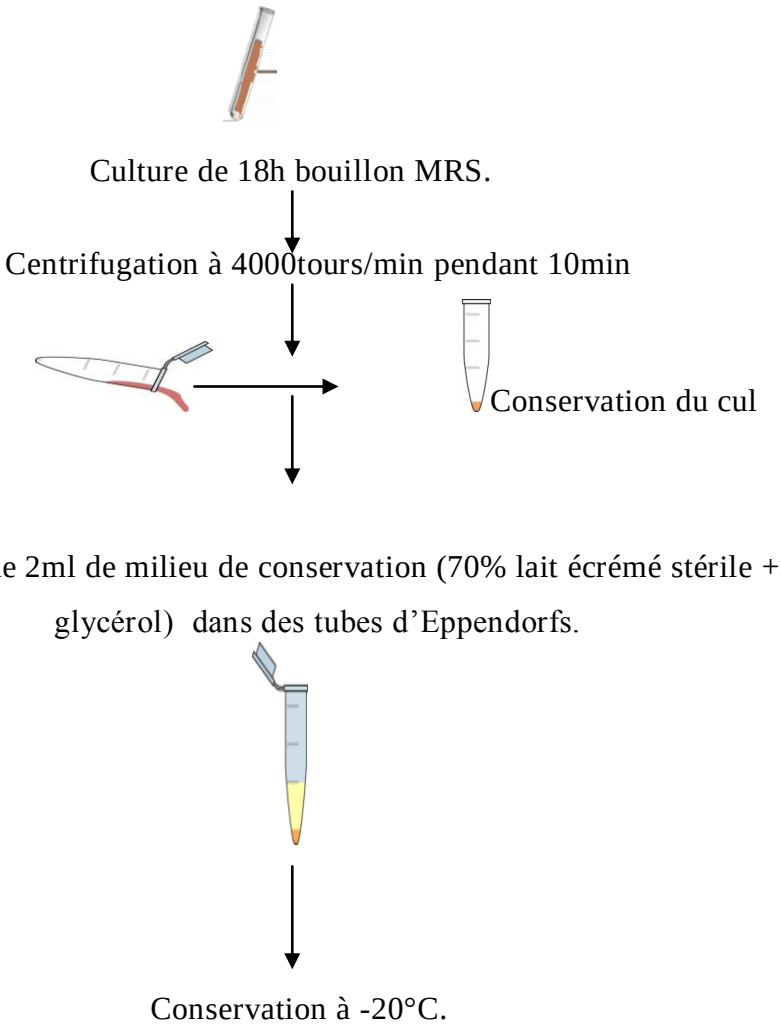


Figure11: Schéma de conservation longue durée des bactéries lactiques purifiées **(Badis *et al.*,2005)**

IV. 5 Détermination des espèces :

1) La croissance à différentes températures :

La croissance bactérienne est évaluée par un trouble en milieu MRS après 5 jours d'incubation à 4°C, 15°C, 37°C et 45°C. **(Guessas et Kihal, 2004).**

Alors que la thermorésistante des bactéries a été tester au bain marie à 63.5°C/30 minutes et 55°C/15 minutes puis on a incubé a 30°C/24h à48h **(Guiraud, 1998).**

Ces testes vont nous aider à distinguer les souches mésophiles des thermophiles ainsi que les thermorésistantes

2)La tolérance à la salinité et à l'acidité :

Après avoir une culture jeune des isolats (culture de 18h à 30°C), ces derniers sont ensemencés dans un milieu MRS liquide contenant 3% et 6.5 % de chlorure de sodium (NaCl) et incubés à 30°C avec un témoin MRS liquide sans sel pendant 5 jours **(Guessas** et **Kihal, 2004).**

La croissance des bactéries est appréciée par l'apparition d'un trouble dans les tubes **(Leveau** et **Bouix, 1980).**

3)Production de dextrane :

La production de 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. Ce test est aussi considéré comme clé d'identification permettant aussi de différencier entre les *Leuconostocs* productrice et non productrice de dextrane

4)L'hydrolyse de l'esculine :

On prélève une colonie d'une boite incubé pendant 24h et on l'ensemence par piqure centrale sur gélose à l'esculine réparti en tubes **(Lelliott et Stead, 1987).** L'esculine est un hétéroside formé d'un glucide complexe qui peut être dégradé par l'esculinase. Les produits de la réaction sont le glucose et l'esculine formé peut réagir avec les ions de fer pour donner un précipité noir dans le milieu situé autour des colonies . L'incubation va de 2 jours à 5 jours à30°C.

5)L'utilisation de citrate :

L'utilisation de citrate est étudiée sur milieu KMK **(Kempler et Mc Kay, 1980)** qui contient une solution de ferricyanure de potassium et une solution de citrate ferrique. La présence du citrate dans le milieu inhibe la réaction entre l'ion ferrique et le potassium ferricyanide.

Après 18h-72h d'incubation les colonies qui ferment le citrate (grâce à la citratase qui est une enzyme existe dans certaines espèces de *Leuconostoc*) lancent la réaction entre ces ions ils apparaissent sous forme de colonies bleues ou ayant un centre bleu. Les colonies incapables de fermenter le citrate restent blanches.

6)La production d'acétoine :

La production d'acétoine est testée sur milieu Clark et Lubs **(Samelis *et al.*, 1994 ;Guiraud, 1998)** qui est inoculé par les souches à tester et incubé à 30°C. Après 24h et dans un tube à hémolyse on dépose 2ml de cette culture avec 0.5ml de réactif α naphtol à 6% dans l'alcool absolu (VP1) et 0.5ml d'une solution de soude (NaOH) à 16% dans l'eau distillée (VP2) pour assurer la réaction de Voges-Proskaeur dite réaction de VP, on agite soigneusement les tubes et on les laisse en contact avec l'air libre pendant 5à 10 min à température ambiante. La production d'acétoine se traduit par l'apparition d'un anneau rose à la surface du milieu

7)L'utilisation des carbohydrates :

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

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

Dans les tubes à hémolyse (galerie classique), on met 1ml du milieu (MRSBCP-EV) additionné a la solution de sucre déjà préparée et 0.1ml de la solution bactérienne **(Guessas *et al.*, 2004).** Cette dernière a été préparée à partir d'une culture de 18h, centrifugée à 8000tr/min pendant 15min. Le culot ainsi récupéré est additionné de 2ml de tampon phosphate puis recentrifugé aux mêmes conditions pour se débarrasser des restes du milieu

de culture et pour obtenir un culot cellulaire pur. A ce culot 0,2ml de milieu de MRSBCP-EV est additionné pour former cette solution. On ajoute 0.5ml d'huile de paraffine pour créer les conditions d'anaérobiose. Vu le nombre important de souches étudiées ainsi que le nombre de tubes à utiliser avec chaque souche, une plaque d'Elisa a été utilisée. Es puits de chaque ligne contiendront une source de carbone qui sera utilisée par différentes souches **(Figure12).** La lecture des résultats sa fait après 24 et 48h d'incubation **(Guessas, 2006).**

1ere Etape :

1. Préculture des souches lactiques (18h, 30°C)

- Centrifugation à 8000tr/min pendant 15min

3. Récupérer le culot et additionner 2ml de tampon phosphate

- Centrifugation à 8000tr/min pendant 15min

5. Récupérer le culot Additionner 0,2ml de milieu de MRSBCP-EV

2eme Etape :

6. Préparer milieu MRS BCP_EV (100µl pour chaque puits)
7. Préparer les solutions des sucres3%(10µl pour chaque puits)
8. Préparer les solutions bactériennes (10µl pour chaque puits).

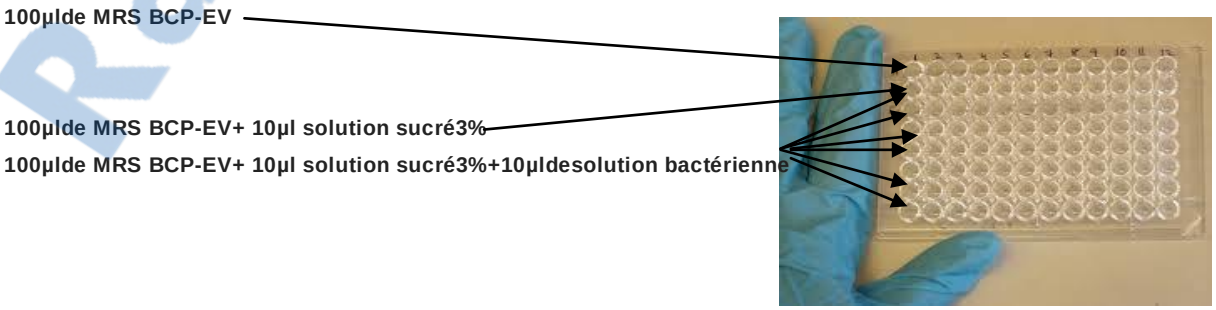


Figure12: schéma de la plaque d'Elisa utilisée pour les tests de fermentation des sucres **(Guessas, 2006)**

Rapport-Gratuit.com

IV. 6 Etude de quelques caractéristiques biotechnologiques des isolats :

1)Pouvoir protéolytique :

L'activité protéolytique des bactéries lactiques est recherchée en milieu MRS gélosé additionnée de lait écrémé à 1% et 2% selon la méthode de (**Van den berg *et al.*, 1993)**
Les souches bactériennes à tester sont ensemencées simultanément en touches à la surface du milieu de culture jeune. Après une incubation à 30° C pendant 24h, la protéolyse est révélée par des zones claires autour des touches.

2)Pouvoir lipolytique :

L'activité lipolytique est étudiée sur le milieu décrit par **Sierra (1957)** pour détecter la production des enzymes lipolytiques dans lequel le monooléate sorbitane polyoxyethylène (tween 80) est utilisé comme substrat lipidique **(Sierra G. ,1957 ; Janda K. 2005).**

Le principe de cette méthode repose sur la précipitation des cristaux du sel de calcium de l'acide gras sous l'influence d'une lipase **(El marrakchi A. *et al.*, 1988 ; Plou F. G., *et al.*,1998).** Si la souche bactérienne possède une enzyme lipolytique, la précipitation des cristaux de savon calcique sera visible sous forme d'un halo opaque autour des colonies. En outre, si l'activité lipasique est intense, la précipitation apparait sous forme de cristaux visibles à l'œil nu **(Delmotte A., 1958).**

Les souches bactériennes sont donc ensemencées sur la gélose nutritive à base de Tween 80. Le substrat est additionné dans le milieu de culture, préalablement stérilisé, à une concentration de 10 ml /L **(Helist P.** et **Korpela T., 1998).**
L apparition des précipitations opaques autour des colonies bactériennes à lieu au bout de 24h à 72 h d'incubation à 30°C **(Delmotte A., 1958).**

3)Etude des interactions :

Le choix des ferments mixtes repose sur l'étude des interactions entre les bactéries lactiques. On les classe en deux catégories : les interactions *positives* qui se caractérisent par la stimulation d'un ou de plusieurs micro-organismes et les interactions *négatives* qui correspondent à une inhibition de la croissance et de l'activité métabolique **(Choisy *et al.*, 1997).**

La symbiose est révélée par l'absence des zones d'inhibition par contre ***l'antagonisme*** se traduit par la présence de ces dernières après une incubation à 37°C pendant 24h. **(Benkerroum *et al* ; 1993)**

Pour réaliser ce test avec nos isolats on a choisis deux

- souches de *Lactobacilus plantarum* ssp. (Codées *Lb58* et *Lb68*)
- une souche de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 codée *E.coli*
- une souche de *Escherichia coli* ATCC 25922 (codée *Stap*)
- *Listeria inocoua* ATCC 33090 (codée *LI).*
- *Listeria ivanovii* ATCC 19119 (codée *LV*).

✓ Méthode directe :

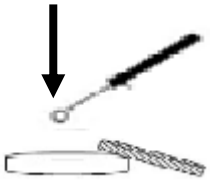
Pour se faire, la méthode décrite par **Fleming *et al.* (1975)** a été utilisée. Les souches à tester ont été ensemencées en touche sur la gélose MRS préalablement coulée et solidifiée. On laisse sécher à température ambiante puis ont été incubées pendant 24h à 30°C. **(Barefoot** et **Klaenhammer, 1983)**

Après la croissance des souches de *Leuconostocs* on inocule 7ml de: (MRS semi solide « pour les souches lactiques », MH semi solide pour les *Staphylococcus aureus et Escherichia coli* et BHI semi solide pour les *Listerias)* déjà fondue et refroidie à 39°C par 0.5ml de la souche indicatrice, le mélange est ensuite coulé à la surface de la gélose MRS ensemencée en touches.

Le milieu BHI a été employé dans ce travail expérimental car il est caractérisé par sa teneur faible en glucose (0.2%). Ce milieu est préconisé pour minimiser l'effet inhibiteur dû à la production d'acides organiques **(Figure13) (Ammor *et al.*, 2006).**

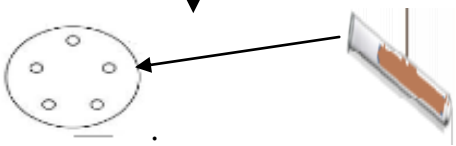
Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Prélevement de l'inoculum a partir d'une culture jeune de *Leuconostoc*

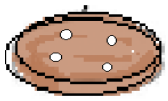


Ensemencement en touche sur la gélose MRS préalablement coulée et solidifiée.

Incuber à30°C/24h.



Couler à la surface de la gélose MRS ensemencée en touches par un milieu semi solide inoculé par une souche indicatrice.



Incuber à37°C/24h.

Présence des zones d'inhibitions après l'incubation

Figure13: schéma explique les étapes de la méthode directe de l'interaction bactérienne

✓ **Méthode indirecte:**

Afin de déterminer la nature de la substance inhibitrice produite par nos bactéries lactiques, il est impératif de réaliser une série de tests on utilisant la méthode indirecte. Cette méthode permet de mettre en contacte le surnageant des souches lactiques productrices de substance antimicrobienne avec la souche test **(Tagg et Mcgiven,1971).**

Les souches précédemment sélectionnées pour leur production de substances antimicrobienne sont concernées par ce test.

Les souches sont cultivées dans du milieu MRS liquide et incubées pendant 18 heures. Après incubation, le milieu est centrifugé (8000 rpm/mn 10 min) et le surnagent est conservé.

Dans une boite de Pétri contenant du milieu solide et ensemencé par la souche test, des puits sont réalisés avec un emporte pièce et celée par 10 µl de gélose MRS. Les puits recevront 100 µl du surnageant de la souche à testée .Les boîtes de Pétri, ainsi préparées, sont entreposées pendant 4à 8 h à 4°C pour laisser diffuser la bactériocine dans la gélose (**Khaoua *et al.*, 1997**) ensuite les boites sont incubée pendant 24 à 48 heures Le résultat positif se manifeste par l'apparition d'une zone autour de la souche productrice (*Leuconostoc*).

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 **(Figure14).**

1ere étape :

Culture jeune de 18h dans le milieu MRS liquide

Centrifuger la culture (8000 rpm/mn 10 min)

Conservation de surnagent

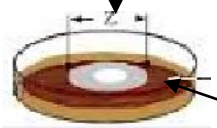
2eme étape :

Boite de Pétri contenant du milieu solide et ensemencé par la souche test.

100 µl du surnageant de la souche à testée

Puits réalisé avec un emporte pièce

Incubation a 37°C/24h



Z : Zone d'inhibition bactérienne

Croissance des souches teste

Figure14: schéma explique les étapes de la méthode indirecte de l'interaction bactérienne

- ***Inhibition due à l'acide lactique :***

L'acide lactique est un facteur majeur dans les inhibitions par les bactéries lactiques. Afin d'éliminer son effet, les *Leuconostocs* sont cultivés dans MRS liquide tamponné (tampon phosphate 0.2 M, pH7) ; ainsi l'acide lactique produit par la souche lactique sera neutralisé et seule la substance antimicrobienne si elle est produite exprime son action sur les souches indicatrices. **(Achemchem *et al.*,2004).**

- ***Inhibition due au peroxyde d'hydrogène :***

En plus de l'acide lactique et des autres acides organiques qui empêchent le développement des microorganismes indésirables par diminution du pH du milieu, les bactéries lactiques produisent d'autres métabolites ayant des propriétés antimicrobiennes tels que le peroxyde d'hydrogène **(Dortu et Thonart, 2009).**

Pour écarter l'effet du peroxyde d'hydrogène dans l'inhibition des pathogènes cibles, le surnagent des cultures des bactéries lactiques ont été traités par 1 mg/ml de catalase puis incubée à 37°C pendant 1 heure. Le surnageant est stérilisé par filtration et testé par la méthode des puits sur les pathogènes. **(Achemchem *et al.*, 2004 ; Guessas *et al.*, 2005).**

4) Recherche de la nature de la substance antimicrobienne :

Les bactériocines se définissent par:

- Une activité antibactérienne au spectre d'action généralement étroit (même espèce ou espèce apparentée) ;
- La présence d'une partie peptidique ;
- Une inactivation par les protéases ;
- Leur thermostabilité **(Juillard V. *et al.* ,1987).**

✓ **Effet des enzymes protéolytiques :**

La nature protéique de la bactériocine est mise en évidence par l'étude de sa stabilité après traitement par différentes enzymes protéolytiques.

L'extrait brut, ajusté à pH 7, est soumis à l'action de deux enzymes: trypsine et α chymotrypsine.

Ces enzymes sont utilisées à une concentration finale de 1mg/ml et à pH7. Le mélange (surnageant + enzyme) est stérilisé par filtration sur filtre millipore de 45 µm de diamètre et incubé 1 h à 2 h aux températures appropriées (25 à 37°C). **(Mayr-Harting *et al.*, 1972 ; Khaoua et al.,1997 ; Vinod Kumar *et al.*, 2006)**

- ✓ **Effet du pH :**

Mettre dans des tubes à essai 5 ml du surnageant après l'élimination de l'effet de l'acide lactique, ensuite ajuster les valeurs du pH de 1 à 9 (chaque tube est ajusté à une valeur) par l'addition du NaOH 1Mol /L et/ou du HCl 1Mol/L.

Après 2 h d'incubation à 37°C, tester l'activité des surnageants vis-à-vis les qutre souches pathogènes et/ou d'altérations (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 , Escherichia coli ATCC 25922,*Listeria inocoua* ATCC 33090 et *Listeria ivanovii* ATCC 19119) l'activité inhibitrice est évaluée par la technique de diffusion en puits **(Vinod Kumar *et al.*, 2006).**

- ✓ **Effet de la température**

Les substances antimicrobiennes ont été testées pour leur résistance à la température et la conservation de leur activité vis-à-vis des souches indicatrices. Le filtrat de culture de la souche lactique productrice est traité par différentes températures : 60°C pendant 30 min e, 80°C pendant 15 min et 100°C pendant 5 min dans tout les cas l'activité inhibitrice est évaluée par la technique de diffusion en puits **(Achemchem *et al.*,2004)**

- ✓ **Effet des solvants organiques :**

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

IV. 7 Etude de la cinétique d'acidification et de croissance :

1)En culture pure : (Guiraud, 1998)

L'acidification du lait est essentiellement due à la production d'acide lactique qui est plus ou moins importante selon la souche lactique. Ce caractère est très recherché en industrie laitière ; il dépend de l'aptitude de la souche à fermenter le lactose et à résister, a l'acidité du milieu.

✓ **Dosage d'acidité (Guiraud, 1998) :**

Les souches étudiées indépendamment sont les suivantes : « V1» isolée de lait cru de chèvre et«M9» isolée du lait cru de chamelle qui sont plus performantes et productrices des substances antimicribiennes par rapport aux autres isolas, ainsi les deux souches lactiques de *Lactobacilus plantarum* ssp et les autres souches indicatrices de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ,Escherichia coli ATCC 25922,*Listeria inocoua* ATCC 33090 et *Listeria ivanovii* ATCC 19119

Chaque souche lactique a été ensemencée d'abord sur MRS liquide et incubée à 30°C pendant 18h, ensuite 0.3ml de la culture précédente a été inoculé dans un tube contenant 10 ml de lait écrémé incubé à 30°C pendant 18h, 9ml de cette préculture a été additionnée dans une fiole contenant 300ml de lait écrémé à 0.3% d'extrait de levure. Ces 300ml ont été ensuite réparti en 2 séries de 8 tubes de 10ml à chacun pour chaque souche étudiée **(Kihal *et al.*,2007) .**

La première série pour étudier la cinétique de croissance et la seconde a été faite pour étudier la cinétique d'acidification (acidité et pH).

- **La mesure du pH :**

A l'aide d'un pH mètre, on détermine le pH (Chaque culture de chaque tube) après chaque 3h.

- **La mesure de l'acidité titrable :**

Dans le lait et les produits laitiers, l'acide lactique provient de la dégradation du lactose par les bactéries. Plus un lait est frais, moins il contient d'acide lactique. La concentration en acide lactique dans un lait s'exprime en degré Dornic (°D) : 1°D correspond à 0,1 g d'acide lactique

par litre de lait. Un lait frais contient de 15 à 18°D, il caille à 60-70°D **(Shirai *et al.*, 2001 ; Papamanoli *et al.*, 2003 ; Ammor *et al.*, 2006).**

On verse le contenu d'un tube dans un bécher, on y ajoute 5 a 10 gouttes de phénolphtaléine (indicateur de pH), puis on titre (on ajoute goutte a goutte a l'aide d'une burette) du NaOH N /9 tout en remuant le bécher, jusqu'à l'apparition d'une couleur rose pâle persistant au moins 10 secondes **(Figure15) (Larpent, 1997).** On note alors le volume de la soude écoulée, et les résultats sont exprimés en °D, sachant que :

$$1°D = V_{NaOH} \times 10$$

V_{NaOH}: Volume de NaOH utilisé pour titrer l'acide lactique contenu dans les 10ml de lait.

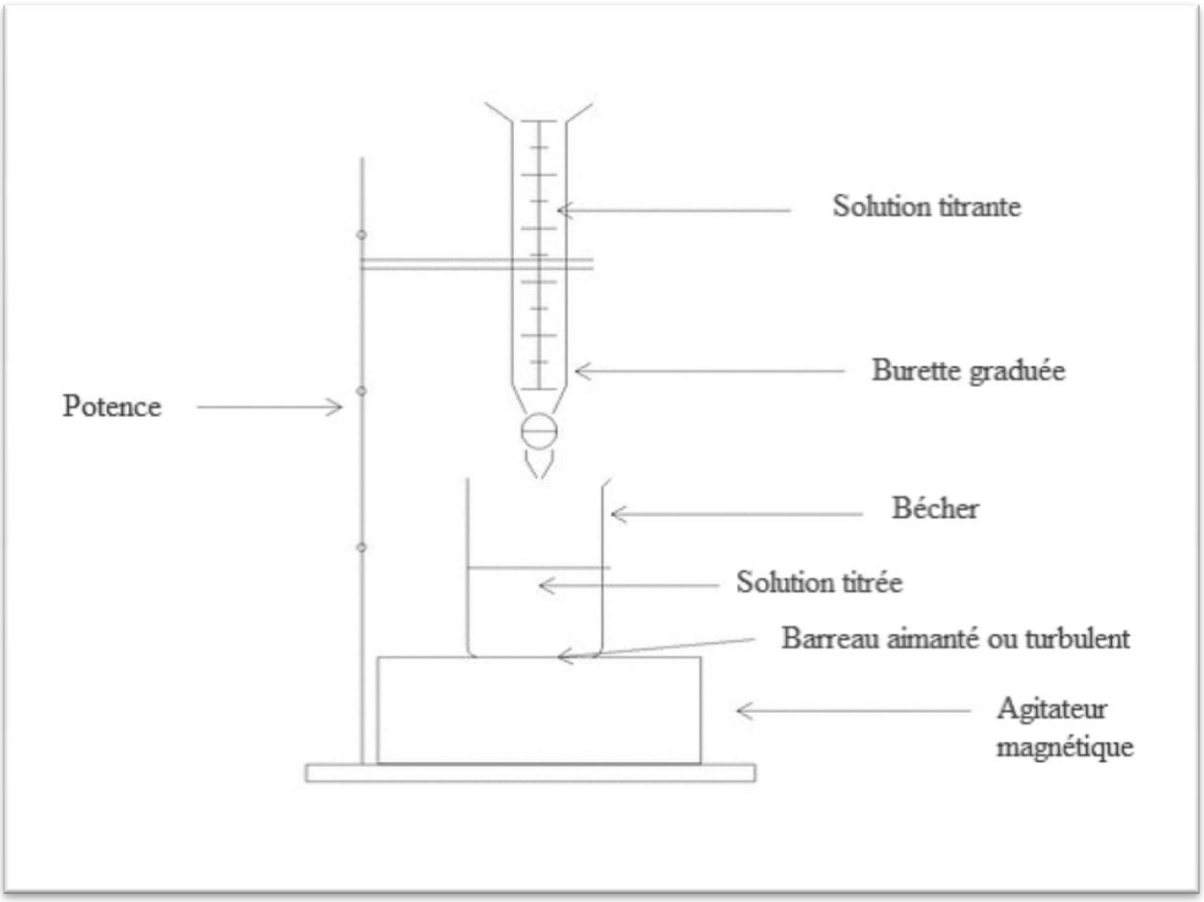


Figure 15: Présentation de l'installation type d'un titrage

✓ **Cinétique de croissance :**

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

Les souches qui sont inoculées dans 10ml de lait écrémé subies une dilution dans 9ml d'eau physiologique jusqu'à 10^{-8}, après les souches sont ensemencées en profondeur dans le milieu sélectif pour chaque souche. (MRSv pour les *Leuconostocs* à 30°C ; MRS pour les deux souches de *Lactobacillus* plantarum à30°C ;BHI pour les deux souches de *Listérias* à 37°C ; Baird Parker pour *Staphylococcus aureus* à 37°C et GN pour *Escherichia coli* à 37°C.) (3 boites pour chaque dilution).

La lecture est faite après 24 à 48h d'incubation, on ne prend en considération que les boites contenant entre 30 et 300 colonies. **(Guiraud, 2003).** Il est impossible de compter une boite contenant plus de 300 colonies. Le risque d'erreur est trop important donc elles sont écartées. Les boites contenant moins de 30 colonies sont elles aussi écartées, les colonies sont trop rares et peuvent induire en erreur.

Les résultats sont exprimés selon La formule **(Joffin et Leyral, 2006).**

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

Σ C : la somme des colonies comptées sur les boites.

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

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

d : est la valeur correspondant à la dilution à partir de la quelle les premiers dénombrements

Rapport-Gratuit.com

2)En culture mixte:

Même protocole qui a été utilisé précédemment dans la cinétique d'acidification a été utilisé pour mesurer le pH, acidité Dornic et la mesure de population bactérienne. Les deux souches productrices *V1* et *M9* ainsi que les autres souches tests ont été repiquées de façon routinière dans 10 ml de lait écrémé stérile contenant l'extrait de levure, et après 18h d'incubation on a mélangé 1.5ml d'une préculture dans 10ml de lait écrémé stérile d'une bactérie productrice et 1.5ml d'une bactérie test. Puis 9ml de cette préculture a été additionné dans une fiole contenant 300ml de lait écrémé à 0.3% d'extrait de levure. On a distribué le contenue des flacons dans des tubes stériles à raison de 10ml pour chaque tube. Et on fait la lecture du pH et la production d'acidité et le dénombrement aprés chaque 3heures pendant 24heures.

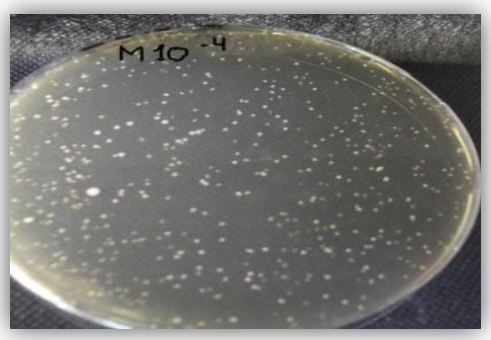
V. Résultats:

V. 1 Isolement et caractérisation des isolats :

On a utilisé dans notre étude pour isoler les *Leuconostocs* deux milieux considérés comme sélectifs pour ce genre qui sont : Le MRS additionné de 30µg/ml de la vancomycine pour minimiser la croissance des autres bactéries lactiques et le MSE solide ; Les deux échantillons (Lait de chèvre et lait de chamelle) sont diluées à10^{-7} et ensemencer en profondeur dans chacun des deux milieux cités précédemment.

Après une incubation à 30°C pendant 24h à 48h : Les boites de Pétri ont été examinées.

Sur le milieu MRS, Les colonies sont de forme ronde, petite et lenticulaire de couleur blanchâtre **(Figure16)**, par contre, sur milieu MSE elles sont transparentes avec un aspect visqueux et gluant.

A) 

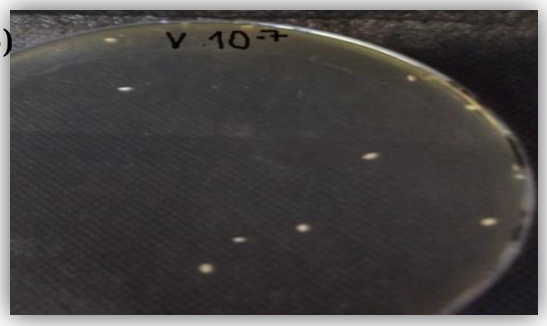
B) 

Figure16: Aspect macroscopique des cultures bactériennes (*Leuconostocs*) ensemencée en profondeur avec MRSv

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

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

V. 2 Purification et caractérisation des isolats:

Dix colonies typiques à savoir leur apparence macroscopique (une forme circulaire de contour régulier, très petite de taille environ 0.5et 1mm) sont isolées de chaque échantillon à partir des boites contenant le milieu MRSv et repiquées dans le bouillon MRS et incubé à 30°C.

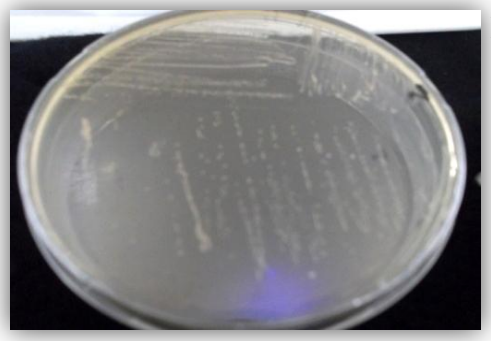
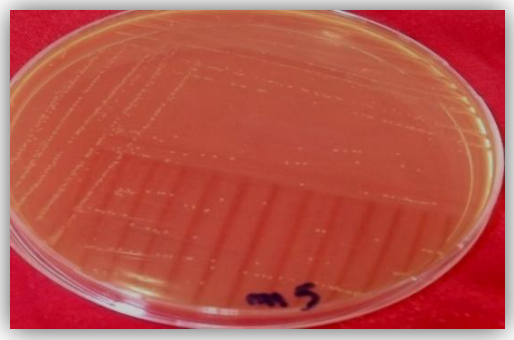
Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

La purification des bactéries isolées a été établie par la réalisation des subcultures sur bouillon (MRS liquide) et milieu MRSv solide jusqu'à l'obtention des colonies bien distincte et homogène.

1)Aspect macroscopique :

✓ **Sur milieu solide :**

Les colonies de *Leuconostoc* après une purification apparaissent sur milieu MRSv solide sous forme des colonies de couleur blanchâtre, forme lenticulaire ou circulaire. Ces colonies sont envieront de 0,5 à 1mm de diamètre **(Figure17) (Kihal, 1996 ; Carr *et al.*, 2002)** .

A)  B) 

Figur17:L'aspect macroscopique des souchesV2 et M5 sur le milieu MRS (ensemencé en surface)

A : V2 la souche isolée de lait cru de chèvre.

B : M5 la souche isolée de lait cru de chamelle.

✓ **Sur milieu liquide :**

Dans le milieu MRS liquide la croissance des bactéries apparaît sous forme de trouble .Et pour une souche pure cette trouble est concentrée au fon du tube à la recherche des conditions anaérobiques de ces bactéries avec une zone transparente de 5mm à la surface du milieu liquide **(Figure18) (Kihal, 1996 ; Carr *et al.*, 2002)** .

Figure18: Aspect de souche pure *V4* sur MRS liquide

2)Test de la catalase :

Selon les caractéristiques phénotypes du genre *Leuconostoc*, toutes les espèces étudiées ne possèdent pas la catalase.

3)Aspect microscopique :

La forme des bactéries et leur affinité pour les colorants constituent la base de leur classification. Les bactéries peuvent être sphériques (coques ou cocci), en forme de bâtonnet (bacilles), ou intermédiaires (coccobacilles).Ainsi pour déterminer leurs caractères culturaux (couleur, disposition forme et aspect), les colonies obtenues sont observées à la loupe binoculaire, après une coloration de Gram, au microscope optique (x100).

Alors après l'observation microscopique on a éliminé toutes les espèces apparaissent comme Gram négatif et les forme de bacilles ; et comme une pré-identification on garde juste les souches apparaissent sous forme ovoïde ou coccobacille ; dont le mode d'association est toujours en paires ou en chaînes incurvées de nombre paires **(Kihal, 1996 ; Carr *et al.*, 2002) (Figure17).**

A)

.

B)

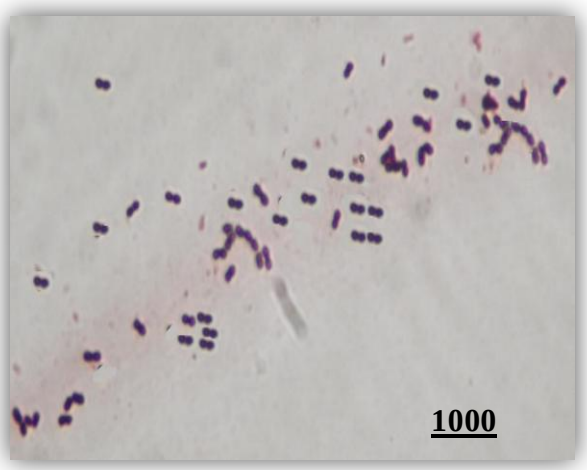


Figure19:L'observation microscopique des cellules bactériennes (*Leuconostoc*) après fixation (Coloration de *Gram*) **(Gx1000)**.

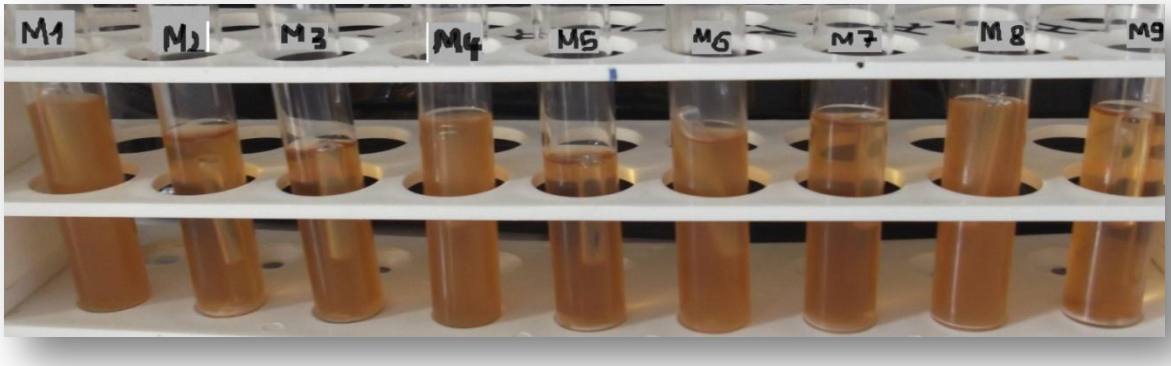
A : La souche M7 isolée de lait cru de chamelle
B : La souche V5 isolée de lait cru de chèvre

4)Type fermentaire :

Ce test nous a permet de différencier entre les souches homfermentaire et les souches hétérofermentaire.

Toutes les souches produisent du gaz (CO_2).à partir du glucose qui apparais dans la cloche de Durham **(Figure20).** Sont considérés comme hétérofermentaire qui est un caractère spécifique pour les *Leuconostoc* **(Mathot *et al.*, 1994 ; Badis *et al.*, 2005).** Les résultats obtenus sont indiqués dans le **tableau 16**

A)



B)

Figure 20 : Type fermentaire des isolats (*Leuconostoc*) sur milieu MRS liquide glucosé contenant la cloche de Durham. Incubées à 30°C/24h.

A : les isolats de lait cru de chèvre.

B : Les isolats de lait cru de chamelle.

Ce caractère est aussi étudié sur milieu lait écrémé stérile, la production du CO2 se traduit par l'apparition des fissures dans le coagulum après une incubation a 30°C/24h **(Figures 21)**

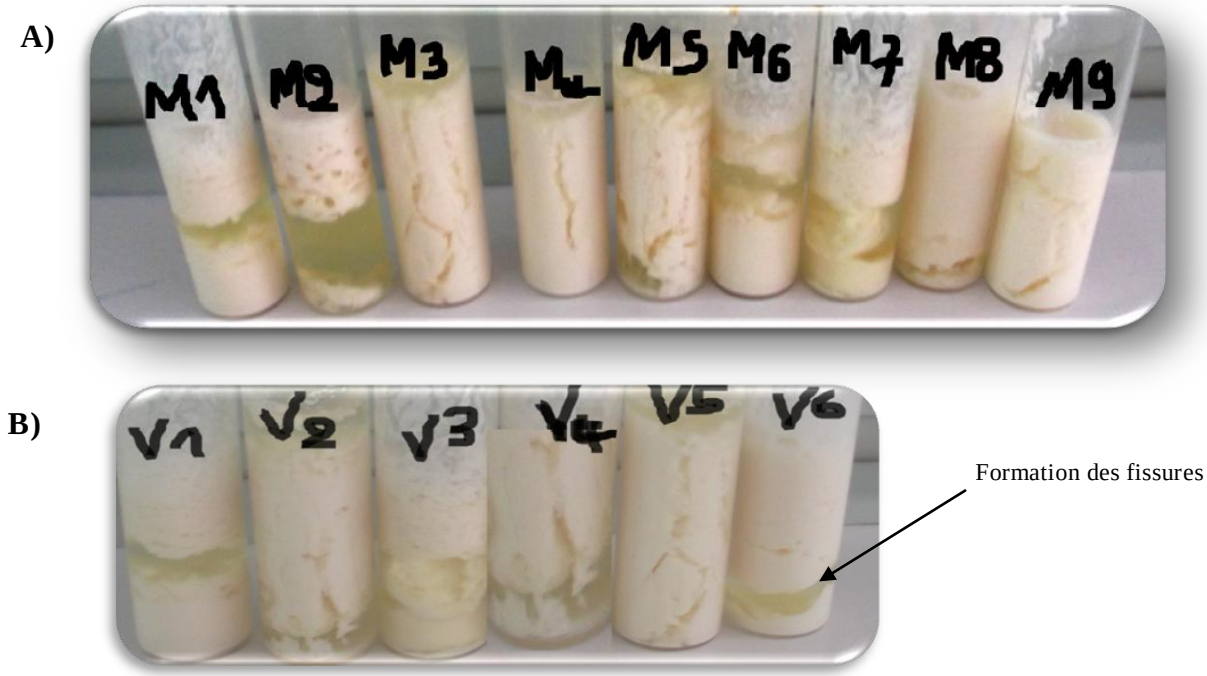


Figure 21: Type fermentaire des isolats (*Leuconostoc*) sur milieu lait UHT.

A : Les isolats de lait cru de chamelle.

B : Les isolats de lait cru de chèvre**.**

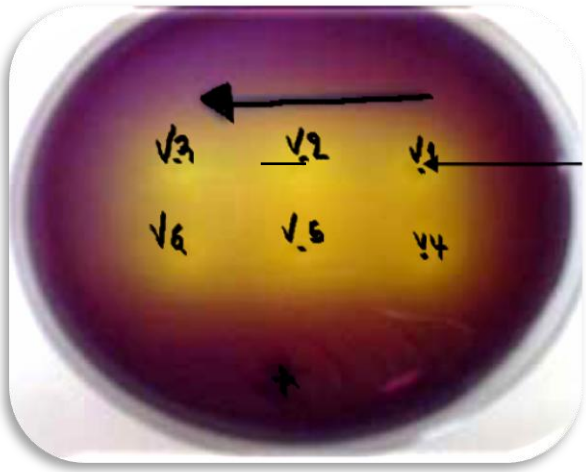
5)Recherche de l'Arginine dihydrolase (ADH) :

Les bactéries qui fermentent le lactose entraînent une acidification du milieu et une coloration jaune du milieu en présence de pourpre de bromocrésol (indicateur de pH).

L'enzyme ADH, dont l'action est favorisée en milieu acide, forment des substances alcalines à partir des acides aminés et l'alcalinisation du milieu ce qui provoque le virage au violet. Après ensemencent de chacun de nos souches sur le milieu M16BCP. Incuber à 30° C. **(Kheddid *et al.*, 2006***)*.

Apparition d'une coloration jaune (acidification du milieu): réaction négative.

On garde toutes les souches qui n'ont pas la capacité à hydrolyser l'arginine, car les *Leuconostoc* ne possèdent pas l'ADH (arginine déhydrolase). **(Figure22).** Les résultats obtenus sont représentés dans **le tableau 16**.



La couleur jaune indique l'absence de l'ADH chez Leuconostoc

Figure 22: test de l'hydrolyse de l'arginine.

V. 3 L'identification des espèces :

Après les testes phénotypique on sélectionne seul les souches qui ont les caractéristiques du genre de Leuconostoc pour admettre aux testes de croissance à différentes températures et a la thermorésistance.

1) La croissance à différentes températures :

Nos souches n'ont pas poussé ni a 4°C ni a 45°C, cependant elles ont poussé à 15°C et 37°C.

2) La thermorésistance :

Toutes les souches isolées n'ont pas résisté à 63.5°C pendant 30_{min} mais elles ont résisté à 55°C pendant 15_{min}. Les résultats obtenus sont indiqués dans **le tableau 16**.

3) La tolérance à la salinité et à l'acidité :

✓ **La croissance en milieux acides :**

Les résultats montrent que toutes les souches poussent après une incubation à 30°C sur le milieu à pH 6.5 et aucune souche n'a poussé à pH 4.8

✓ **La croissance en milieu hyper salé**

Trois souches (*V4*, *V6* et *M7*) n'ont pas poussé à une concentration de 3%NaCl et aucune souche n'a poussé à une concentration de 6.5% NaCl. **(Tableau16)**

4)La production de dextrane :

Sur le milieu MSE qui est un milieu électif permettant la recherche et le dénombrement des *Leuconostoc* dans le lait, les produits laitiers et les aliments sucrés.

A partir du saccharose du milieu, *Leuconostoc mesenteroides* et *Leuconostoc dextranicum* synthétisent des polysaccharides (dextrane) qui donnent aux colonies un aspect gélatineux. Ce caractère a été observé chez tous les souches isolées de lait cru de chèvre et de chamelle **(Figure23), (Tableau10).**

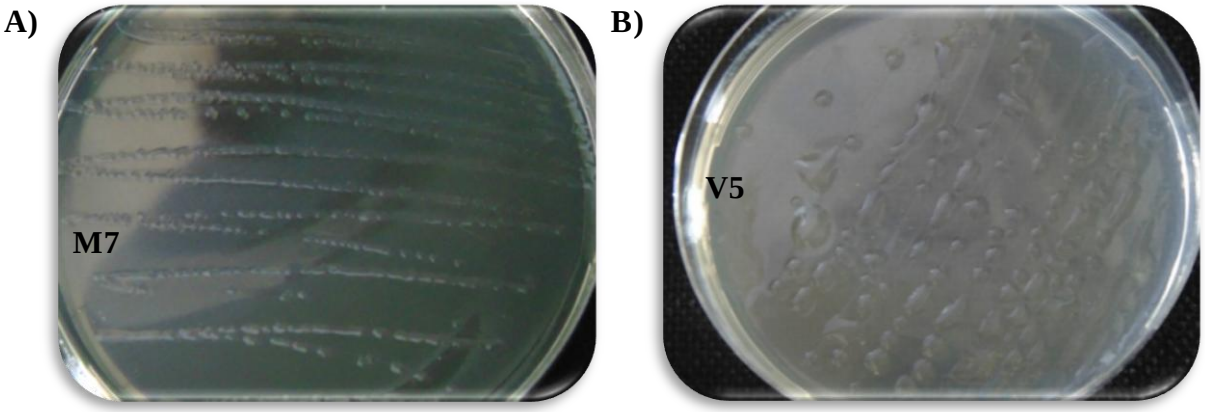


Figure 23: L'aspect des colonies productrices de dextrane par les souches *M7* et *V5* sur milieu MSE.

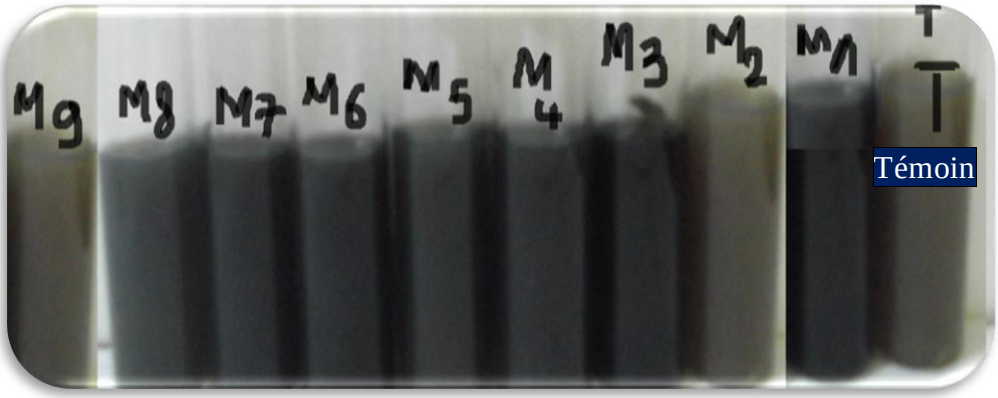
A : Les isolats de lait cru de chamelle.

B : Les isolats de lait cru de chèvre.

5)L'hydrolyse de l'esculine :

Le caractère d'hydrolyse d'esculine semble être variable chez les souches isolées. Dont elles sont toutes capables de le dégrader sauf les souches *M2* et *M9* qui sont incapables d'hydrolysé l'esculine **(Figure24), (Tableau16).**

A)



B)

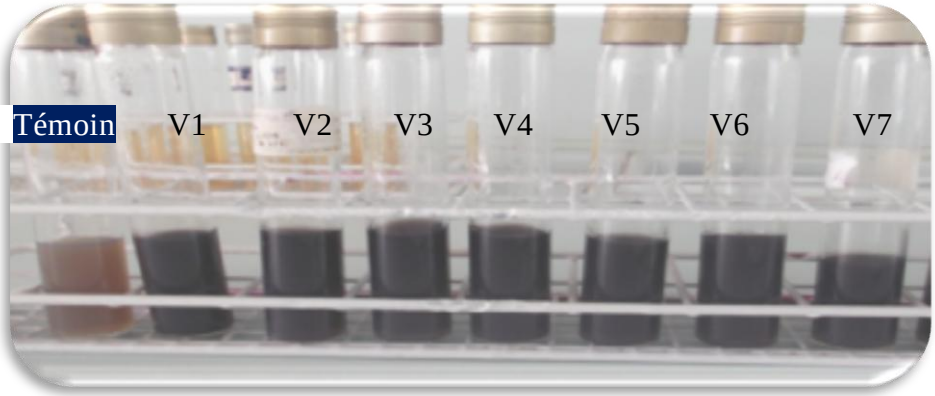
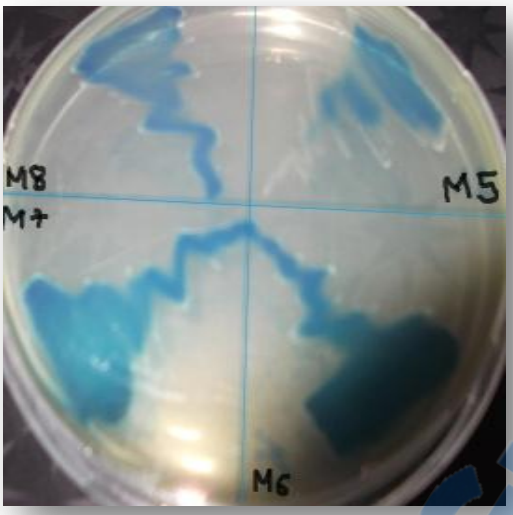


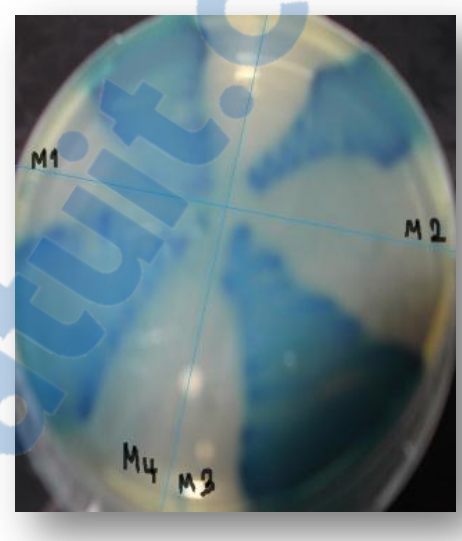
Figure24: la révélation de l'hydrolyse de l'esculine par less souches de *Leuconostoc*.

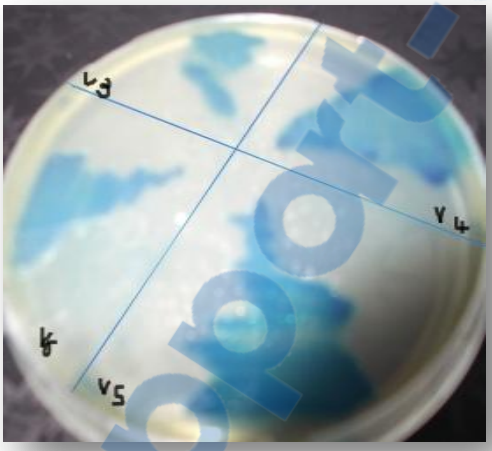
- A : Les isolats de lait cru de chamelle.
- B : Les isolats de lait cru de chèvre**.**
    - Milieu avec forte coloration noir révèle l'hydrolyse de l'esculine : **esculine +**
    - Milieu grisâtre. Pas d'hydrolyse de l'esculine : **esculine -**

6)L'utilisation de citrate :

Nos souches sont tous capables de dégrader le citrate elles apparaissent sous formes de la couleur bleu **(Figure25), (Tableau 16).**







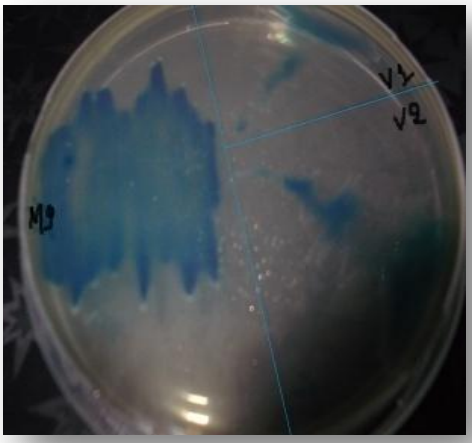


Figure25: l'utilisation de citrate révèle par les colonies bleues sur le milieu KMK de nos isolas

Rapport-Gratuit.com

7) La production d'acétoine :

La production d'acétoine est testée sur milieu Clark et Lubs **(FIL, 1996).** Tous nos isolats ne produisent pas l'acétoine. Les résultats obtenus sont présentés dans la **figure26** et le **tableau 16.**

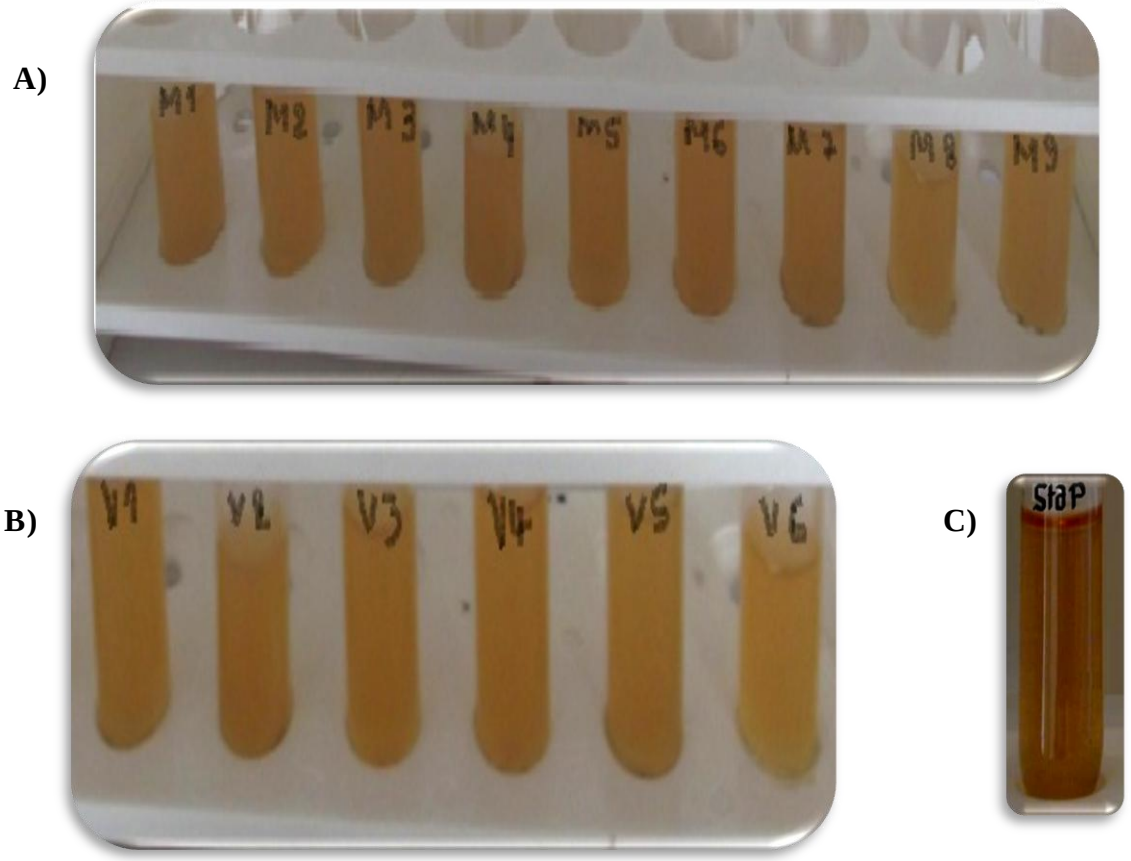


Figure26: test de production d'acétoine.

A : Les isolats de lait cru de chamelle. Milieu jaune =>absence d'acétoïne =>test du VP négatif pour nos isolas lactique

B : Les isolats de lait cru de chèvre. Milieu jaune =>absence d'acétoïne =>test du VP négatif pour nos isolas lactique

C : Milieu rouge =>présence d'acétoïne =>test du VP positif pour la souche de *Staphylococcus aureus* qui sert comme référence

Tableau16: Les caractéristiques physiologiques et biochimiques des souches de *Leuconostoc* isolées.

souches	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	V1	V2	V3	V4	V5	V6
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ADH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Production de CO_2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63.5/30min	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55/15min	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH4.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH6.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3% NaCl	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-
6.5% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dextrane	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L'hydrolyse de l'esculine	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
L'utilisation de citrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Production d'acétoine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

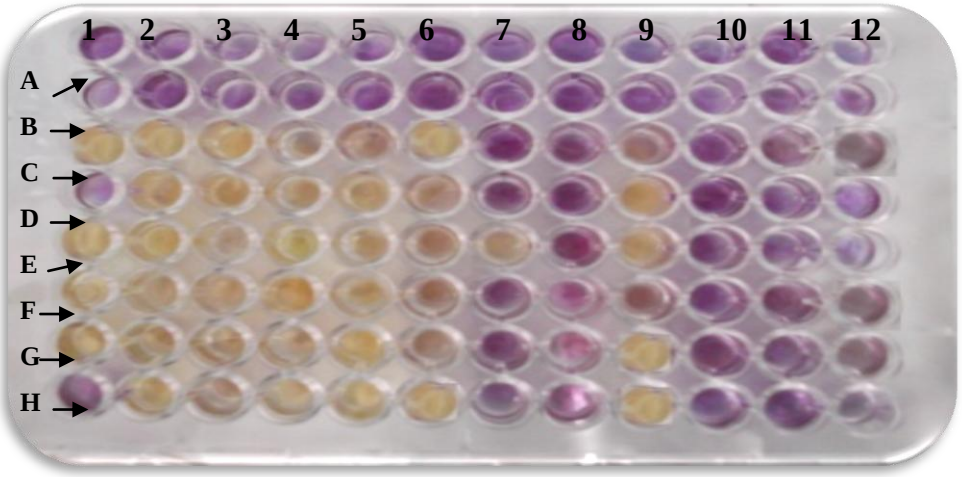
8)L'utilisation des carbohydrates :

Pour mieux identifier les isolats au niveau de l'espèce et de la sous espèce on a établit leur profil fermentaire de douze sucres on utilisant le milieu MRS BCP qui contient le bromocrésol qui est un indicateur de pH, leur virage au jaune révèle la fermentation des carbohydrates qui provoque une acidification du milieu.

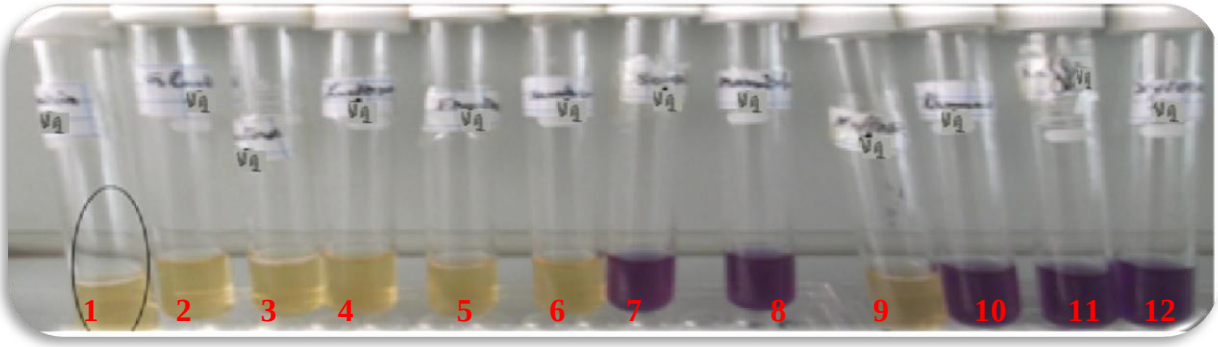
D'après les critères phénotypiques apportées par différents auteurs **(Car *et al.*, 2002 ; Badis *et al.*, 2005 ; Hammes et Hertel, 2006 ; Khedid *et al.*, 2006)** nous avons pu conclure qu'on a 15 souches de *Leuconostoc* dont 06 appartiennent à *Leuconostoc mesenteroides* subsp *dextranicum* et 09 à *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides* et qui se différencier par un seul sucre clé l'arabinose **(Tableau17) , (Figures27).**

Tableau17: le profil fermentaire des 15 souches isolées.

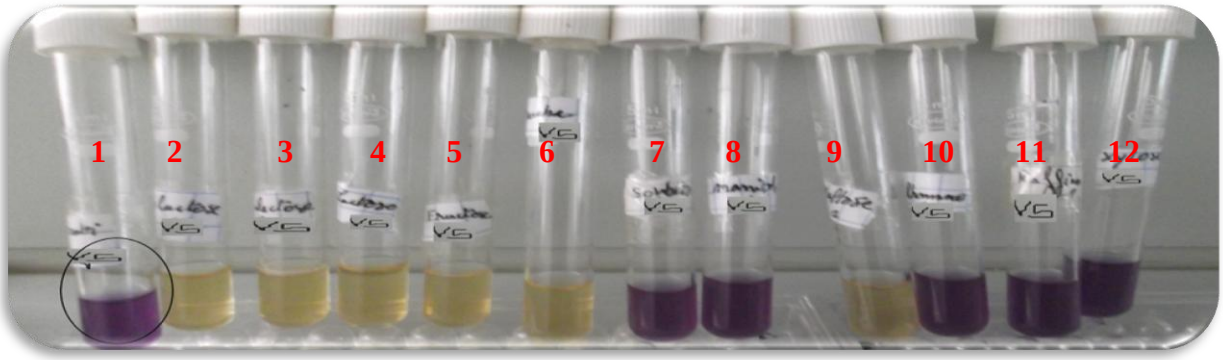
souches	Arabinose	Glucose	Galactose	Lactose	Fructose	Saccharose	Sorbitol	Mannitol	Maltose	Rhamnose	Raffinose	Xylose
V1	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
V2	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
V3	-	+	+	+	+	+	-	+/-	+	-	-	-
V4	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+ /-
V5	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
V6	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+/-
M1	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+/-
M2	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
M3	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
M4	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+/-	+/-
M5	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+/-
M6	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
M7	-	+	+	+	+	+	-	+/-	+	+	-	-
M8	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
M9	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-



(I)



(II)



(III)

Figure27: Le profil fermentaires des isolats effectué sur une galerie classique et sur plaque d'Elisa.

(I) : Fermentation des carbohydrates par les souches bactériennes sur une plaque d'Elisa dont les lettres « **A** » : Témoin milieu MRS BCP, « **B** » : Témoin milieu MRS BCP+sucre non inoculé, « **C** » :M1, « **D**» :M2, « **E**» :M3, « **F**» :M4, « **G**» :M5, « **H**» :M6 et les sucres sont classer comme de suite: 1-Arabinose, 2- Glucose, 3- Galactose, 4-Lactose, 5- Fructose, 6- Saccharose, 7- Sorbitol, 8 – Mannitol, 9- Maltose, 10- Rhamnose, 11-Raffinose,12- Xylose.

(II) : Fermentation des carbohydrates par la souche V1 (Leuconostoc mesenteroides subsp mesenteroides)

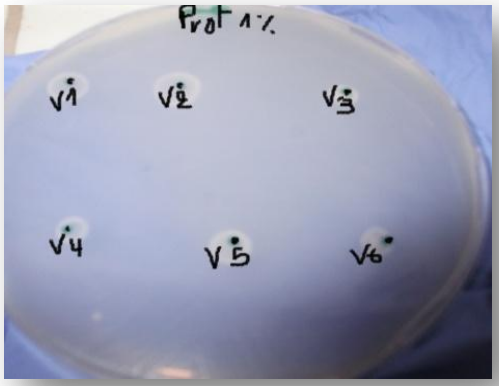
(III) : Fermentation des carbohydrates par la souche V5 (Leuconostoc mesenteroides subsp dextranicum)

V. 4 Les caractéristiques biotechnologiques des isolats :

1)Activité protéolytique :

La protéolyse se traduit par l'appparitón d'un halo clair du a la dégradation de la caséine ; autour des souches ensemencées sur le milieu MRS solide additioné par le lait écrémé après 24h d'incubation.Toutes nos isolas de *Leuconostoc*,ne présentent pas une activité parotéolytique. **(Figure28)**

A)



B)

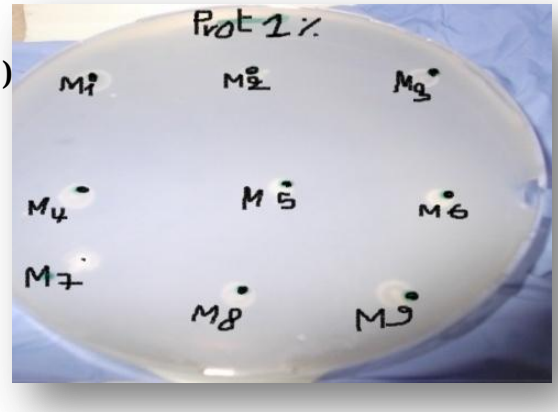


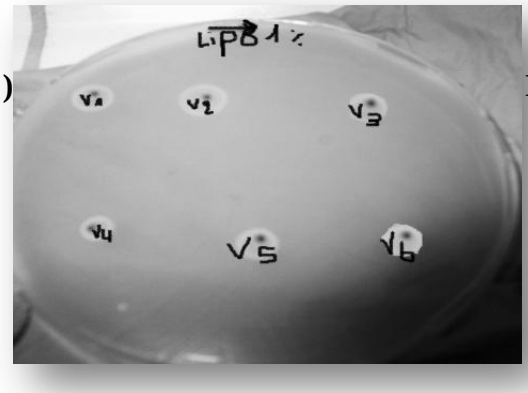
Figure28: L'absence de l'activité protéolytique reflétée par l'absence des zones de protéolyse autour des puits sur la gélose au lait.

A : Les souches isolées de lait cru de chèvres.
B : Les souches isolées de lait cru de chamelle.

2)Activité lipolytique :

Il apparaît que l'ensemble des isolats ne présente pas une activité Lipolytique. **(Figure29)**

A)



B)

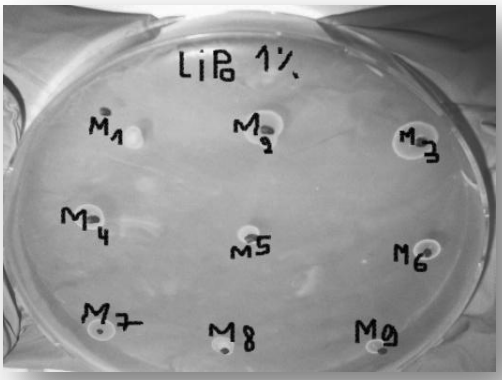


Figure29 : L'absence des zones de lipolyse autour des puits sur la gélose nutritive au Tween80.

A : Les souches isolées de lait de chèvres.
B : Les souches isolées de lais de chamelle.

3) Etude des interactions :

✓ **Méthode directe :**

Tous nos isolats présentent une interaction négative qui correspond à une inhibition de la croissance et de l'activité métabolique envers les quatre souches pathogènes et/ ou d'altération et ce la due soit par leur production des acides organiques dans le milieu de culture soit par la production de peroxyde d'hydrogène et d'autres composés antimicrobiens. **(Figure30, 31, 32, 33)** et **(Tableau18)**

Cependant leurs interactions vis avis la bactérie lactique telles que les *Lactobacillus sp* présentent des interactions positives. (Les souches sont regroupées sous le terme de coopération). **(Figure34, 35)** et **(Tableau18)**

A) **B)** **C)**

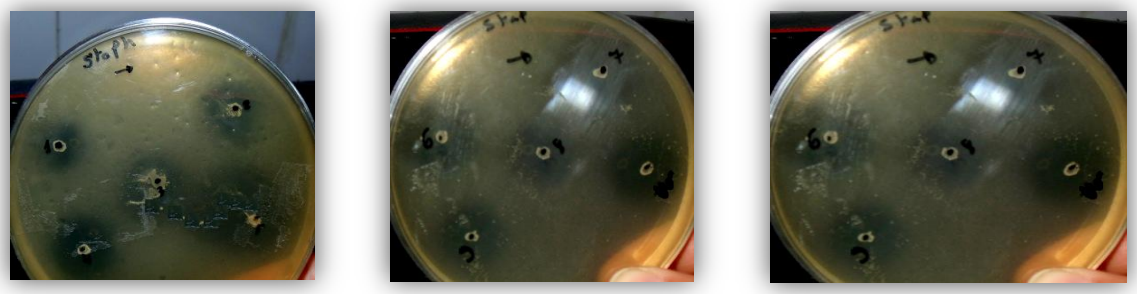


Figure 30: Résultats du test de l'activité antibactérienne (*Spot agar test*) des *Leuconostoc mesenteroides* contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
A) les souches : *V1 ,V2,V3,V4,V5* contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
B) les souches : *V6, M1,M2,M3,M4* contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
C) les souches : *M5, M6,M7,,M8,M9* contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

A) **B)** **C)**

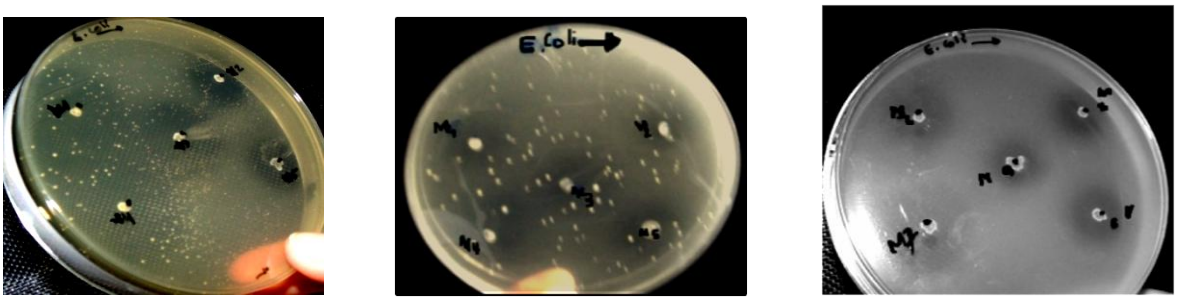


Figure 31: Résultats du test de l'activité antibactérienne (*Spot agar test*) des *Leuconostoc mesenteroides* contre *Escherichia coli* ATCC 25922
A) les souches :*V1 ,V2,V3,V4,V5* contre *Escherichia coli* ATCC 25922
B) les souches :*V6, M1,M2,M3,M4* contre *Escherichia coli* ATCC 25922
C) les souches :*M5, M6,M7,,M8,M9* contre *Escherichia coli* ATCC 25922

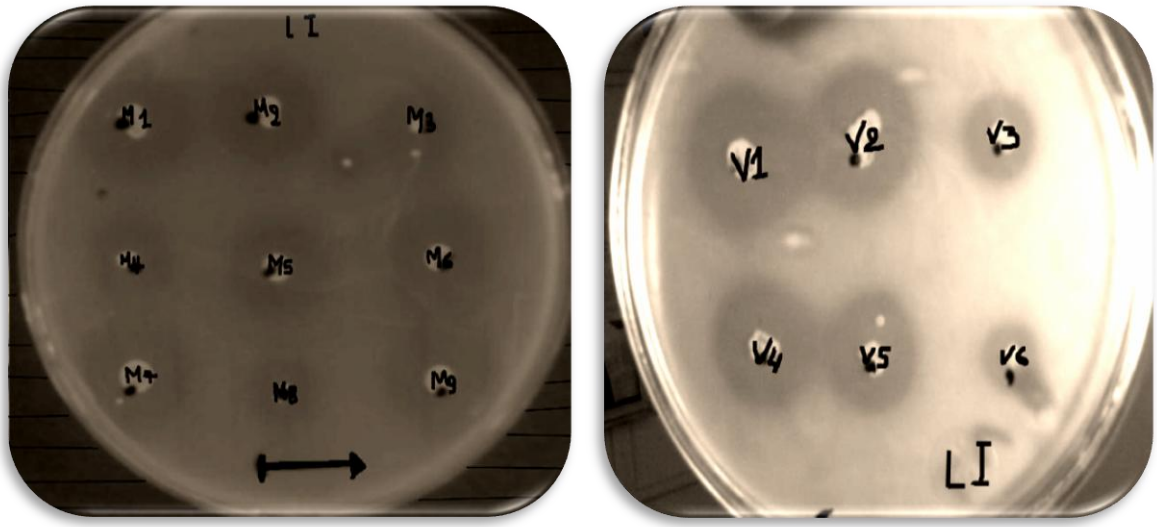


Figure 32: Résultats du test de l'activité antibactérienne (*Spot agar test*) des *Leuconostoc mesenteroides* contre *Listeria innocua* ATCC33090

A : Interaction avec les souches isolées de lait cru de chamelle.
B : Interaction avec les souches isolées de lais cru de chèvres.

A) B)

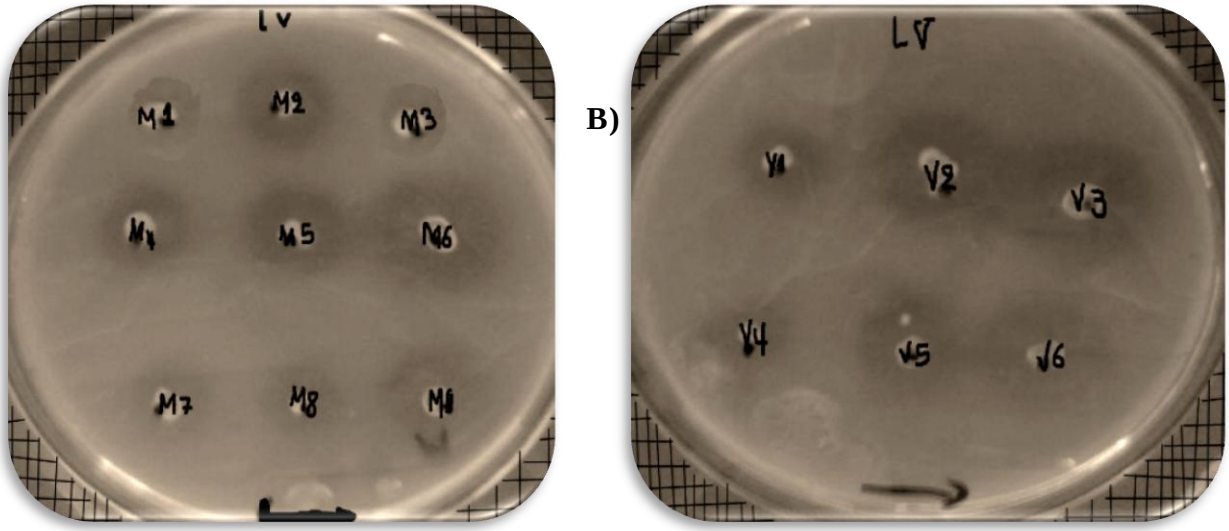


Figure 33: Résultats du test de l'activité antibactérienne (*Spot agar test*) des *Leuconostoc mesenteroides* contre *Listeria ivanovii* ATCC 19119

A : Interaction avec les souches isolées de lait cru de chamelle.
B : Interaction avec les souches isolées de lais cru de chèvres.

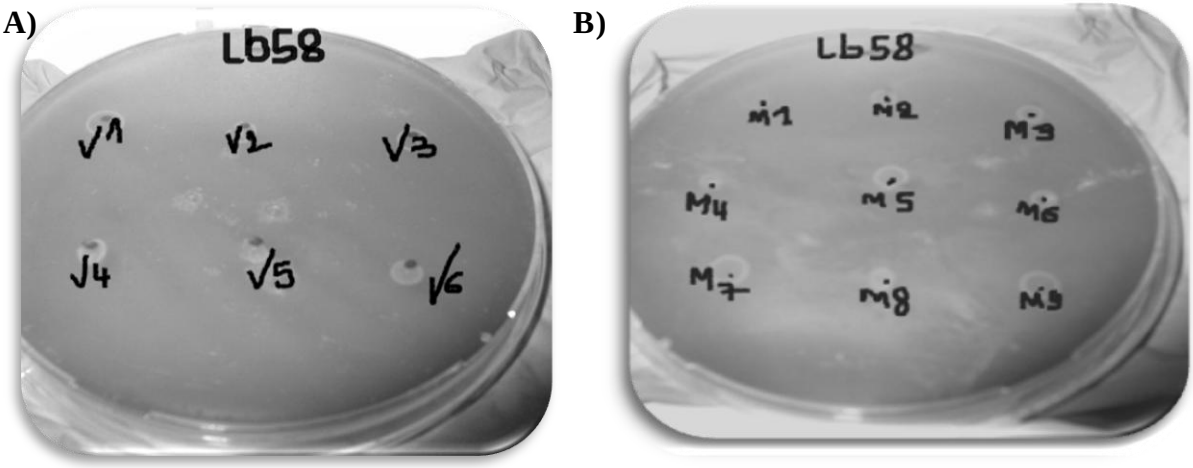


Figure 34: Résultats du test d'interaction bactérienne positive (*Spot agar test*) de *Lactobacillus sp* 58 et *Leuconostoc mesenteroides*.

A : Interaction de *Lactobacillus sp* 58 avec les souches isolées de lait cru de chèvres.
B : Interaction de *Lactobacillus sp* 58 avec les souches isolées de lais cru de chamelle.

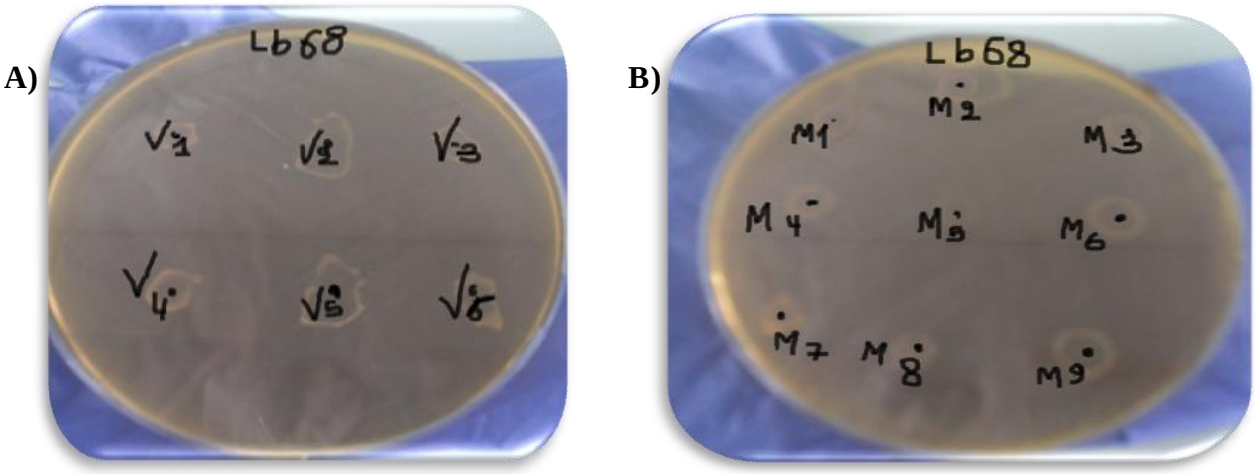


Figure 35: Résultats du test d'interaction bactérienne positive (*Spot agar test*) de *Lactobacillus sp* 68 et *Leuconostoc mesenteroides*.

A : Interaction de *Lactobacillus sp* 68 avec les souches isolées de lait de chèvres.
B : Interaction de *Lactobacillus sp* 68 avec les souches isolées de lais de chamelle.

Tableau 18: Les diamètres des zones d'inhibition de la croissance des bactéries indicatrices.

Souches indicatrices	les diamètres des zones d'inhibition de la croissance des bactéries indicatrices en mm par les souches productrices														
	M1	*M2*	*M3*	*M4*	*M5*	*M6*	*M7*	*M8*	*M9*	*V1*	*V2*	*V3*	*V4*	*V5*	*V6*
Lactobacillus sp58	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactobacillus sp68	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E.coli	**14**	**10**	**11**	**15**	**16**	**13**	**13**	**17**	**20**	**21**	**16**	**20**	**13**	**14**	**12**
Staphylococcus aureus	**12**	**13**	**13**	**13**	**14**	**14**	**11**	**22**	**15**	**16**	**14**	**16**	**10**	**11**	**17**
Listeria ivanovii	**8**	**9**	**7**	**8**	**12**	**8**	**7**	**10**	**12**	**7**	**9**	**10**	**7**	**8**	**9**
Listeria innocua	**8**	**8**	**7**	**9**	**10**	**8**	**9**	**9**	**11**	**11**	**10**	**8**	**8**	**7**	**6**

✓ **Méthode indirecte :**

Pour déterminer si l'inhibition est provoquée par un agent exocellulaire, un 2eme test qui permet de mettre en contact le surnageant des isolats lactiques producteurs de substances antimicrobiennes avec les souches indicatrices.

Elimination de l'effet de l'acide lactique et de peroxyde d'oxygène :

A cette étape on a sélectionné que trois souches lactiques ont un spectre antibactérien contre la plus pare des bactéries pathogènes et a un diamètre d'inhibition ≥ 2mm parmi les souches isolés de milieu lait cru de chamelle (*M5, M8* et *M9*) et trois souches parmi celle des isolas de milieu lait cru de chèvre (*V1, V2* et *V3*) **(Tableau19)** et **(Figure36, 37, 38,39).**

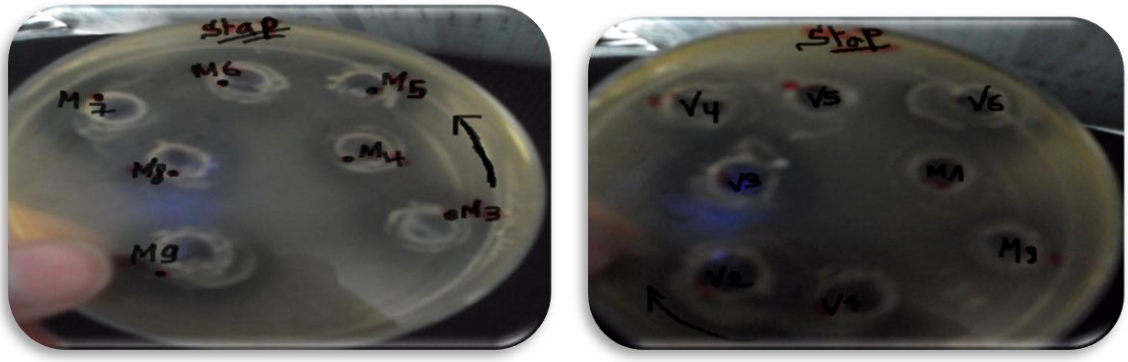


Figure 36: Résultats du test de l'activité antibactérienne (*methode indirecte*) des *Leuconostoc mesenteroides* contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

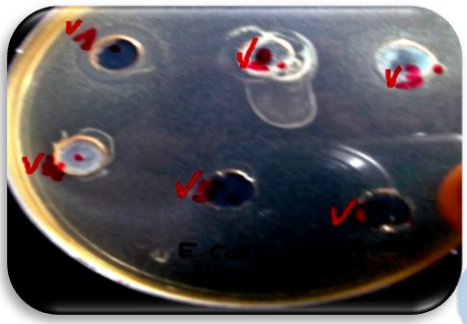


Figure 37: Résultats du test de l'activité antibactérienne (*methode indirecte*) des *Leuconostoc mesenteroides* contre *E.coli* ATCC 25922

Figure 38: Résultats du test de l'activité antibactérienne (*methode indirecte*) des *Leuconostoc mesenteroides* contre *Listeria ivanovii* ATCC 19119

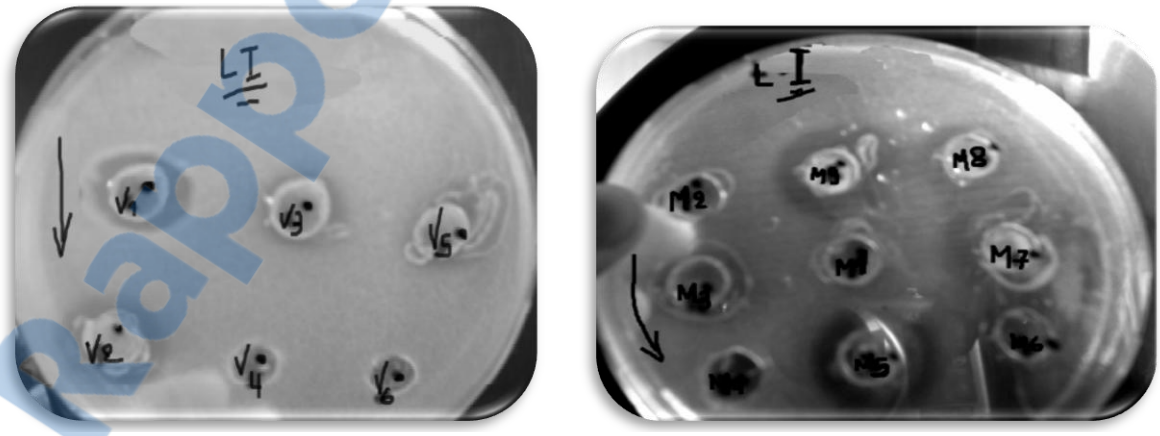


Figure 39 : Résultats du test de l'activité antibactérienne (*méthode indirecte*) des *Leuconostoc mesenteroides* contre *Listeria innocua* ATCC33090

.

Rapport-Gratuit.com

Tableau19: Diamètres des zones d'inhibition (mm) suite à la diffusion sur puits en gélose.

Souches indicatrices	les diamètres des zones d'inhibition de la croissance des bactéries indicatrices en mm par les souches productrices														
	M1	*M2*	*M3*	*M4*	*M5*	*M6*	*M7*	*M8*	*M9*	*V1*	*V2*	*V3*	*V4*	*V5*	*V6*
E.coli	-	-	-	-	-	-	-	-	-	**5**	-	-	-	-	-
Staphylococcus aureus	**20**	**16**	**20**	**10**	**20**	**12**	**16**	**10**	**20**	**16**	**18**	**14**	**14**	**10**	**14**
Listeria innocua	-	-	6	-	**10**	6	-	**6**	**14**	**10**	**6**	**4**	-	4	-
Listeria ivanovii	-	8	8	6	**8**	6	10	**10**	**18**	**16**	**10**	**9**	6	8	-

NB :- Les résultats encadrés en bleu présentent les isolats les plus performants isolés du lait cru de chamelle.

- Les résultats encadrés en vert présentent les isolats les plus performants isolés du lait cru de chèvre.

4)Recherche de la nature de la substance antimicrobienne

✓ Les bactériophages

les résultats de ce test montrent aucune inhibition due à la lysogénie pour l'ensemble des souches**(Figure40)**

A) **B)**

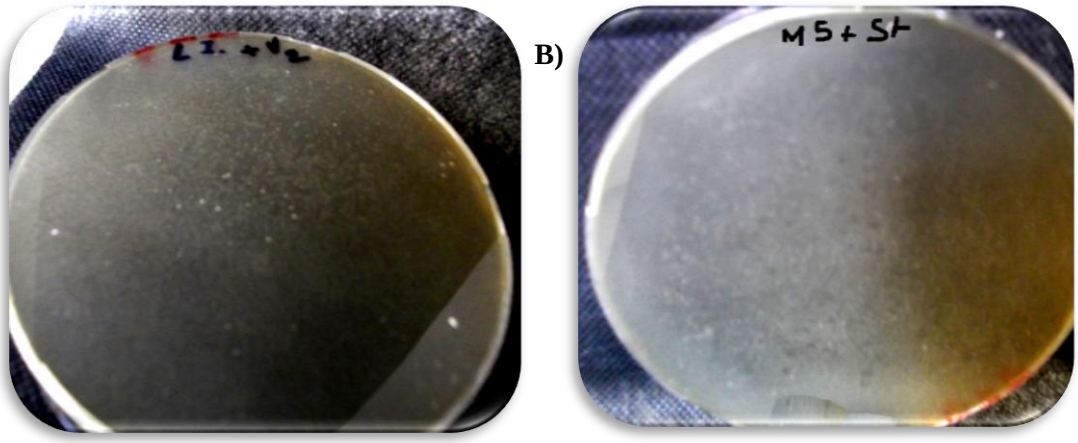


Figure40: Test des phages pour les souches *M5*et*V2*. (Absence des plages de lyse)

A : Absence des plages de lyse pour la souche *V2* isolée de lait cru de chèvres.

B : Absence des plages de lyse pour la souche *M5* isolée de lais cru de chamelle.

✓ **Sensibilité aux enzymes protéolytiques**

L'ensemble des surnageants traité par (trypsine, α-chymotrypsine) montre une sensibilité à ces protéases révélé par l'absence des zones d'inhibition **(Figure41),** ce qui confirme la nature protéique des surnageants **(Tableau14).**

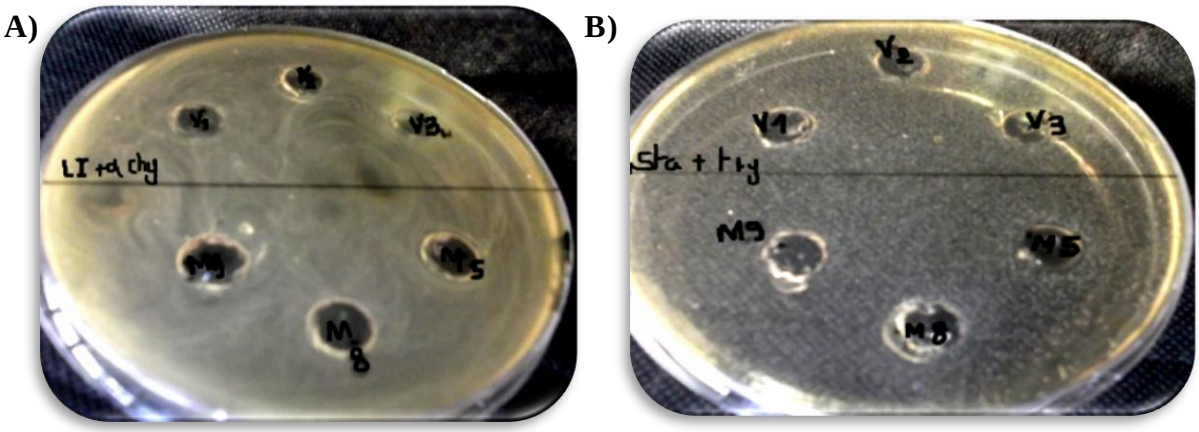


Figure 41: Sensibilité des surnageants des isolats *V1, V2, V3* et *M9, M5et M8* aux protéases ;
A : Sensibilité des surnageants à la trypsine,
B: Sensibilité des surnageants au α-chymotrypsine**.**

✓ **Effet du pH**

L'activité inhibitrice des surnageants est stable à un intervalle de pH entre 4 et 8 pour les six isolats testés suite aux zones d'inhibition inchangeables **(Tableau 14).**

✓ **Effet de la température**

La nature protéique des surnageants bactériens des six isolats (*V1, V2, V3, M5, M8, M9)* a été confirmée par la thermostabilité de ces substances à des traitements thermiques assez élevés (60°C pendant 30min ,80°C pendant 10 min) dont l'inhibition apparaitre inchangeable, tandis qu'elles sont thermosensibles à 100°C pendant 15min et 120°C pendant 1min **(Figure 43)** ; ce qui révèle la nature protéique de ces substances.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

A) **B)**

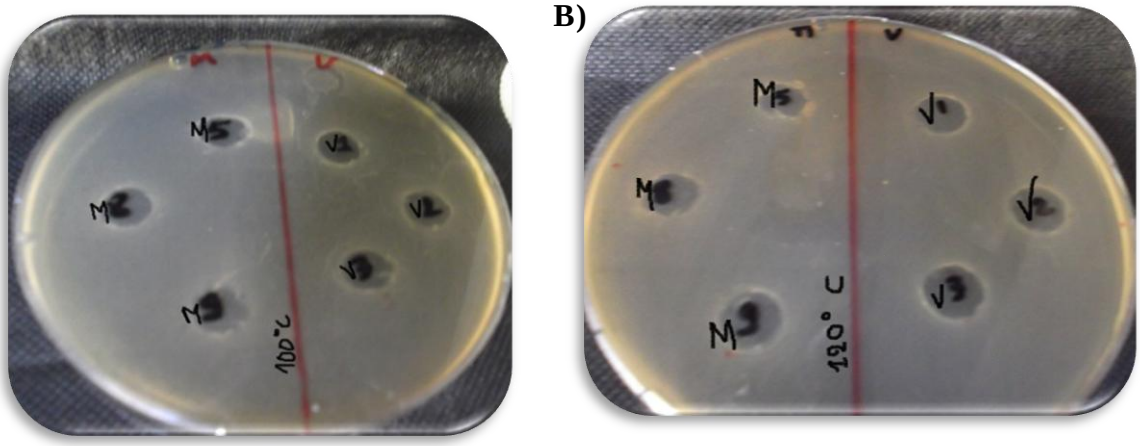


Figure 42: Thermosensibilité des surnageants des isolats *V1, V2, V3* et *M9, M5et M8* ;

A : à 100°C pendant 15min

B : à 120°C pendant 10min**.**

✓ **Effet des solvants organiques :**

Le Tween 80(tensioactif ou agent de surface), améliore l'activité inhibitrice de l'agent produit par *Leuconostoc* en présence des souches indicatrices. Cette constatation a été soutenue par l'augmentation de diamètre de la zone d'inhibition. Cette technique consiste à disperser l'agent antimicrobien de façon homogène et stable dans le milieu de culture du germe étudié (**Allegrini *et al.*, 1973)**.

Au contraire l'addition de 1% de l'urée aux surnageants diminue l'activité inhibitrice de ces derniers illustrés par une diminution de diamètre des zones d'inhibitions **(Figure43), (Tableau20).**

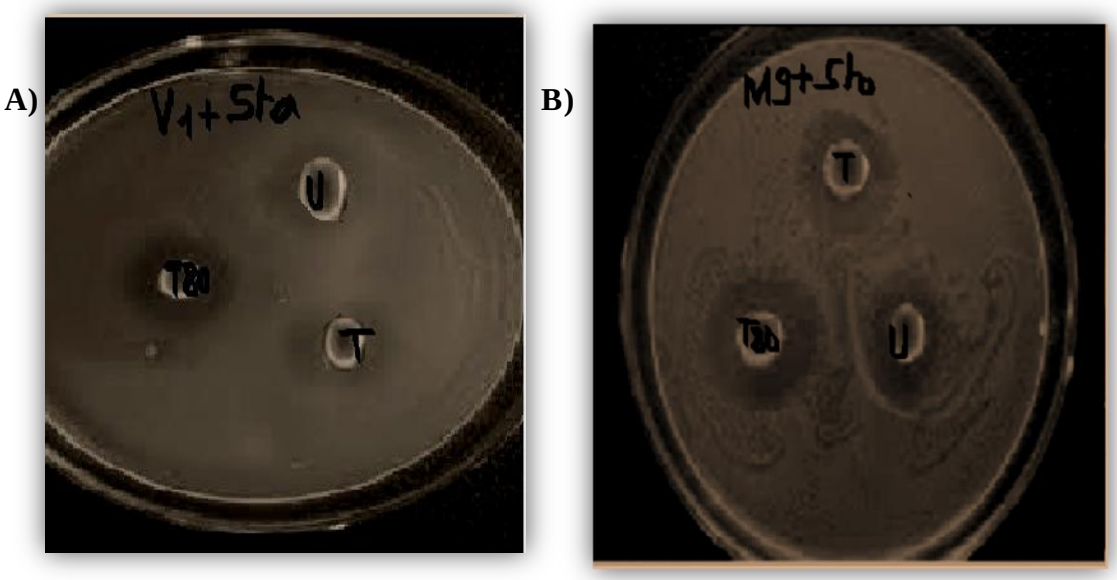


Figure43 : Effet des solvants organiques

A : La souche *V1* isolée de lait de chèvres (T : Témoin ; U : Surnageant +1% de l'urée ; T80 : Surnageant +1% deTween)
B : La souche *M9* isolée de lais de chamelle (T : Témoin ; U : Surnageant +1% de l'urée ; T80 : Surnageant +1% deTween)

Tableau20: Caractérisation de l'agent inhibiteur produit par les isolas test

		Activité antibactérienne des souches productrices					
		V1+LI	*V1+LV*	*V1+Stap*	*M9+LI*	*M9+LV*	*M9+Stap*
Effet du pH	2	-	-	-	-	-	-
	4	9	15	17	14	18	21
	6	10	16	16	14	18	20
	8	6	14	13	11	14	18
	10	-	-	-	-	-	-
Effet de température	60°C /30min	10	16	16	14	18	20
	80°C/ 30 min	10	16	16	14	18	20
	100°C/15min	-	-	-	-	-	-
	120°C/10min	-	-	-	-	-	-
Solvants organiques	Urée	5	9	10	7	10	14
	Tween80	14	20	22	18	23	24

V. 5 Etude de la cinétique d'acidification et de croissance

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

L'étude de l'acidité produite par les deux souches (*M9* , *V1)*, deux souches de *Lactobacilus plantarum* ssp et les quatre souches pathogènes et/ ou d'altérations *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ,*Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria inocoua* ATCC 33090 et *Listeria ivanovii* ATCC 19119 *en culture pure et mixte dans le milieu lait es*t illustré sur les graphes des figures 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48,49,50,51et 52.

Les quatre souches pathogènes et/ ou d'altérations sont moins acidifiantes en culture pure dans le milieu lait par rapport à la culture mixte le potentiel de pH se montre plus acide après 24h. (**Tableau21**).

Tableau21 : résultats d'acidité et de la production d'acide lactique dans le lait écrémé par les souches pathogènes et/ ou d'altérations en culture pure et mixte.

Culture pure	***Stap.***		***E. coli***		***LI***		***LV***	
PH après 24h	6.08		6		5.79		5.88	
°D après 24h	47		46		49		48	
Culture mixte	***Stap+M9***	***Stap+V1***	***E. coli+M9***	***E.coli+V1***	***LI+M9***	***LI+V1***	***LV+M9***	***LV+V1***
PH après 24h	4.98	5.23	5.06	5.34	5.33	5.41	5.04	5.12
°D après 24h	60	57	59	55	55	50	59	60

Les deux souches de *Lactobacillus spp.*,(*Lb58* et *Lb68*)sont plus acidifiantes en culture pure dans le milieu lait par rapport aux nôtres souches de *Leuconostoc* (***M9* et*V1***) au bout de 24h dont en culture mixte le potentiel de pH se montre plus acide après 24h.

Tableau22: Résultats d'acidité et de la production d'acide lactique dans le lait écrémé par les souches lactiques *Lb58* et *Lb68* en culture pure et mixte.

Culture pure	***Lb58***		***Lb68***	
PH après 24h	4.21		4.48	
°D après 24h	76		70	
Culture mixte	***Lb58+M9***	***Lb58+V1***	***Lb68+M9***	***Lb68+V1***
PH après 24h	4.11	4.19	4.25	4.37
°D après 24h	80	76	74	72

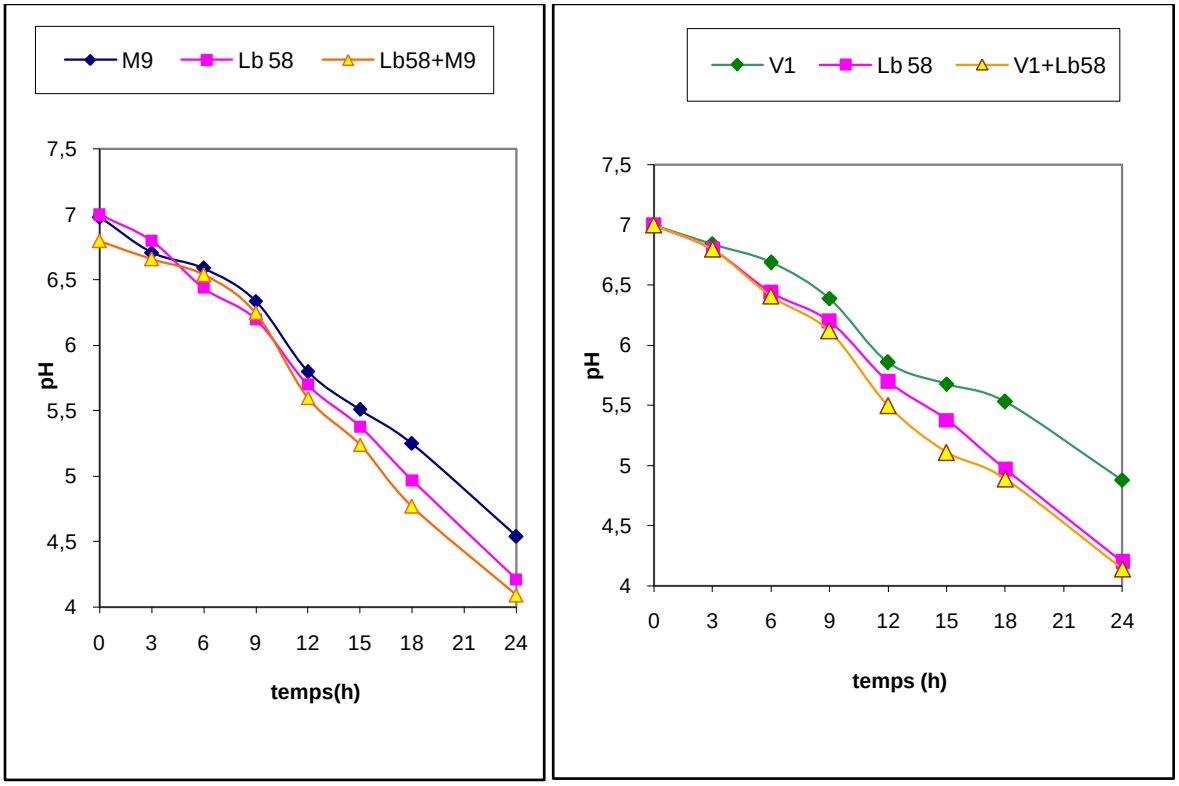


Figure 44: Evolution du pH chez les souches*V1*, *M9* et *Lb58* en culture pure et *V1+Lb58* et *M9+Lb58* en culture mixte

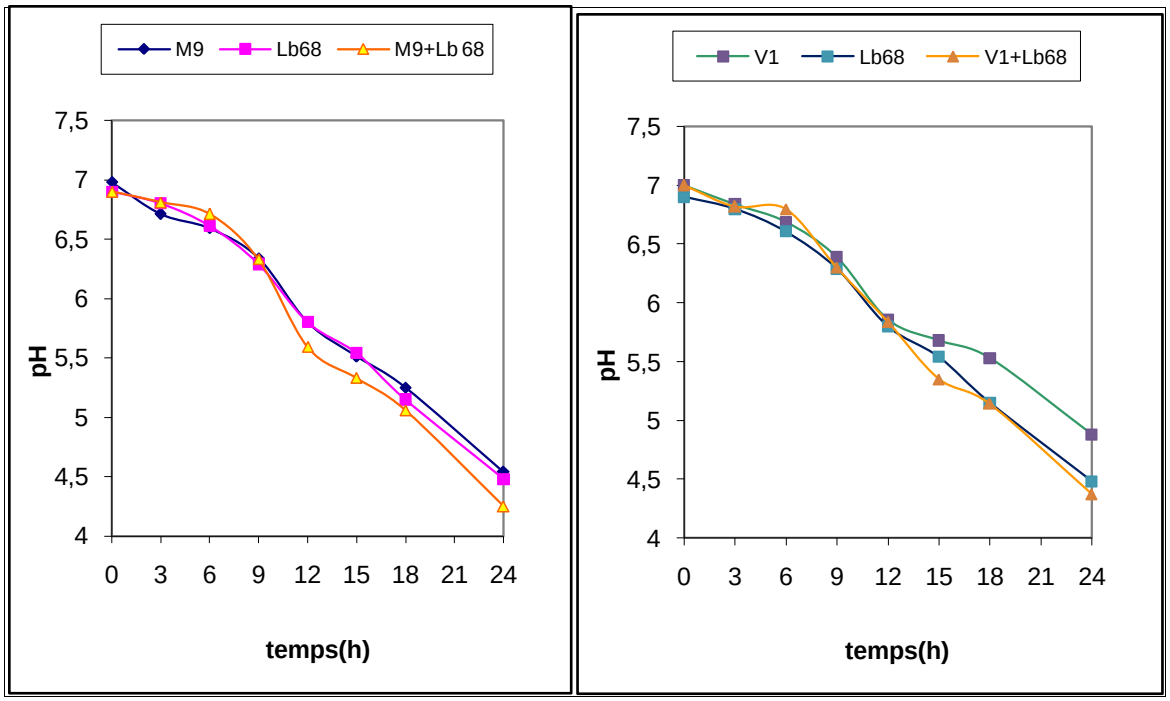


Figure45 : Evolution du pH chez les souches*V1*, *M9* et *Lb68* en culture pure et *V1+Lb68* et *M9+Lb68*en culture mixte

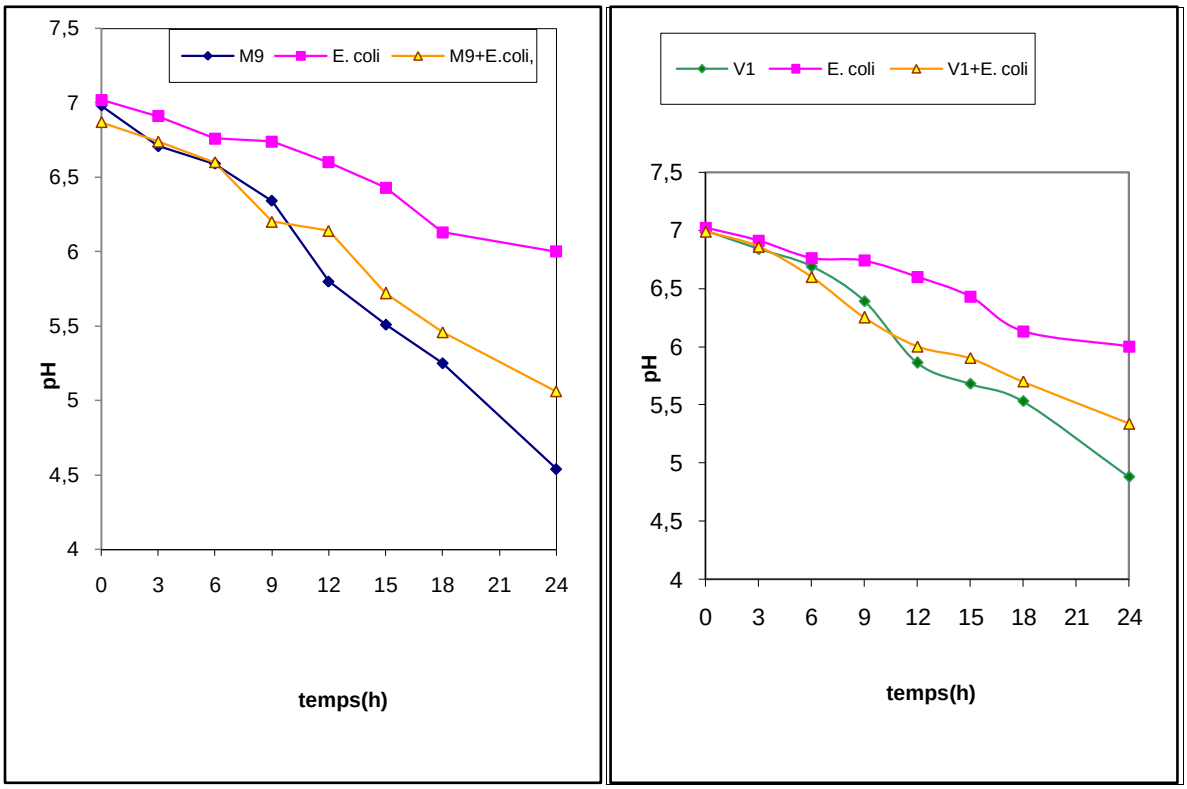


Figure46 : Evolution du pH chez les souches*V1*, *M9* et E.coli en culture pure et *V1+E.coli* et *M9+E.coli* en culture mixte.

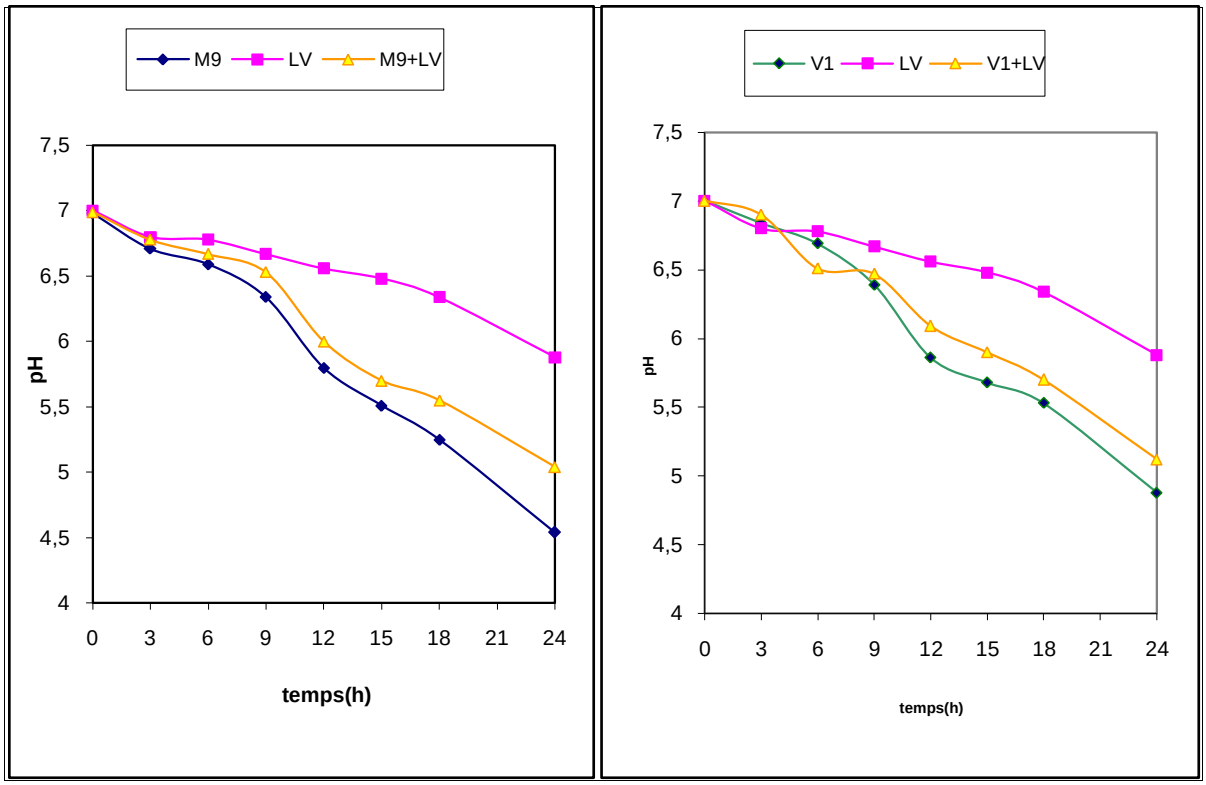


Figure47 : Evolution de pH chez les souches*V1*, *M9* et LV en culture pure et *V1+LV* et *M9+LV* en culture mixte.

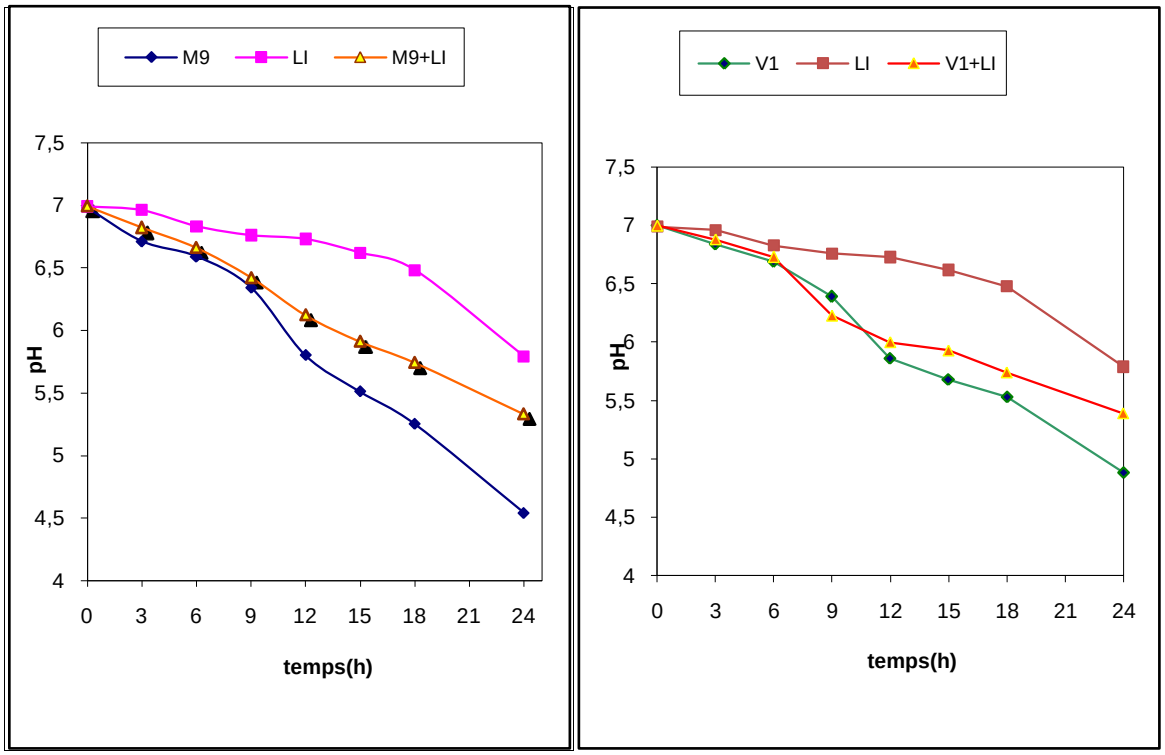


Figure48: Evolution de pH chez les souches*V1*, *M9* et LI en culture pure et *V1+LI* et *M9+LI* en culture mixte.

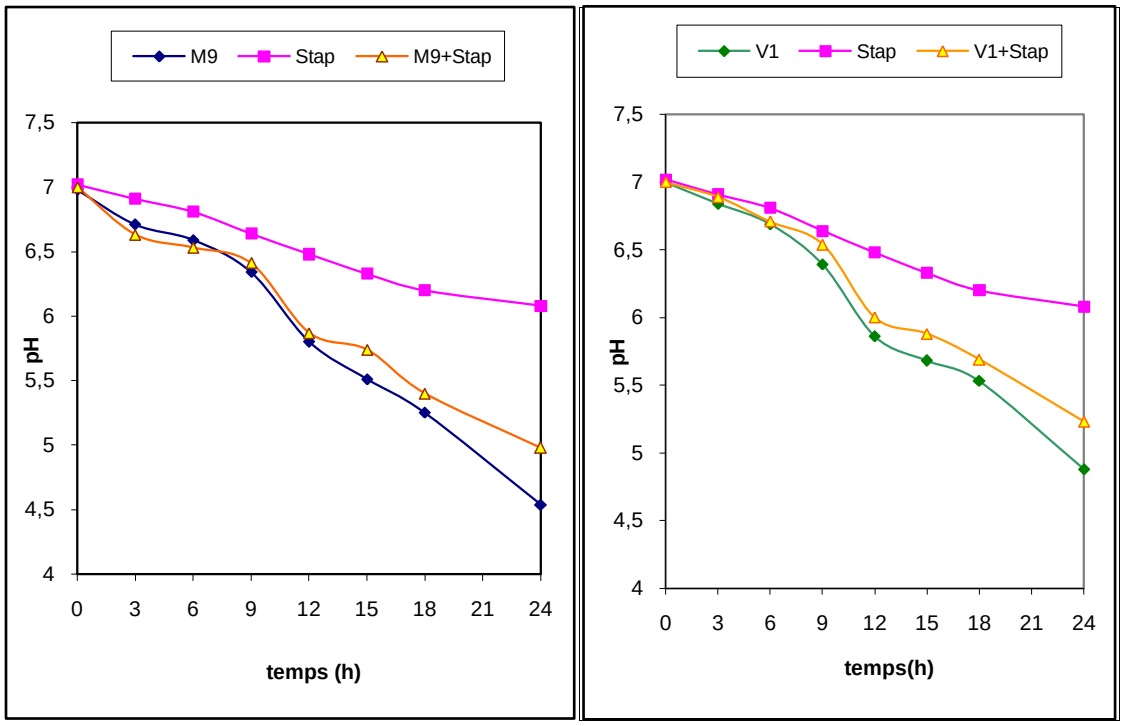


Figure 49: Evolution de pH chez les souches*V1, M9* et Stap. en culture pure et *V1+ Stap* et *M9+ Stap* en culture mixte.

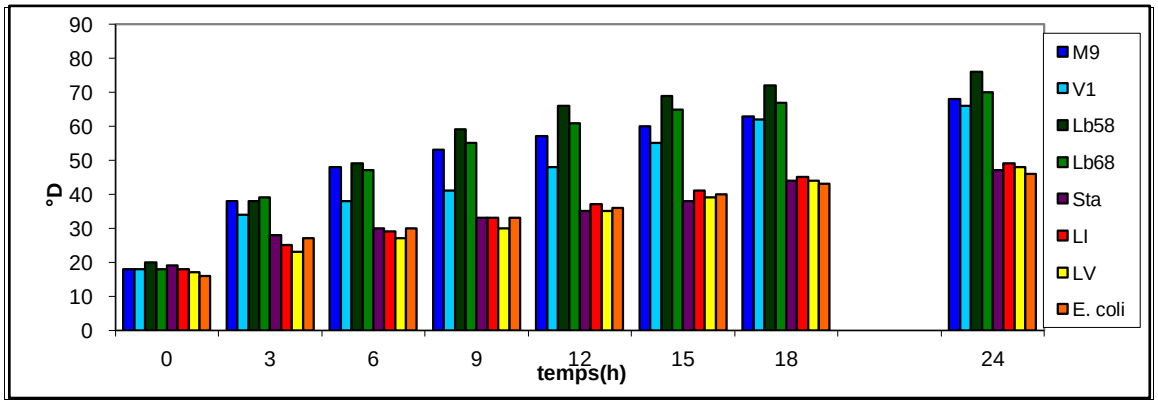


Figure50 : Cinétique d'évolution de l'acidité Dornic chez les *souches M9,V1,Lb58,Lb68, Stap, LI, LV et E.coli* en culture pure

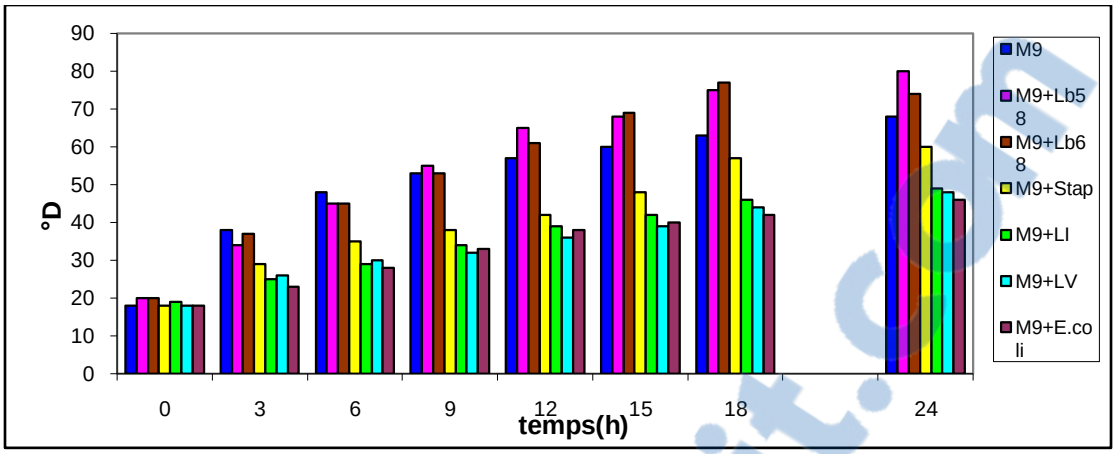


Figure51 : Cinétique d'évolution de l'acidité Dornic chez les souches *Lb58, Lb68, Stap, LI, LV et E.coli* en culture mixte avec *M9*.

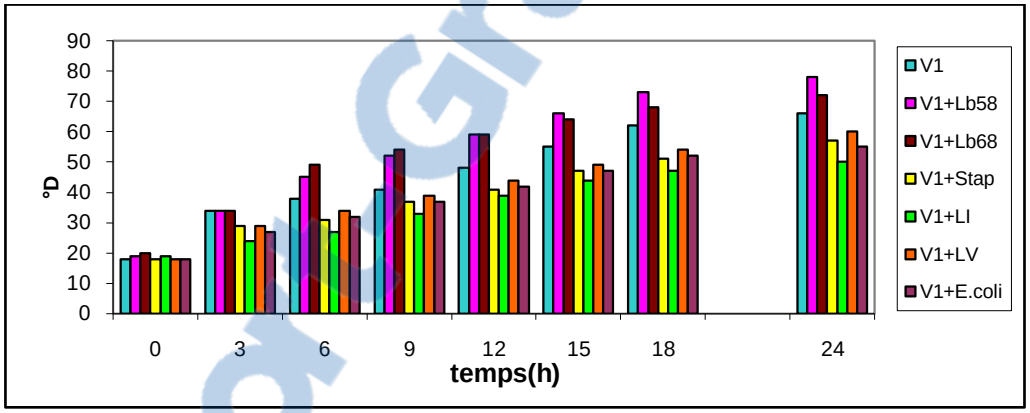


Figure52 : Cinétique d'évolution de l'acidité Dornic chez les souches *Lb58,Lb68, Stap, LI, LV* et *E.coli* en culture mixte avec *V1*

Rapport-Gratuit.com

1)Cinétique de la croissance bactérienne :

✓ **Cinétique de croissance en culture pure :**

Les résultats de ce teste sont présentés dans le **tableau 23** et la **figure 53**, la concentration bactérienne est estimée en Log (ufc/ml) chez tous les souches utilisés, dont la vitesse de croissance est calculée selon l'équation suivante :

$$\mu = \frac{LogN_t - LogN_0}{Ln2*T}$$

Sois N_t : la concentration en microorganismes à t=12h.

Sois N_o: la concentration en microorganismes à t=0h.

Sois T : la période de temps.

Tableau23: Cinétique de croissance en culture pure

Culture pure :	Concentration bactérienne en **LogUFC/ml**			μ
	t=0h	T=12h	T=24	
M9	6.98	10.3	10.18	0.40
V1	6.44	9.45	9.34	0.36
Lb58	6.62	10.41	10.33	0.45
Lb68	6.57	8.9	8.84	0.28
Stap.	6.1	7.74	7.62	0.20
E.coli	5.63	7.11	7.03	0.18
LI	6.33	8.47	8.35	0.26
LV	6.14	8.26	8.14	0.25

✓ **Cinétique de croissance en culture mixte:**

Le taux de croissance des souches pathogènes et/ou d'altérations en culture mixte avec *M9* et *V1*est apparu plus lente par rapport à leurs croissances en culture pure **(Tableau24).**

On peut dire donc que la diminution de la croissance de ces bactéries pathogènes et/ou d'altérations est due a une inhibition par les deux souches *M9* et*V1* cette inhibition est combinée par la production d'acidité et /ou la production des substances antimicrobienne.

Tableau24: Cinétique de croissance en culture mixte

Culture mixte :		Concentration bactérienne en **LogUFC/ml**			µ
		t=0h	T=12h	T=24	
M9+Stap.	***M9***	6.90	10.27	9.93	0.40
	Stap	6.00	6.34	6.30	0.04
M9+E.coli	***M9***	6.97	10.18	10.10	0.38
	E.coli	5.33	6.17	6.08	0.10
M9+LI.	***M9***	6.93	10.14	9.81	0.38
	LI	6.03	6.70	6.51	0.08
M9+LV.	***M9***	6.89	10.2	9.94	0.39
	LV	6.22	6.47	6.39	0.03
V1+Stap.	***V1***	6.42	9.07	9.00	0.31
	Stap	6.06	6.40	6.36	0.04
V1+E.coli	***V1***	6.4	9.20	9.17	0.33
	E.coli	5.36	6.09	5.89	0.08
V1+LI	***V1***	6.26	9.05	8.98	0.33
	LI	6.03	6.83	6.80	0.09
V1+LV	***V1***	6.30	9.11	9.05	0.33
	LV	6.16	6.68	6.53	0.06

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

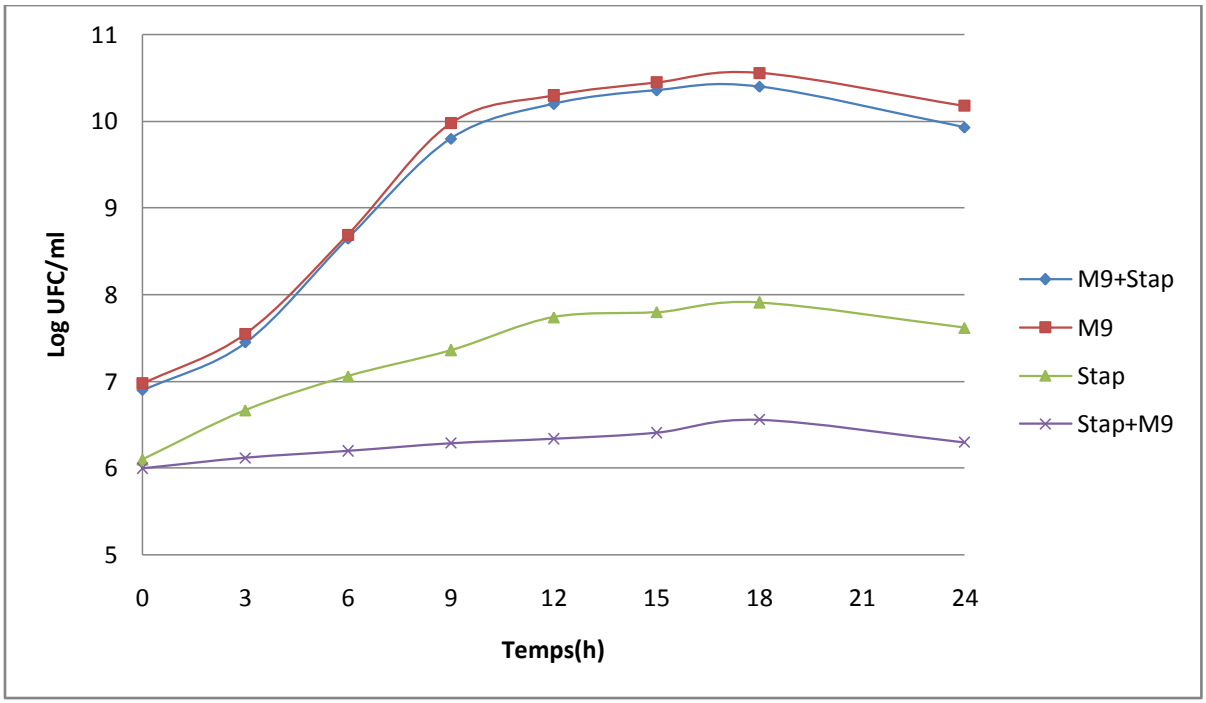


Figure53 : Suivie cinétique des souches *M9* et *Stap*. en culture pure et culture mixte .

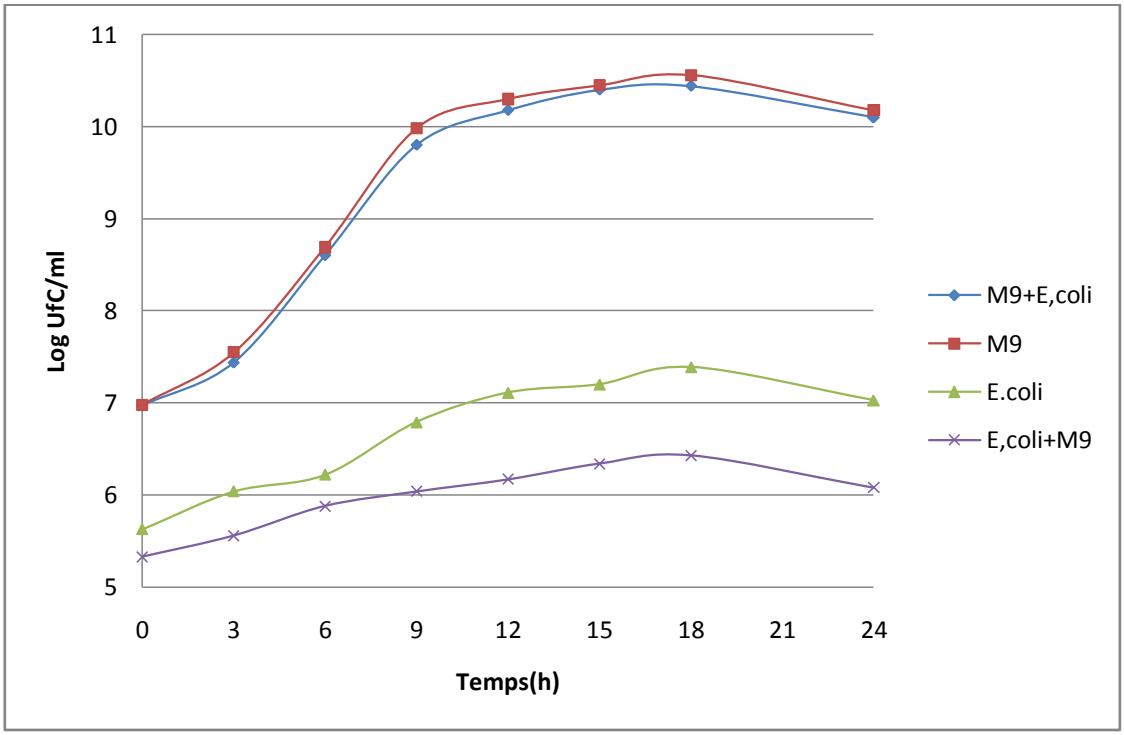


Figure54 : Suivie cinétique des souches *M9* et *E.coli* en culture pure et culture mixte .

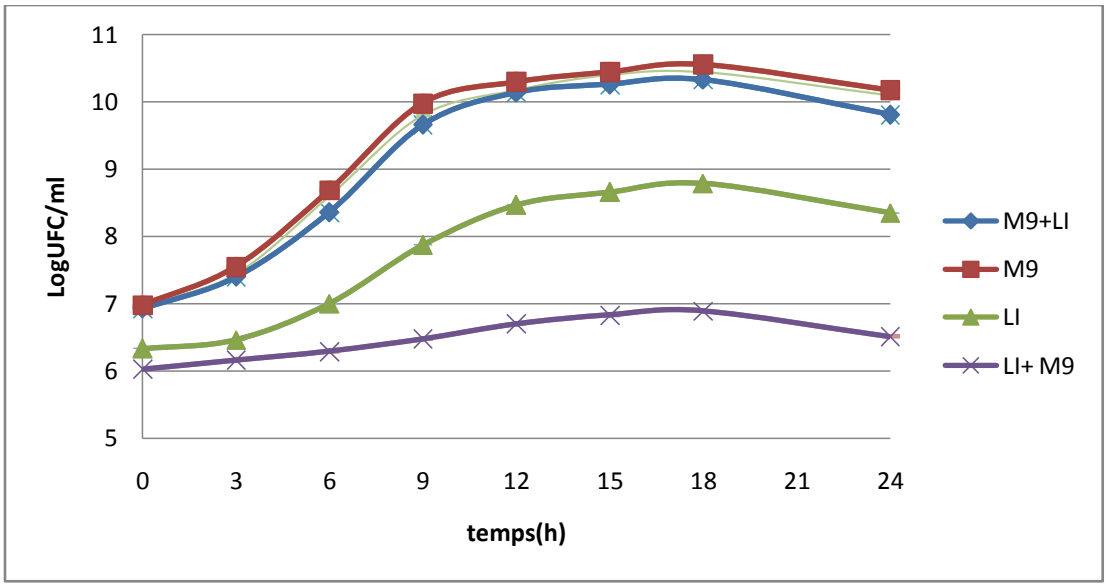


Figure55 : Suivie cinétique des souches *M9* et *LI*. en culture pure et culture mixte.

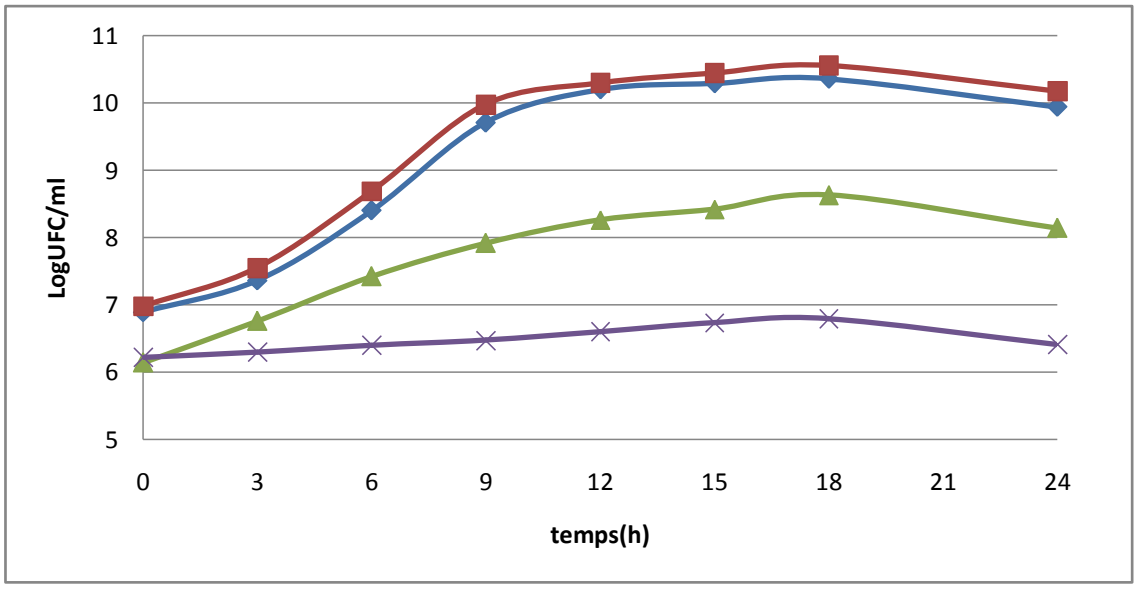


Figure56 : Suivie cinétique des souches *M9* et *LV*. en culture pure et culture mixte.

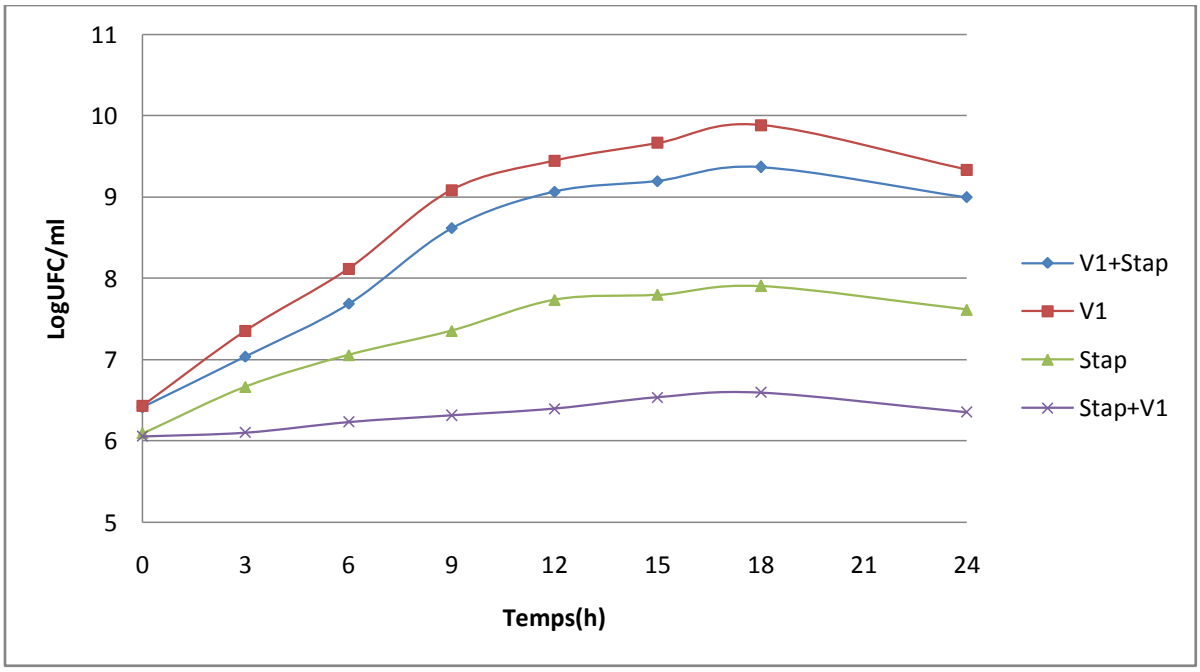


Figure57 : Suivie cinétique des souches *V1* et *Stap*. en culture pure et culture mixte.

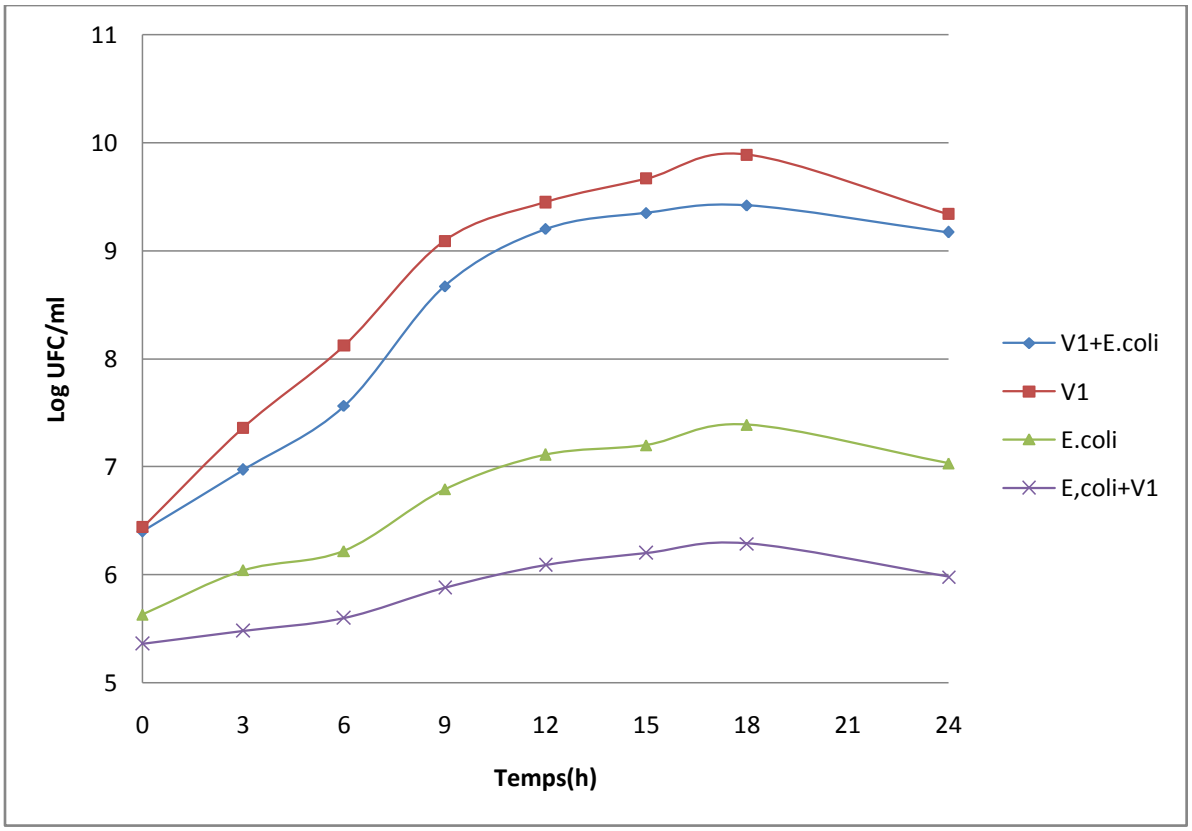


Figure58: Suivie cinétique des souches *V1* et *E*.coli en culture pure et culture mixte.

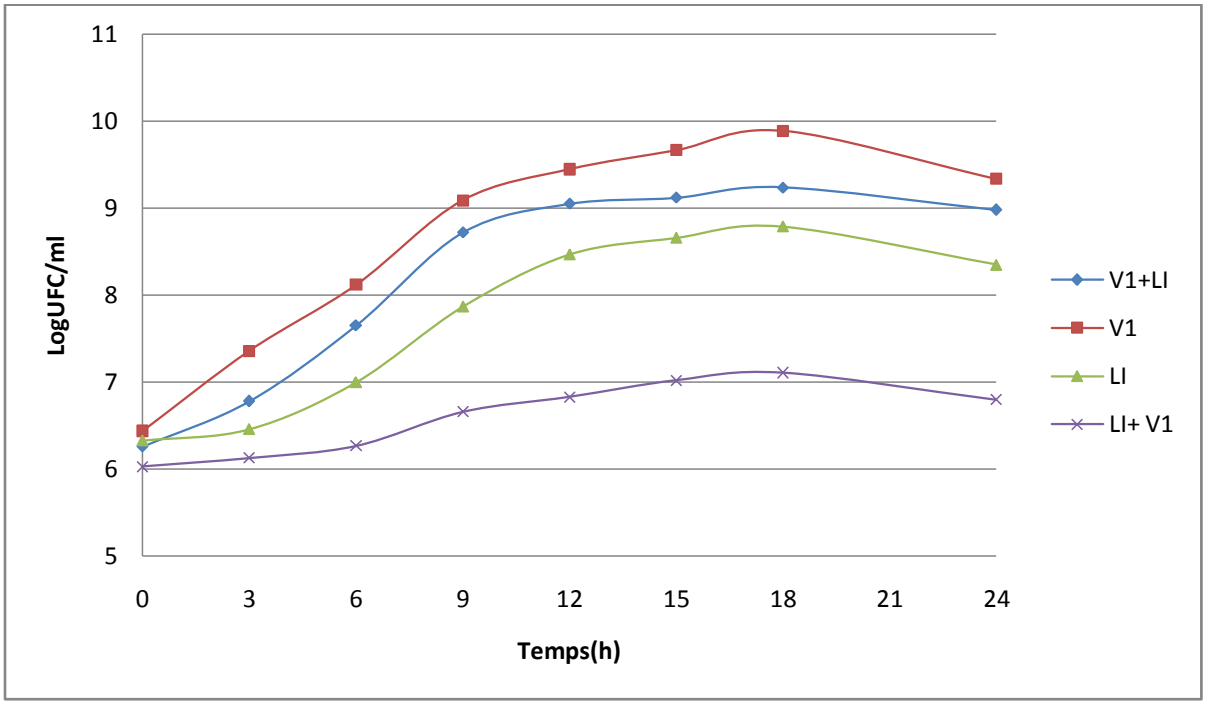


Figure59: Suivie cinétique des souches *V1* et *LI.* en culture pure et culture mixte.

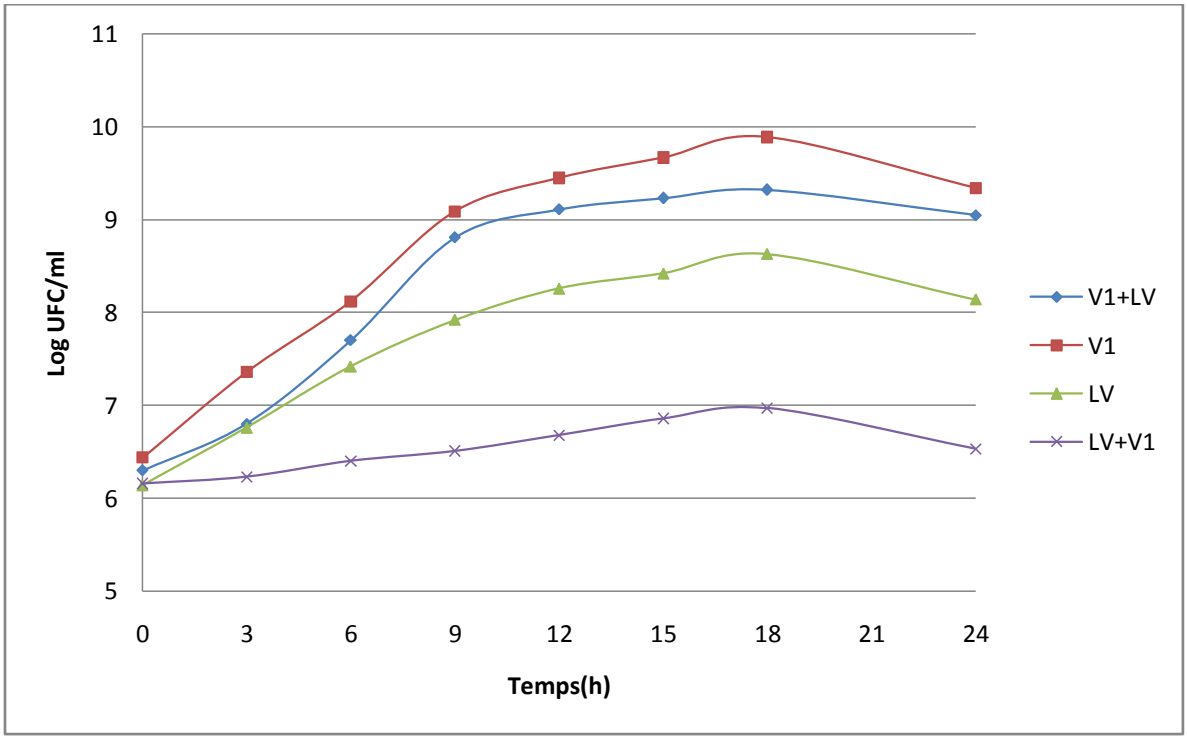


Figure60: Suivie cinétique des souches *V1* et *LV.* en culture pure et culture mixte.

VI. Discussion :

Les *Leuconostoc* se rencontrent dans la nature et font partie de la microflore de la plupart des champs cultivés. On les retrouve souvent sur les plantes et dans divers aliments comme le lait et les produits laitiers fermentés (fromages, kéfir), les végétaux fermentés (vin, cidre, olives, choucroute et la viande**) (Wilhem *et al.*, 2012)**

Pour isoler *Leuconostoc*, on a pris nos échantillons de deux écosystèmes : lait cru de chèvre et de chamelle. Les *Leuconostoc* comme tous les bactéries lactiques besoinent aux milieux riches en différents nutriments pour croître (sucres, acides aminés, acides gras, sels, vitamines) **(Hammes et Hertel, 2006).**

Elles sont essentiellement cultivées dans le milieu Man Rogosa Sharpe (MRS) est un milieu riche qui offre aux bactéries à culture difficile différentes sources de carbone et d'azote, telles que les peptones, le glucose et le Tween 80.

Pour assurer un isolement correct on a additionné 30µg/ml de vancomycine au milieu MRS selon **Mathot *et al.(*1994)** et le milieu hypersaccharosé de Mayeux et Sandine (MSE) **(Badis *et al.*,2005).**

- ***L'étude de l'aspect macroscopique*** *:*

L'étude de l'aspect macroscopique des souches lactiques isolées sur milieu MRS solide semblées des colonies petites, rondes, blanches, et lenticulaires **(Figure17).** Par contre, sur milieu MSE apparaissent transparentes, gluantes et gélatineuses **(Figure23)** suite a l'utilisation du saccharose et formation de dextrane nos résultats semblent a ceux trouvés par **(Badis *et al.*,2005).**

- ***L'etude de l'aspect microscopique :***

L'observation microscopique montre que les cellules sont Gram positive avec une forme ovoïde associées en pairs ou en courtes chainettes **(Figure19) ;(Kihal, 1996 ; Carr *et al*, 2002) .**

- ***Caractéristiques physiologiques et biochimiques :***

Tous les isolats présentent une activité catalasique négative, capablent de produire du gaz à partir du glucose (hétérofermentaires**) (Figure 20),** incapable de dégrader l'arginine ; ces isolats sont considérés du genre de *Leuconostoc* (**Garvie, 1986 ; Badis *et al.*, 2005 ; Ogier *et al.*, 2008 ; Ghazi *et al.*, 2009**).

On a pu sélectionner 6 souches de ce genre comme souche pures isolées de Lait cru de chèvre codés par (*V1, V2, V3, V4, V5, V6*) et 9 souches isolés de lait cru de chamelle codés comme suit : (*M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9*).

- ✓ **La croissance à différentes températures et la thermorésistante :**

Toutes nos souches isolées et purifiées ont poussé à 15°C, 30°C et 37°C mais pas à 4°C ni a 45°C ce qui confirme leurs caractères mésophile, la thermorésistance à été aussi testé à 63.5°C pendant 30min dont la croissance de nos souches et rester négative chez tous les isolats par contre les isolats ont pu résister à 55°C pendant 15min ; nos résultats semblent a ceux trouvés par **Garvie (1984)** et **(Dellaglio *et al.*, 1994)** les *Leuconostoc* sont généralement mésophiles, avec une température optimale de croissance de 25 - 30°C

- ✓ **La croissance à différent pH :**

Les isolats poussent à pH 6.5 et non pas à pH 4,8. Ce qui est confortabe aux réssultats de **Mc Donald *et al.*, (1990)** qui a mentré que les *Leuconostoc* "laitiers" se développent le mieux à un pH proche de celui du lait et sont inhibés en milieu acide (le pH interne de la cellule atteint 5,4-5,7).

- ✓ **La croissance à différentes concentration de NaCl** :

Tous les isolats sont résistants à 3% de NaCl ; mais pas à 6.5% de NaCl.

Ces caractéristiques physiologiques et biochimiques sont confortables aux résultats de **(Dellaglio *et al.*, 1994)**

- ✓ **La production de dextrane sur le milieu MSE :**

Est un caractère important pour différencier entre les espèces de *Leuconostoc*: *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides, Leuconostoc mesenteroides* ssp. *dextranicum* 15 isolats sont capables de dégrader le saccharose et de produire le dextrane ;

a) **de grosses colonies gluantes**, devenant rapidement confluentes au fur et à mesure que l'incubation se prolonge; Reflètent l'aspect macroscopique de *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides*

b) de petites colonies (2 mm environ de diamètre) bombées et adhérant fortement à la surface de la gélose. Reflètent l'aspect macroscopique de *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *dextranicum* , ce qui a été montré par **(Mayeux et Lliker, 1962 ; Garvie, 1984 ; Carr *et al.*, 2002 ; Badis *et al.*, 2005)**

- ✓ **L'hydrolyse de l'esculine :**

L'esculine est un hétéroside (molécule composée d'un ose associée à une structure non osidique).

L'hydrolyse de l'esculine, catalysée par une β-glucosidase : **l'esculinase**, est un des critères usuels utilisé dans l'identification différentielle au sein de nombreux genres bactériens La dégradation de l'esculine en glucose et esculinite est détectée par l'observation d'un complexe noir formé entre esculétine et le citrate de fer**.(Guiraud,1998)** Les résultats obtenus montrent que toutes nos souches sont capables de dégrader l'esculine sauf *M2* et *M9* qui sont incapables de le dégrader. Selon **Badis *et al.* (2005)** le caractère de l'hydrolyse d'esculine est variable chez les espèces de *Leuconostoc mesenteroide*s selon la souche testée.

- ✓ **L'utilisation de citrate**

La fermentation des citrates est un phénomène important chez *Leuconostoc* puisqu'elle est en relation très étroite avec l'activité aromatique de ces microorganismes. **(Raynaud *et al.*, 2003)**.

Les 15 souches présentent un résultat positif sur le milieu KMK par une formation des colonies bleus ce qui a été déjà démontré par **(Bellengier *et al.*,1994 ; Kihal *et al.*,1996 et Guirraud,1998)**

- ✓ **La production d'acétoine :**

La production d'acétoine à partir du glucose est aussi un test important pour l'identification des espèces du *Leuconostoc* et pour pouvoir sélectionner les souches d'intérêt technologiques. En présence d'une base forte, l'acetoine donne une coloration rose à rouge en milieu très oxygéné (oxydation en diacétyle), cette coloration apparaît chez *Staphylococcus. aureus* qui a été utilisé comme référence vu leur capacité à produire l'acétoine **(Guiraud. 1998),** tandis que nos souches ne produisent pas d'acétoine ce qui est conforme aux résultats crrespondent aux deux sous-espèces *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides, Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* rapportés par **(Badis *et al.*,2002 ; Badis *et al.*,2005 et Ghazi *et al.*,2009)**

- ✓ **L'utilisation des carbohydrates**

Même si les souches lactiques se développent dans une variété d'habitat, elles exigent des carbohydrates fermentescibles, des acides aminés et des acides gras, des sels et de vitamines pour leurs croissances **(Hemme *et al.*, 1980).**

L'établissement des profils fermentaires de nos souches, nous permet de constater qu'on à deux sous espèces *: Ln. mesenteroides subsp. mesenteroides* et *Ln. mesenteroides subsp. dextranicum* dont le sucre clé était l'arabinose selon les auteures : **(Car *et al.*, 2002 ; Badis *et al.*, 2005 ; Hammes et Hertel, 2006 ; Khedid *et al.*, 2006)**

Toutes les souches fermentent le glucose, le lactose, le galactose, le saccharose, le fructose, le maltose, tandis qu'elles possèdent une lente ou bien ne fermentent pas le mannitol, le rhamnose, le raffinose, le sorbitol, la xylose.

Alors nous avons pu conclure qu'on a 15 souches de *Leuconostoc* dont 06 appartiennent à *Leuconostoc mesenteroides* subsp *dextranicum « V3,V5, M2, M6, M7, M9 »* et 09 « *V1,V2,V4,V6,M1,M3,M4,M5,M6,M8* » à *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides* .

- ***Les caractéristiques biotechnologiques des isolats***

Les principales fonctions demandées aux levains lactiques sont :la production d'acide, la protéolyse, la lipolyse, la production de gaz et d'arôme et l'inhibition des bactéries indésirables (pathogènes entre autres). **(Stadhouders, 1974).**

- ✓ **Pouvoir protéolytique**

Les résultats obtenus dans cette étude montrent l'absence d'activité protéolytique sur MRS additionné avec 1% de lait écrémé ces résultats sont en concordance avec ceux de **(Garvie ,1986)**

- ✓ **Pouvoir Lipolytique**

Nos résultats montrent l'absence d'activité lipolytique en milieu MRS additionné par tween 80. Ces résultats sont en accord avec ceux de (**Stackebrandt *et al.*, 2002)** qui a montré que La lipolyse est relativement faible chez les ferments lactiques ainsi selon **(Meyers *et al.*, 1996 ; Karam N-E, 2012 ; Belkheir K. *et al.*, 2012)** qui ont montré que l'activité lipolytique en milieu MRS additionné par les substrats lipidiques comme le Tween 80 comme unique source lipidique était plus faible ou absente chez les *Leuconostoc mesenteroides SPP*.

- ✓ **Etude des interactions**

1-Méthode directe

Tous nos isolats présentent une interaction négative qui correspond à une inhibition de la croissance et de l'activité métabolique envers les quatre souches pathogènes et/ ou d'altération .Cependant, l'étude des interactions entre les bactéries lactiques (*Ln. mesenteroides* et *Lb. plantarum*) a révélé une interaction positive qui se caractérise par

Rapport-Gratuit.com

La symbiose entre les deux bactéries (Les souches sont regroupées sous le terme de coopération) ;**(Figures 34, 35) et (Tableau18).**

Les résultats exposent que les diamètres d'inhibitions varient selon les espèces. **(Figures 30,31, 32, 33) et (Tableau18)** Dont on a marqué:

-V*1* comme la souche la plus performante contre *E.coli* avec un diamètre d'inhibition égale à 21_{mm} ;

- *M8* comme la souche la plus performante contre *Stap*. avec un diamètre d'inhibition égale à 22_{mm} ;

-*M5* comme la souche la plus performante contre *LV* avec un diamètre d'inhibition égale à 15_{mm} ;

-*M9* et *V1* comme les souches les plus performantes contre *LI* avec un diamètre d'inhibition égale à $11_{mm.}$

Cette action antimicrobienne est expliquée par la synthèse des molécules comme les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyle et les bactériocines **(Vuyst et Vandamme 1994).**

2-Méthode indirecte :

Le criblage pour la production de substances antagonistes a été réalisé dans des conditions excluant toute inhibition éventuelle qui pourrait être due à l'acidité ou à la production du peroxyde d'hydrogène, en utilisant respectivement des milieux de cultures tamponnés et la catalase**. (Alakomi *et al.*, 2000).**

Ce test a montré que six isolats ont un pouvoir *antibactérien* assez remarquable et qui sont les suivants : (*M5, M8, M9, V1, V2, V3*). Ce qui indique la synthèse d'autre substance antibactérienne et exclut donc la présence d'eau oxygénée ou de diacétyle dont l'activité antibactérienne persiste après contact avec l'enzyme non protéolytique (catalase) et au milieu tamponné.

- ✓ **Recherche de la nature de la substance antimicrobienne :**

L'activité anti bactérienne de l'extrait de culture de *Leuconostoc* disparaît complètement en présence de 2 enzymes protéolytiques (la trypsine et la α chymotrypcine) ces résultats suggèrent que le facteur antibactérien produit est donc de nature protéique c'est-à-dire bactériocine.

La bactériocine produite par nos isolats conserve son activité antagoniste après avoir été soumise à des traitements thermiques assez élevés comparables à la pasteurisation du lait (60°C pendant 30min, 80°C pendant 10min) au contraire elle est thermosensible après les traitements thermiques (100°C pendant 15min et 120°C pendant 10min). Elle est aussi

stable à pH 4, pH 6 et pH 8 ; alors qu'elle est inactive a pH 2 et pH 10. Ces caractéristiques confèrent un grand intérêt technologique dans le cas de son utilisation dans la bioconservation des aliments.

L'incubation de ces substances protéiques en présence des solvants organiques

Montre :

- une élévation des zones d'inhibition en présence de Tween 80 **(Tableau 20)** ces résultats sont similaires avec ceux de **(Huot *et al.*,1996)** qui a expliqué que :

-L'effet de Tween 80 pourrait être due à une stabilisation d'une configuration favorable des molécules de bactériocine ;

- plus de son rôle en tant que facteur de croissance pour les bactéries lactiques, Tween 80 affecte également la solubilité et l'activité des agents antimicrobiens hydrophobes en raison de ses propriétés émulsifiantes ;

-Il a semblé affecter la perméabilité cellulaire dans certains micro-organismes à la fois pour favoriser l'absorption et la sortie des composés de cellule par une modification de la perméabilité de la membrane plasmique.

- une diminution de l'activité antimicrobienne en présence de l'urée suite a la dénaturation de ces substances protéiques par cet agent dissociant **(barefoot *et al.*, 1994).**

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

L'étude de l'acidité produite par les deux souches *M9* et *V1* en milieu lait est évaluée par la quantité d'acide lactique produit et exprimée en degré Dornic (°D) liée à la croissance des bactéries et la fermentation de lactose en acide lactique.

✓ **Suivi cinétique de *M9* et *V1***

Les résultats de ce suivi montrent une production d'acide lactique qui dépasse le 65°D pour les deux souches et une diminution de pH (**4.54** pour la souche *M9* et **4.88** pour la souche *V1)* après 24h d'incubation.

✓ **Suivi cinétique de *Lb58* et *Lb68***

Les deux souches de *Lactobacillus spp.,* sont plus acidifiantes en culture pure dans le milieu lait par rapport aux nôtres souches de *Leuconostoc* (***M9* et*V1***) au bout de 24h . Cependant en culture mixte ou bien la combinaison entre les deux bactéries lactiques (*Lactobacillus spp. et Leuconostoc spp*.) servent à la formation rapide de l'acide lactique et à la diminution du pH qui lui est liée et qui est importante pour la technologie alimentaire.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

- ✓ **Suivi cinétique des quatre pathogènes et/ou d'altérations :**

Staphylococcus aureus ATCC 25923 ,*E. coli* ATCC 25922, *Listeria inocoua* ATCC 33090 et *Listeria ivanovii* ATCC 19119 sont illustrés sur les graphes **(Figures 44, 45, 46, 47, 48 et 49)** sont moins acidifiantes en culture pure dans le milieu lait par rapport à ses cultures mixtes (avec *M9* et *V1*) **;(Tableau21).**

- ➢ **Cinétique de croissance en culture pure et mixte:**

Le taux de croissance des souches en culture mixte avec *M9* et *V1*est apparu plus lente par rapport à leurs croissances en culture pure.

Tandis que, l'inhibition de la charge *Staphylococcus aureus*, affichent une régression de croissance après l'addition des isolats *M9* et *V1* de l'ordre de 20% des résultats semblables ont été rapportés par **(Noonpkdee *et al.*, 2003)** ;

Alors l'inhibition de la charge *Escherichia coli*, affichent une régression de croissance après l'addition des isolats *M9* et *V1* de l'ordre de 55.55% pour *M9* et 22.22% pour *V1* ;

Enfin l'inhibition de la charge de *Listeria inocoua* et *Listeria ivanovii*, affichent une régression de croissance après l'addition des isolats *M9* et *V1* de l'ordre de 30.76% et 34.61% respectivement pour *Listeria inocoua et de12% et 24%* pour *Listeria ivanovii* **(Figures 53, 54, 55, 56, 57, 58,59 et 60).**

On peut dire donc que la diminution de la croissance de ces bactéries pathogènes et/ou d'altérations est due a une inhibition par les deux souches *M9* et*V1* cette inhibition est combinée par la production d'acidité et /ou la production des substances antimicrobienne des résultats similaires ont été observé par **(Ammor, 2006) et (Guessas, 2006).**

Conclusion :

Les bactéries lactiques sont les micro-organismes dominants retrouvés au cours de la fermentation de la majeure partie des aliments, ou principalement dans les produits laitiers Leurs principales fonctions comprennent la production d'acides organiques, d'alcool et de composés aromatiques ainsi que d'autres effets tels que la stimulation des levures, l'inhibition des micro-organismes pathogènes, l'amélioration de la qualité nutritionnelle, les propriétés probiotiques, l'élaboration de la texture de l'aliment et la dégradation des composés toxiques.

Parmi ces bactéries lactiques, les Leuconostocs qui ont été ciblés dans notre isolement à partir de lait cru de chèvre et de chamelle, dont on a utilisé le milieu MRS additionné à la vancomycine (30µg/ml) pour sélectionner les Leuconostocs qui résistent à cet antibiotique contrairement aux autres bactéries lactiques.

L'identification des souches a été réalisée après une série de sélection et purification pour la détermination des caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques des 15 diverses souches apparenté a ce genre

D'après les critères phénotypiques nous avons pu conclure qu'on a 15 souches de *Leuconostoc* dont 06 appartiennent à *Leuconostoc mesenteroides* subsp *dextranicum* et 09 à *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides* et qui se différencier par un seul sucre clé l'arabinose

Nous avons également apprécié les qualités technologiques, de ces diverses souches, qui même si elles sont non protéolytiques, non lipolytiques, ne produisant pas d'indole, mais présentent une bonne performance technologique telles que la synthèse de dextrane utilisé pour la texturation de compositions alimentaires, la fermentation du citrate qui présente un phénomène important pour nos isolats puisqu'elle est en relation très étroite avec l'activité aromatique de ces microorganismes.

L'étude des interactions nous a permis de confirmer que les *Leuconostoc* ont des interactions positives avec les *lactobacilluces* sp. ainsi ils ont une capacité de produire des substances antimicrobiens qui ont un effet sur les bactéries Gram positif (*Listeria*

inocoua, *Listeria ivanovii* et *Staphylococcus aureus*) et gram négatif (*Escherichia coli).* Les différents testes ont montré que la substance produite est de nature protéique (bactériocine).

Par ailleurs le suivi cinétique de croissance, d'évolution du pH et de l'acidité en milieu lait à prouver l'efficacité des souches performantes (*M9, V1*) pour maitriser les bactéries pathogènes en réduisant significativement la charge des souches d'altérations et/ou pathogènes dans le milieu lait.

Les résultats de notre recherche permettent d'ouvrir de nouvelles perspectives.

Donc pour compléter ce travail sur les caractéristiques biotechnologiques de Leuconostoc isolé à partir de lait cru de chèvre et de chamelle, nous proposons :

- Sur le plan technique, l'utilisation des techniques moléculaires pour une meilleure précision et signification de la souche présente.
- Une étude du profil des plasmides responsables de la variabilité de plusieurs caractères technologiques indispensables en industrie alimentaire comme l'utilisation de citrate.

Sur le plan technologique, les souches de Leuconostoc isolées peuvent faire l'objet :

- D'une mesure de leur résistance aux différents antibiotiques supposés ou connus dans les industries agro alimentaire.
- D'une meilleure caractérisation des activités enzymatiques des souches bactériennes, car la qualité des produits fermentés passe par une meilleure connaissance des activités métaboliques des bactéries lactiques.
- D'une étude *in vivo* des propriétés probiotiques des souches possédant des bonnes aptitudes *in vitro* (la survie des souches de Leuconostoc dans les conditions extrêmes du tube digestif).
- Une étude des cinétiques de Leuconostoc avec d'autres bactéries lactiques qui forment avec elle une coopération et qui peuvent être utilisés en industrie alimentaire.

Bibliographie :

- **Achemchem F. et Abrini J., 1997.** Production de bactériocines par des bactéries lactiques à partir du jben de chèvre du Nord du Maroc. *Journal of Applied Microbiology*, **70** , 660-669.

- **ADAMS, M. R., and MARTEAU, P. , 1995.** On the safety of lactic acid bacteria from food. *Int J Food Microbiol*.***27***: 263-264.

- **AGUIRRE, M., and COLLINS, M. D. , 1993.** Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J Appl Bacteriol*.***75***: 95-107.

- **ALLEGRINI, J., SIMMEON DE BUOCHBERG, M., BILLOT, A., 1973**. Emulsions d'huiles essentielles, fabrication et application en microbiologie. Travaux de la Société de Pharmacie de Montpellier, 33 : 73-86.

- **AMIOT J.,FOUTIER S., LEBEUF Y.,PAQULN P ET SIMPSON R., L., 2002.** Composition, propriétés physicochimique, valeur nutritive, qualité technologiques d'analyse du lait chapitre I

- **AMMOR S., TAUVERON G., DUFOR E. ET CHEVALIER I., 2006.** Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 1- Screening and characterization of antibacterial compound. *Food Control*. **17** : 454-461.

- **ANDRE ECK, JEAN-CLAUDE GILLIS (COORD.), 2006**.*Le fromage, De la science à l'assurance-qualité*, TEC&DOC, lavoisier, (ISBN 978-2-7430-0891-8), chap. **10** (« Les phénomènes microbiens par C. Choisy, Desmazeaud, Gueguen, Lenoir, Schmidt, Tourneur »)

- **ANNAN-PRAH A., AGYEMAN J. A. , 1997.** Nutrient content and survival of selected pathogenic bacteria in kenkey used as a weaning food in Ghana. Acta Trop. **65**: 33-42.

- **ANONYME2006.** Evolution des effectifs du cheptel de 1990 à 2005. Direction des statistiques Agricoles, Ministère de l'Agriculture, Algérie.

- **ARIAS A., 1985.** Caractérisation biochimique et profil plasmidique de souches de leuconostoc du lait. *Mémoire DEA* Sciences des Aliments, ENSBANA, Université de Dijon.

- **Axelsson, L. ,2004.** Classification and physiology. In: Salsinen, S., Wright, A.V., Ouwehand, (Eds). *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects (3ed edition)*. Marcel Dekker, Inc. New York, USA. vol. 633, 1 - 66.

- **AXELSSON, L., 2008.** Diversity of *Lactobacillus sakei* strains investigated by phenotypic and genotypic methods. *Syst Appl Microbiol*.***31***: 393-403.

- **BABEL F.J., 1977.** Antibiosis by lactic culture bacteria. *J. Dairy Sei., 60, 815-821.*

- **BADIS A., LAOUABDIA-SELLAMI N., GUETARNI D .KIHAL M.et OUZROUT R. 2005.** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales "Arabia et Kabyle". Sciences et technologie 23,30-37.

- **BAREFOOT S.F. ET KLAENHAMMER T.R., 1983.** Detection and activity of lacticin B, a bacteriocin produced by *lactobacillus acidophilus*. *App. Env. Microbiol*. **45** : 1808-1815.

- **BEG O.U., VON BAHR-LINSTROM H., ZAIDI Z.H. et JORNVALL H., 1987.** Characterization of a heterogenous camel milk whey non-casein pro-protein. Fed. European Bioch. Society Letters, **2**, 270–274

- **BEN-AISSA M. (1989).** Le dromadaire en Algérie. Options Méditerranéennes - Série Séminaires 02, 19-28.

- **BENGOUMI M., FAYE B. et TRESSOL J-C. ,1994.** Composition minérale du lait de chamelle du sud marocain. Actes du Colloque : "Dromadaires et chameaux animaux laitiers", 24-26- octobre, Nouakchott, Mauritanie.

- **BENKERROUM N. GHOUATI Y.SANDINE W.E. Tantaoui-Elaraki A. 1993.** Methods to demonstrate the bactericidal activity of bacteriocins. - *Lett. Appl. Microbiol*., **17**(2), 78-81.

- **Bergey's manual of systematic bacteriology (8nd ed.).2009**. Baltimor. 208-1234.

- **BJÖRKROTH, J., AND HOLZAPFEL, W. , 2006.** Genera *Leuconostoc, Oenococcus* and *Weissella*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., and Stackebrandt, E. (Eds). *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community (3rd edition)*. Springer Verlag. New York, USA. pp 267-319.

- **BOUREL G., HENNI S., KRANTAR K. , ORABY M., DIVIES C., GARMYN D., 2001** Métabolisme sucre-citrate chez *Leuconostoc mesenteroides*. Le lait **81**,75-82

- **BOVER-CID, S., HOLZAPFEL, W.H., 1999.** Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology 53, 33-41.

- **BRANEN A.L., Go H.C., GENSKE R.P., 1975.** Purification and properties of antimicrobial substances produced by *Streptococcus diacetilaetis* and *Leuconostoc eitrovorum. J. Food Sei.,* ***40***, 446-450.
- **BROOKER B.E., 1976.** Surface coat transformation and capsule formation by *Leuconostoe mesenteroides* NCDO 523 in the presence of sucrose. *Arch. Mierobiol., lJl, 99-104.*

- **BROOKER B.E., 1977.** Ultrastructural surface changes associated with dextran synthesis by *Leueonostoc mesenteroides. J. Baeteriol.,* **131,** 288-292.

- Brugère H., cours sur Le lait et les produits laitiers, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 2003.

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

- **CHICHE, J., 1999**. L'élevage pastoral, historique, suivi, évaluation. Cours international de pastoralisme, IAMM-IAV Hassan II

- **CHOISY C., DESMAZEAUD M., GUEGUEN M., LENOIR J., SCHMIDT J. L. ET TOURNEUR C., 1997.** Les phénomènes microbiens. *In :* Le fromage (Eck A. et Gillis J.C.). *Tec & Doc, Lavoisier*. Paris. 377-446.

- **CHRISTEl D., 2010** lait de chèvre : vérité et contrevérité Filière Ovine et Caprine n°34 - 4ème trimestre

- **Cibik, R., Lepage, E., et Tailliez, P., 2000.** Molecular diversity of *Leuconostoc mesenteroides* and *Leuconosotoc citreum* from traditional french cheeses as reavealed by RAPD fingerprinting, 16S rDNA sequencing and 16S rDNA fragement amplification. *Journal 9 of Systematic and Applied Microbiology* **23:** 267-278.

- **COGAN T.M., 1975.** Citrate utilization in milk by *Leueonostoe cremoris* and *Streptoeoeeus diacetilactis. J. Dairy Res.,* **42,** 139-146.

- **COGAN T.M., 1980.** Les levains lactiques mésophiles. Une revue. *Lait, 60, 397-425.*

- **COLLINS E.B., SPECKMANR.A., 1974**. Influence of acetaldehyde on growth and acetoin production by *Leueonostoe eitrovorum. J. Dairy Sei.,* **57,** 1428-1431.

- **COLWELL, R. R., 1970.** Polyphasic taxonomy of the genus vibrio: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus,* and related *Vibrio* species. *J Bacteriol.****104***:410-433.

- **DALY C., SANDINE W.E., ELLIKER P.R., 1972.** Interactions of food starter cultures and food-borne pathogens : *Streptoeoeeus diacetylactis* versus food pathogens. *J. Milk Food Teehnol.,* **35**, 349- 357.

- **DE AMBROSINI, V. M., GONZALEZ, S., PERDIGON, G., DE RUIZ HOLGADO, A. P., AND OLIVER, G. ,1996.** Chemical composition of the cell wall of lactic acid bacteria and related species. *Chem Pharm Bull **44***: 2263-2267.

- **DELLAGLIO F., DE ROISSARD H., TORRIANI S., CURK M.C. ET JANSSENS D., 1994.** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. *In* : Bactéries lactiques (De Roissard H. et Luquet F.M.). *Lorica, Uriage*. **1** : 25-116.

- **Delmotte A. ,1958**. L activité lipolytique microbienne décelée par la méthode de *SIERRA* avec référence spéciale au *M. pyogenes*. 309-330.

- **DE MOSS R.D., 1954.** A triphosphopyridine nucleotide-dependent alcohol dehydrogcnase from *Leuconostoc mesenteroides.* 1. *Bacteriol.,* 68, 252-257.

- **DE MOSS R.D., BARD R.C., GUNSALUS I.C., 1951**. The mechanism of the heterolactic fermentation. A new route of ethanol formation. *J. Bacteriol.,* **62**, 499-511.

- **DE VUYST L., AVONTS L., MAKRAS E., 2004.** Probiotics, prebiotics and gut health. In : Remacle C. (Ed.), Functional Foods, Ageing and Degenerative Disease. Taylor & Francis : London, 416-482. DEA présenté à l'ENSAIA, Nancy, France.

- **DE MAN J.c., ROGOSA M., SHARPE M.E., 1960.** A medium for the cultivation of lactobacilli. *1. Appl. Bacteriol.,* **23**, 130-135.

- **DESJEUX,J.F., 1993** Valeur nutritionnelle du lait de chèvre.73 :573-58.

- **DEVOYOD J.J., MULLER M., 1969.** La flore microbienne du fromage de Roquefort. **III.** Les streptocoques lactiques et les leuconostoc. Influence de différents microorganismes de contamination. *Lait,* 49, 369-399.

- **Devoyod, J.J. Françoise Poullain.,1988.** « *Les leuconostocs, Propriétés : leur rôle en technologie laitière* », *Le lait,* vol. 68, n° 3 . 249-280

- **Dias, R. S., Bambirra, E. A., Silva, M. E., and Nicoli, J. R. (1995)** Protective effect of *Saccharomyces boulardii* against the cholera toxin in rats. *Braz J Med Biol Res.**28***:323-325

- **DJEM.K., N'GUESSANK.F., DJENIT.N., DADIET.A. ., 2008.** Biochemical Changes during alcoholic fermentation in the production of 'tchapalo', a traditional sorghum beer. Int. J. Food Eng.**4 :** 44-50.

- **DOBIÁS, J. ,1994.** Cellular fatty acids analysis in the identification of lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol.**24***: 315-319.
- **DORTU C., THONART P. ,2009.**Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **13** 143-154.

- **DEVOYODJ.J., DESMAZEAUD M., 1970.** Les associations microbiennes dans le fromage de Roquefort. 1. Action des entérocoques vis-à-vis des streptocoques lactiques et des leuconostocs. *Lait, **50**, 374-390.*

- **DEVOYOD J.J., MULLER M., 1969.** La flore microbienne du fromage de Roquefort. **III.** Les streptocoques lactiques et les leuconostoc. Influence de différents microorganismes de contamination. *Lait,* 49, 369-399.
.
- **DEVOYODJ.J., LABBE M., AUCLAIR J., 1974**. Concentrated frozen suspensions of leuconostoc for Roquefort cheesemaking. 19th *Int. Dairy Congr.*, New Delhi, Vol. lE, 421.

- **DUWAT, P., SOURICE, S., CESSELIN, B., LAMBERET, G., VIDO, K., GAUDUP., LE LOIR Y., VIOLET F., LOUBIERE P. AND GRUSS A., 2001.** Respiration capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and its positive effects on growth and survival. *J Bacteriol.**183***: 4509-4516.

- **EKUNDAYOJ.A. , 1969**. The production of 'pito', a Nigerian fermented beverage. Int. J. Food Sci. Technol. **4:** 217-225.

- **EL-AMIN F. M. et WILCOX J. 1992** Composition of Majaheim camels. *J. Dairy Sci.*, **75**, 3155-3157

- **EL MARRAKCHI A., TANTAOUI-ELARAKI A., HAMAMA A. & GRINI A. (1988).** La flore microbienne du smen marocain. Flore lipolytique et caséolytique. Le lait. **68**, 333-348.

- **FALAGAS, M. E., BETSI, G. I., and ATHANASIOU, S. , 2006.** Probiotics for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis: a review. *J Antimicrob Chemother.**58***: 266-272.

- **FAYE B. et MULATO O.C. ,1991.** Facteurs de variation des paramètres protéo-énergétiques,enzymatiques et minérales chez le dromadaire de Djibouti. *Rev. Elev. Méd. Vét. des Pays Trop.*, **44**, 325-334.

- **FELIACHI K., 2003.** Rapport national sur les ressources génétiques animales; Algérie. Commission nationale, point focal Algérien pour les ressources génétiques, Octobre, 1-4.
- **Fleming, H. P, Erchells, J.L. etCaslilow R.N. , 1975.** Microbial inhibition on isolate *Pediococcus* from cucumber bune. *Apple. Environ. Microbiol*. **30**, 1040-1042.

- **FoodandAgricultureOrganization**, **2001**. WorldHealthOrganizationHealth and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria [en ligne] Adresse URL

- **GADDOUR A., NAJARI S. & OUNI M. 2007**. Dairy performances of the goat genetic groups in the southern Tunisian. Agricultural Journal, 2 : 248-253.

Rapport-Gratuit.com

- **GALESLOOTTE., 1962.** The bacteriology and biochemistry of starters and ripened cream. 16th *Int. Dairy Congr.,* Copenhagen, *D, 143-161.*

- **GARVIE E.I. ,1984.** Separation of species of the genus Leuconostoc and differentiation of the leuconostocs from other lactic acid bacteria. Methods Microbiol. **16**, 147-178
- **GARVIE E.I., 1967**. The growth factor and amino acid requirements of species of the genus *Leuconostoc* including *Leuconostoc paramesenteroides* (sp. nov) and *Leuconostoc oenos.J. Gen. Microbiol.,* **48,** 439-447.
- **GENSKE R.P., BRANEN A.L., 1973.** Properties of antimicrobial substances with S. *diacetilactis* and *L. citrovorum. Modern Dairy,* 52, (7/8), 12-14.

- **GILAROVÁ, R., VOLDRICH, M., DEMNEROVÁ, K., CEROVSKÝ, M., AND GOLDBERG M., FESSENDEN J.M., RACKER E., 1966.** Phosphoketo1ase. *Method Enzymol.,* **9**, 515- 520.

- **GONZALEZ DE LLANO, D., CUESTA, P., RODRIGUEZ, A., 1998.** Biogenic amine production by wild lactococcal and *Leuconostoc* strains. Letters in Applied Microbiology. **26**, 270-274.

- **GORBAN A.M.S. et IZZELDIN O.M., 1997.** Mineral content of camel milk and colostrum. *J. Dairy Techn.,* **64**, 471-474.

- **GRAPPIN et al. , 1981,** Etude des laits de chèvre : teneur du lait de chèvre en matière grasse, matière azotée et fractions azotées, Lait61, 117-133

- **GU , C.T., WANG,F., LI,C.Y.,LIU,F.,ET HUO,G.C., 2010.** *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *suionicum* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **62 :** 1548-1551

- **GUEGEN, 1997.** Composition minérale moyenne du lait de chèvre.

- **GUESSAS B. ET KIHAL M. , 2004.** Caracterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goat's milk. African Journal of Biotechnology Vol. 3(6) ,339-342

- **GUESSAS B., HADADJI M., SAIDI N. & KIHAL, M. 2005**. Inhibition of *Staphylococcus aureus* growth in milk by lactic acid bacteria. *Dirassat,* **32**: 53-60.

- **GUESSAS B, 2006**. Potentialité métabolique des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre dans le bio control des Staphylococcus aureus. Thèse de Doctorat d'Etat.Université d'Oran Algérie.

- **GUESSAS, B. ADJOUDJI M and KIHAL.,2012**. Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Dhan, a Traditional Butter and Major Technological Traits. Laboraoire de Microbiologie Appliquée, Département de Biologie Faculté Des Sciences,Université D'Es-Senia Oran Bp 1524 El-Menaouer31000 Algeria Sciences Journal 17 4,480-488, ISSN 1818-4952

- **GUIRAUD J.P., 1998.** Microbiologie alimantaire. DUNOD;Paris.282-290

- **GUIRAUD J.P., 2003.** Microbiologie Alimentaire. *Tec* & *Doc, Dunod.* Paris. 90-29

- **HADDJI , M. 2006.** Caractérisations technologiques des bifidobactéries à intérêt thérapeutique. Thése de Doctorat d'Etat. Université d'Oran Algérie.

- Haller, D., Serrant, P., Granato, D., Schiffrin, E. J., and Blum, S. (2002) Activation of human NK cells by *staphylococci* and *lactobacilli* requires cell contact-dependent costimulation by autologous monocytes. *Clin Diagn Lab Immunol*.***9***: 649-657.

- **HALMM., LILLIEA., SORENSENA.K., JAKOBSENM. , 1993**. Microbiological and aromatic characteristics of fermented maize doughs for kenkey production in Ghana. Int. J. Food Microbiol., 19: 135-143.

- **HAMMES, W. P., AND HERTEL, C. ,2006.** The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., and Stackebrandt, E. (Eds). *The prokaryotes, Vol. (4)*. Springer Science and Business Media. New York, USA. pp320-403.

- **HAINES W.c., 1972.** Growth and production of enterotoxin by *Staphylococcus aureus* grown in association with selected lactic acid bacteria. *Diss. Abstr. /nt., B33, 2171-2172*. 275

- **HARDIE, J. M., 1986**. Methods for the isolation and identification of anaerobes. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser*.***13***: 397-410.

- ***HARIR A.,OUIS N., SAHNOUNI F. ET BOUHADI D.,2009****.Mise en œuvre de la fermentation de certains ferments lactiques dans des milieu a base des axtreits de caroube.Rev.Microbiol. Ind. San et Environn .37-55*

- **HARVEY R.J., COLLINS E.B., 1962.** Citrate transport system of *Streptococcus diacetilactis. J. Bacteriol.,***83**, 1005-1009.

- **HARVEY R.J., COLLINS E.B., 1963.** Roles of citrate and acetoin in the metabolism of *Streptococcus diacetilactis. J. Bacteriol.,* **86,** 1301-1307.

- **HARVEY R.J., COLLINS E.B., 1961.** Role of citritase in acetoin formation by *Streptococcus diacetilactis* and *Leuconostoc citrovorum. J. Bacteriol.,* **82**, 954-959.

- **HEGAZI F.Z., ABO-ELNAGA I.G., 1980**. Degradation of organic acids by dairy acid bacteria. *Zentralbl. Bakteriol. II Abt.,* **135**, 212-222.

- **HELIST P. et KORPELA T. ,1998.**Effect of detergents on activity of microbial lipases as measured by the nitro phenyl alkonoate esters method. Enzyme and microbial technology. 23: 113-117.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

- **HEMME, D., AND FOUCAUD-SCHEUNEMANN, C., 2004**. *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *Int Dairy J.**14***: 467-494

- **HOLZAPFEL W.H. , 1997.** Use of starter cultures in fermentation on a household scale. *Food Control* **8**, 241-258.

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

- Holzapfel, W. H., Geisen, R., and Schillinger, U. (1995) Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int J Food Microbiol.**24***: 343-362.

- **HONTEBEYRIEM., GASSER F., 1977.** Deoxyribonucleic acid homologies in the genus *Leuconostoc. /nt. J. Syst. Bacteriol.,* 27, 9-14.

- **HOUNHOUIGAND, J., NOUTM.J.R., NAGOC.M., HOUBENJ.H., ROMBOUTSF.M. , 1993.** Composition and microbiological and physical attributes of mawè, a fermented maize dough from Benin. Int. J. Food Sci. Technol. **28:** 513-517.

- **IN MESCHY F., 2000.** Alimentation de la chèvre. Quoi de neuf ? Chèvre, 238, 33

- **ITO S., KOBAYASHI T., OHTA Y., AKIYAMA Y., 1983.** Inhibition of glucose catabolism by aeration in *Leuconostoc mesenteroides. J. Ferment. Technol.,* **6,** 353-358.
- **JANDA K., 2005.** The lipolytic activity of *Thermomyces lanuginosus* strains isolated from different natural sources. International Bio deterioration & Biodegradation. 55,149 152

- **JARDALI Z. ,1988.** Contribution à l'étude de la composition du lait de dromadaire.

- **JARDALI Z. et RAMET J.P. ,1991**cités par **RAMET ,1993.**

- **JENNESS R., SLOAN R.E., 1969**:.The composition of milk of various species ; a review. Dairy Sci. Abst., 32, 599–612

- **JOFFIN J.N. & LEYRAL, G., 2006**. Microbiologie technique. 4ième Ed CRDP d'acquitaine. Bordeaux. 363.

- **JUFFS H.S., BABEL F.J., 1975**. Inhibition of psychrotrophic bacteria by lactic cultures in milk stored at low temperature. 1. *Dairy Sci.,* 58, 1612-1619.

- **JUILLARD V., SPINNLER H.E., DESMAZEAUD M.J. ET BOQUIEN C.Y., 1987.** Phénomènes de coopération et inhibition entre les bactéries lactiques utilisées en industrie laitière. *Le lait.* **67** : 149- 172

- **KALLIOMAKI, M., SALMINEN, S., ARVILOMMI, H., KERO, P., KOSKINEN, P., AND ISOLAURI, E. (2001)** Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*.***357***: 1076-1079.

- **KANDLER, O., 1983.** Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*.***49***: 209-224.

- **KANDLER, O., AND WEISS, N. ,1986.** Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212AL. In: Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., and Holt, J. G. (Eds).

- **KAYODÉ , A.P.P., HOUNHOUIGAN, J.D., NOUT, M.J.R. , 2007**. Impact of brewing process operations on phytates, phenolic compounds and in vitro of iron and zinc in opaque sorghum beer. Lebensm. Wiss. Technol**. 40,** 834-841.

- ***KEENAN T.W., LINDSAY R.C., 1966.*** *Removal of green flavor from ripened butter cultures, J. Dairy su., 49,1563-1565.*

- **KEMPLER G.M., MCKAY L.L., 1980**. Improved medium for detection of citrate-fermenting *Streptococcus lactis* ssp *diacetylactis. Appl. Environ. Microbiol.,* **39,** 926-927.

- **KEMPLER G.M., MCKAY L.L., 1981.** Biochemistry and genetics of citrate utilization in *Streptococcus lactis* ssp *diacetylactis.* 1. *Dairy sa.,* **64,** 1527-1539.

- **KHAOUA SAÏDA, ELHALOUI NOUR EDDINE & LEFEBVRE GERARD ., 1997 .**Caractérisation, purification et détermination de la structure partielle d'une bactériocine de la souche *Lactococcuus lactis* C16. Actes Inst. Agron. Veto (Maroc), Vol. 17. **1**,15-25 © Actes Éditions, Rabat

- **KHEDID,K.,FAID, M.,MOKHTARI, A., SOULAYMANI,A ET ZINEDINE, A., 2006**.Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Moroco.Microbiol.Res.**10** , 10-16.

- **KIHAL M, PREVOST H., LHOTTE M.E., HUANG D.Q., DIVIÈS C. 1996, - I**nstability of plasmid-encoded citrate permease in *Leuconostoc. J. Appl. Microbiol*., 22, 219-223

- **KLEIN C., KALETTA, C., AND ENTIAN, K. D. , 1993.** Biosynthesis of the lantibiotic subtilin is regulated by a histidine kinase/response regulator system. *Appl Environ Microbiol*.***59***: 296-303.

- **KOBAYASCHI M., MATSUDA K., 1974**. The dextransucrase isoenzymes of *Leuconostoc mesenteroides. Biochim. Biophys. Acta,* ***370,*** *441-449.*

- **KOBAYASCHIM., MATSUDA K., 1986.** Electrophoretic analysis of the multiple forms of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides.* 1. *Biochem.,* ***100,*** *615-621.*

- **KOZAK W., BARDOWSKI J., DOBRANSKI W.T., 1978.** Lactostrepcins-acid bacteriocins produced by lactic streptococci. *J. Dairy Res.,* **45**, 247-257.

- **LARPENT J.P., 1997.** Microbiologie alimentaire. *Tec & doc, Lavoisier*. Paris. 10-72.

- **LARPENT J. P. ET LAIRPENT M.G., 1990**. Memento technique de microbiolgie. Second Ed Technique et Documentaire Lavoisier. 417

- **LAWFORD G.R., KUGERMAN A., WILLIAMS T, 1979.** Dextran biosynthesis and dextransucrase production by continuous culture of *Leuconostoc mesenteroides. Biotechnol. Bioeng.,* **21**, 1121-1131.

- **LAWRENCER .C., THOMAS T.D., TERZAGHI B.E., 1976.** Reviews of the progress of Dairy Science : cheese starters. 1. *Dairy Res.,* **43**, 141-193.

- **LELLIOTT R.A ET STEAD D.E. 1987.** Methods for diagnosis of bacterial diseases of plants. Blackwell Scientific Publications Volume 2.Oxford (GB).

- **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, 354 – 367.

- **LEE M. T., CHEN F.Y., and HUANG, H.W., 2004.**Energetics of pore formation induced by membrane active peptides. Biochemistry. **43**,3590-3599.

- **LEES G.J., JAGO G.R., 1976.** Acetaldehyde: an intermediate in the formation of ethanol from glucose by lactic acid bacteria. *J. Dairy Res.,* **43,** 63-73.

- **LEI V., AMOA-AWUAW.K.A., BRIMERL. , 1999**. Degradation of cyanogenic glycosides by Lactobacillus plantarum strains from spontaneous cassava fermentation and other microorganisms. Int. J. Food Microbiol. **53:** 169-184.

- **LEROI, F., PIDOUX, M. , 1993.** Characterization of interactions between Lactobacillus hilgardii and Saccharomyces florentis isolated from sugary kefir grains. J. Appl. Bacteriol. **74 :** 54-60.

- **LEVEAU J.Y. & BOUIX M. ‘’LA FLORE LACTIQUE’1980**, dans ‘’technique d’analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires’’. Bourgeois C M, Leveau J Y, A.p r i a. Paris. 3-106.

- **LINDSAY R.C., DAY E.A., SANDINE W.E., 1965.** Green flavor dcfect in lactic starter cultures. *J. Dairy Sei.,* **48,** 863-869.

- **LUCEY C.A., CONDON S., 1986.** Active role of oxygen and NADH oxydase in growth and cnergy metabolism of *l.euconostoc. J. Gen. Microbiol.,* ***132,*** *1789-1796.*

- **MARCHAL N., BOURDON J.L.ET RICHAD C.L., 1991.**Les milieux de culture pour l’isolement et l’identification biochimique des bactéries. Ed. Doin. 65-49

- **MÄKELÄ, P., SCHILLINGER, U., KORKEALA, H., AND HOLZAPFEL, W. H., 1992.** Classification of ropy slime-producing lactic acid bacteria based on DNA-DNA

homology, and identification of *Lactobacillus sake* and *Leuconostoc amelibiosum* as dominant spoilage organisms in meat products. *International Journal of Food Microbiology*.***16***: 167-172

- **MATHOT A. G. KIHAL M. PREVOST H. ET DIVIES C. 1994.** Selective enumeration of *Leuconostoc* on Vancomycin agar medium. International Dairy Journal,**4**, 459-169.

- **MATIIER D.W., BABEL F.J., 1959. I**nhibition of certain types of bacterial spoilage in creamed cottage cheese by the use of a creaming mixture prepared with *Streptococcus citrovorus. 1. Dairy Sei.,* **42,** 1917-1926.

- **MAYEUX J., SANDINE W., ELLIKER P., 1962**. A selective medium for detecting *Leuconostoc* organisms in mixed strain starter cultures. *J. Dairy Sci.,* 45, 655-656

- Mayo B., Aleksandrzak - piekarczyk T., Fernández M., Kowalczyk M., Alvarez-Martín P. et Bardowski J., 2010. Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria. Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications Blackwell Publishing (3-34.

- **Mayr-Harting A, Hedges AJ, Berkeley, RCW. ,1972.** Methods for studying bacteriocins. In: Norris JR, Ribbons, DW, editors. Methods in microbiology. Vol, 7A. New York: Academic Press. 315-422.

- **MC DONALD L.C., FLEMMING H.P. & HANSSEN H.M. ,1990.** Acid tolerance of Leuconostoc mesenteroides and Lactobacillus plantarum. Appl. Environ. Microbiol. **56**, 2120-2124

- **MCLEOD A., NYQUIST O. L., SNIPEN L., NATERSTAD, K., AND MEHAIA M. A. , 1995.** The fat globule size distribution in camel, goat, ewe and cow milk. *Milchwisenschaft,* **50**, 260-263

- **MEHAIA M. A., 1987.** Studies on camel milk casein micelles ; treatment with soluble and immobilized chymosin. *Milchwissenshaft,* **42** , 706-708.

- **MELLERICK D., COGAN T M., 1981**. Induction of sorne enzymes of citrate metabolism in *LeIlCOIlOStoc lactis* and other heterofermentative lactic acid bacteria. 1. *Dairy Res.,* **48,** 497-502.

- **MENSAH P., TOMKINS A.M., DRASAR B.S., HARRISON T.J. , 1991**. Antimicrobial effect of fermented Ghanaian maize dough. J. Appl. Bacteriol. **70**: 203-210.

- **MESSENS W., DEVUYST L. , 2002.** Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdoughs-a review. Int. J. Food Microbiol. **72**: 31-43.

- **MINOR T. E., MARTH E.H., 1970.** Growth of *Staphylococcus aureus* in acidified pasteurized milk. *J. Milk Food Technol.,* **33,** 516-520.

- **MORENO-ARRIBAS, M.V., POLO, M.C., JORGANES, F., MUNOZ, R., 2003**. Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. International Journal of Food Microbiology **84**, 117-123.

- **NOUTM.J.R. , 1991.** Ecology of accelerated natural lactic fermentation of sorghum-based infant food formulas. Int. J. Food Microbiol. **12:** 217-224.

- **OBERMAN H., LIBUDZISZ Z., PIATKIEWICZ A., 1986.** Physiological activity of deep-frozen concentrates of *Leuconostoc* strains. *Nahrung, **30**, 147-154.*

- **OGIER, J.C., SERROR, P., 2008.** Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. International Journal of Food Microbiology **126,** 291-301

- **ORBERG P.R., SANDINE W.E., 1984.** Common occurence of p1asmid DNA and vancomycine resistance in *Leuconostoc* spp. *Appl. Environ. Microbiol.,* **48**, 1129-1133.

- **O'SULLIVAN T., DALY C.; 1982**. Plasmid in *Leuconostoc* species. J. *Food Sei. Technol.,* 6, 206. OrrOGALLI G., GALLI A., RONDININI G., VOLONTERIOG., 1975. Microbiology of Pannerone cheese. *Ind. Latte,* **11**, 7-17.

- **OYEWOLEO.B. , 2000.** Characteristics and significance of yeasts involvement in cassava fermentation for 'fufu' production. Int. J. Food Microbiol. **65**,213-218.

- **PAPAMANOLI E., TZANETAKIS N., LITOPOULOS E., KOTZEKIDOU P. 2003.** Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dryfermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat science*.**65**,859-867.

- **PARK H.S., MARTH E.H., 1972**. Behavior of *Salmonella typhimurium* in skim milk during fermentation by lactic acid bacteria. 1. *Milk Food Technol.,* **35**, 482-487.

- **PEDERSON C.S., ALBURY M.N., 1955.** Variation among the heterofermentative lactic acid bacteria. J. *Bacteriol., **70**, 702-708.*

- **PELLERIN, P., 2001.** Mise au point Intérêt nutritionnel de lait de chèvre connaissances actuelles et perspectives. Ann pharm Fr.59 :51-62

- **PINHEIRO A.J.R., LISKA B.J., PARMELEEC.E., 1968.** Properties of substances inhibitory to *Pseudomanas fragi* produced by *Streptococcus citrovorus* and *Streptococcus diacetilactis.* J. *Dairy Sei.,* **51**, 183-187.

- **PIROTTA, M., GUNN, J., CHONDROS, P., GROVER, S., O'MALLEY, P., HURLEY, S., AND GARLAND, S., 2004.** Effect of *Lactobacillus* in preventing post-antibiotic vulvovaginal candidiasis: a randomised controlled trial. *BMJ.**329***: 548.

- **PLAHARW.A., LEUNG H.K. , 1982.** Effect of moisture content on the development of carboxylic acids in traditional maize dough fermentation. J. Sci. Food Agric. 33: 555-558.

- **PLOU F. G., FERRER M., NUERO O. M., CALVO M. V., ALCALDE M., REYES F. & BALLESTEROS A. ,1998.** Analysis of Tween 80 as an esterase/lipase substrate for lipolytic activity assay. Biotechnology techniques. **12**, 183-186.

- **POT, B. ,2008.** The taxonomy of lactic acid bacteria. In: Corrieu, G., and Luquet, F. M. (Eds). *Bactéries lactiques. De la génétique aux ferments*. Lavoisier. Paris, France pp 1-152.

- **PRESCOTT, L., HARLEY, J., AND KLEIN, D. , 2003.** Le métabolisme: la libération et la conservation de l'énergie. In: Boeck, d., and Larcier (Eds). *Microbiologie*. Bruxelles, Belgium. Pp 172-203.

- **QUIBERONI, A., REZAIKI, L., EL KAROUI, M., BISWAS, I., TAILLIEZ, P., and GRUSS, A., 2001.** Distinctive features of homologous recombination in an 'old' microorganism, *Lactococcus lactis*. *Res Microbiol*.***152***: 131-139.

- **ROBYT J.F., WALSETH T.F., 1978.** The mechanism of acceptor reactions of *Leuconostoc mesenteroides* B-512 F dextransucrase. *Carbohyd. Res.,* 61, 433-445.

- **RODOLPHE B., YOON SS, FREDERICK B., HENRY P.F., TODD R.K., 2002.** Identification and Characterization of *Leuconostoc fallax* Strains isolated from an Industrial Sauerkraut Fermentation. Appl. Environ. Microbiol. **68**,2877-2884

- **RODRIGUES, U. M., AGUIRRE, M., FACKLAM, R. R., AND COLLINS, M. D., 1991.** Specific and intraspecific molecular typing of lactococci based on polymorphism of DNA encoding rRNA. *J Appl Bacteriol*.***71***: 509-516.

- **Ross G.R., 1981.** The inhibition of growth of spoilage mieroorganisms in milk by *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis, Leuconostoc cremoris* and *L. dextranicum. Aust. J. Dairy Technol.,* **36,** 147-152.

- **RUIZ, F. O., GERBALDO, G., ASURMENDI, P., PASCUAL, L. M., GIORDANO, W., AND BARBERIS, I. L., 2009.** Antimicrobial activity, inhibition of urogenital pathogens, and synergistic interactions between *Lactobacillus* strains. *Curr Microbiol*.***59***: 497-501.

- **SAMELIS J., MAUROGENAKIS F, METAXOPOULOS J., 1994**. Charcterisation of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami. Int. J. Food Microbiol. **23**, 179-96

- **SAIRAI K., GUERRERO I., HUERTA S., SAUCEDO G., CASTILLO A., GONZALEA R., GEORGE M.,2001.** Effect of initial glucose concentration and inoculation level of lactic acid bacteria in shrimp waste ensilation Hall Enzyme and Microbial Technology 446-452.

- **SIERRA G., 1957.** A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. Antonie van Lecuwenhoek Ned. Tijdschr. Hyg. **23**,15-22.

- **SANCHEZ J.I., MARTINEZ B. & RODRIGUEZ A. ,2005.** Rational selection of Leuconostocs strains for mixed starters based on the physiological biodiversity found in raw milk fermentations. Int. J. Food Microbiol. **105**, 377-387
- **SANDINE W.E., ELLIKER P.R., HAYS H., 1962.** Cultural studies on *Streptococcus diacetilactis* and other members of the lactic streptococcus group. *Cano J. Microbiol.,* **8:** 161-174.

- **SCHWARTZR.D., BODIE E.A., 1984**. Production of viscous dextran-containing whey-sucrose broths by *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 14935. *Appl. Environ. Microbiol.,* **48**, 678-679.

- **SHKOLNIK A., MALTZ E. et GORDIN S.,1980.** Desert and milk production. Journal of Dairy Science,63:1749-754.

- **SIBOUKEUR O .K., 2007.** Etude du lait camelin collecté localement : caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques ; aptitudes à la coagulation.thèse de doctorat en Sciences Agronomiques université INA ELHarrach-Alger

- **SMITH E.E., 1970.** Biosynthetie relation between the soluble and insoluble dextrans produced by *Leuconostoc mesenteroides* NRLL B. 1299. *FEBS Lett.,* ***12,*** *33-37.*

- **SORRELLS K.M., SPECK M.L., 1970.** Inhibition of *Salmonella gallinarum* by culture filtrates of *euconostoc eitrovorum.* 1. *Dairy Sci.,* 53, 239-241.

- **SOZZI *T*., POULIN J.M., MARET R., POUSAZ R., 1978a**. Isolation of a bacteriophage of *Leuconostoc mesenteroides* from dairy products. *J. Appl. Bacteriol.,* **44**, 159-161.

- **SOZZI T, POULIN J.M., MARET R., 1978b**. Etude d'un bactériophage de *Leuconostoc mesenteroides* isolé de produits laitiers. *Schweiz. Milchw. Forschung.,* **7,** 33-40

- **SOZZI *T*., GNAEGI F., D'AMICO N., HOSE H., 1982.** Difficultés de fermentation malolactique du vin dues à des bactériophages de *Leuconostoc oenos. Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic***., 14**, 17- 23.

- **SPECKMAN KA., COLLINS E.B., 1968.** Diacetyl biosynthesis in *Streptococcusdiacetilactis* and *Leuconostoc eitrovorum. J. Bacteriol.,* **95,** 174-180.

- **STADHOUDERS J., 1974**. Dairy starter cultures. *Milchwissenschaft,* **29**, 329-337.

- **STILES, M. E., AND HOLZAPFEL, W. H. ,1997.** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol.**36***: 1-29.

- **SUTHERLAND1.W., 1982.** Biosynthesis of microbial exopolysaecharides. *Adv. Microb. Physiol., 23,* 79-142.

- **SWARTLING PER F., 1951.** Biochemical and serological properties of sorne citric acid fermenting streptococci from milk and dairy products. *J. Dairy Res., **18,** 256-267.*

- **TAGG J.R., MCGIVEN A.R., 1971.** Assay System for Bacteriocins. Appl. Environ. Microbiol. 21:943.

- **THOMAS T.D.1973**.Agrar medium for differentiation of Streptococcus cremoris from the other bactria.N.Z.J. Dairy. Sci.Technol., **8**,70-71

- **TOU E.H., GUYOT J.P., MOUQUET-RIVIER C., ROCHETTE I., COUNIL E., TRAORE A.S., TRECHE S. , 2006**. Study through surveys and fermentation kinetics of the traditional processing of pearl millet (Pennisetum glaucum) into ben-saalga, a fermented gruel from Burkina Faso. Int. J. Food Microbiol. **106:** 52-60.

- **VAN DEN BERG, J.C., SMITS A., POT, B., LEDEBOER, A.M., KERESTERS, K., VERBAKEL, J.M.A. AND VERRIPS, C.T. (1993).** Isolation, screening and identification of lactic acid bacteria from traditional food, fermentation processes and culture collection. *Food Biotechnol*ogy, 7, 183-205.

- **VANDAMME, P., POT, B., GILLIS, M., DE VOS, P., KERSTERS, K., AND SWINGS J. , 1996.** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev.**60***: 407-438.

- **VEDAMUTHU E. R. 1994.** The dairy Leconostoc: Use in dairy products. Journal of Dairy Science,77, 2725-2737.

- **VINOD KUMAR J., SOMESH S. ET NEERJA S., (2006).** Production, purification, stability and efficacity of bacteriocin from isolated of Natural Lactic acid fermentation of vegetables. *Food technology and Biotechnology*, 44 (3): 435- 439.

- **WEISS, N., BUSSE, M., AND KANDLER, O. , 1968.** The origin of fermentation byproducts in the lactic acid fermentation of *Lactobacillus acidophilus*. *Arch Mikrobiol.**62***: 85-93.

- **WOESE, C. R., KANDLER, O., AND WHEELIS, M. L., 1990.** Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl AcadSci U S A.**87***: 4576-4579.

- **YAGIL R. and ETZION Z., 1980.**Effect of drought conditions on the quality of camel milk. *J. Dairy. Res.*, **47**, 159-166.

- **ZAUNMÜLLER, T., EICHERT, M., RICHTER, H., AND UNDEN, G. ,2006.** Variations in the energy metabolism of biotechnologically relevant heterofermentative lactic acid bacteria during growth on sugars and organic acids. *Appl Microbiol Biotechnol.**72***: 421-429.

Rapport-Gratuit.com

Annexe :

Milieux de culture :

- **Milieu MRS (Man Rogosa et Sharpe, 1960)**

Extrait de levure 5 g
Extrait de viande 10 g
Polypeptone 10 g
Citrate de sodium 2 g
Acétate de sodium 5 g
Glucose 20 g
KH_2PO_4 2 g
$MgSO_4$ 0,25g
$MnSO_4$ 0,05 g
Agar-Agar 15 g
Eau distillée 1000 ml
pH 6.2
Autoclavage 120°C/ 20 minutes

- **Milieu MSE (Mayeux, Sandine et Elliker, 1962)**

Tryptone 20 g
Gélatine 2.5 g
Extrait de levure 5 g
Saccharose 100 g
Glucose 5 g
Citrate de sodium 1 g
Azide de sodium 0.075 g
Agar-Agar 15 g
Eau distillée 1000 ml
pH 6,8
Autoclavage 120°C/ 20 minutes

- **Milieu KMK (Kempler et Mc Kay, 1980)**

Extrait de levure 3 g
Biopolytone 2,5g
Glucose 5 g
Agar 15 g
Eau distillée 1000 ml
pH 6.6
Le milieu est réparti à raison de 100 ml par flacon, puis autoclavé 15 minutes à 121°C.
Au moment de l'emploi on ajoute :
1 ml d'une solution aqueuse de ferricyanide de potassium 10 % (p/v)
1 ml d'une solution aqueuse à 2.5 % (p/v) de citrate ferrique et citrate de sodium (p/p)
Ces solutions sont stérilisées par filtration sur filtre millipore 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
Peptone 10 g
Acide ascorbique 0,5 g

Lactose 2 g
L-arginine 4 g
Pourpre de Bromocrésol 0,05 g
Agar-Agar 15 g
Eau distillée 1000 ml
pH 6,8
Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

- **Milieu MRS BCP**

MRS (milieu liquide) moins l'extrait de viande et sans sucre 1000 ml
Bromocrésol pourpre 0,025 mg
pH 7.0
Autoclavage 120°C/ 20 minutes

- **Milieu Mueller-Hinton (Mueller et Hinton, 1941)**

Infusion de viande de boeuf 3000 cm^3
Peptone de caséine 17,5 g
Amidon de mais 1,5 g
Agar-Agar 17 g
pH 7.4
Autoclavage 120°C/ 20 minutes

- **Gelose Nutritive**

Extrait de viande 1 g
Extrait de levure 2 g
Peptone 5 g
Chlorure de sodium 5 g
Agar-Agar 15 g
Eau distillée 1000 ml
pH 7,4
Autoclavage 120 °C pendant 20 minutes

- **Bouillon Nutritif**

Extrait de viande 1 g
Extrait de levure 2 g
Peptone 5 g
Chlorure de sodium 5 g
Eau distillée 1000 ml
pH 7,4
Autoclavage 120 °C pendant 20 minutes

- **Lait Ecrémé**

Lait en poudre 110 g
Eau distillée 1000 ml
Extrait de levure 3g
Autoclavage 110°C pendant 10 minutes

- **Eau Physiologique**

Chlorure de sodium 8,5 g
Peptone 0,5 g
Eau distillée 1000 ml
pH 7,0
Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.
Tampon phosphate de sodium
Solution (a) : 27.8g NaH_2PO_4 dans 100ml d'eau distillée.
Solution (b) : 53.65g Na_2HPO_4 dans 100ml d'eau distillée.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Tampon 0.1 M : 39ml solution (a) + 61 ml solution (b).
Stérilisation à 110◦C pendant 20mn.

- **Agar au Tween 80**

-peptone 10g
-NaCl 5g
-$CaCl_2$*$2H_2$ 0,1 g
-Agar-agar 20g
-Eau distillée 1000ml
-autoclavage 120°C pendant 20 minutes.
-2,5ml de tween 80 est stérilisé séparément puis ajouté au milieu, le pH est ajusté à 6.

- **Clark et Lubs**

Peptone trypsique de viande 6g
Glucose 5g
K_2HPO_4 5g
Eau distillée 1000ml
pH = 7
Stérilisation a l'autoclave :120°C pendant 15minutes.
<u>La réaction de Voges Proskauer (VP) :</u>
Ajouter 10gouttes de VP1 et le meme volume de VP2 ;
Incliner le tube pour permettre une bonne oxygénation.
Attendre quelques min à 1 heure.
Réactif VP1 : alpha naphtol(6g)+100ml alcool éthylique à 60%(conservé en flacon opaque au réfrigérateur).
Réactif VP2 : Soude concentrée (ou de potasse).

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

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

- **Solution Tamponnée 0.2M :**

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

- **Gélose Chapman :**

Peptone 10,0 g
Extrait de viande de bœuf 1,0 g
Chlorure de sodium 75,0 g
Mannitol 10,0 g
Rouge de phénol 0,025 g
Agar-Agar 15,0 g
Eau distillée 1000 ml
pH = 7,4
Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

Résumé

Les bactéries lactiques ont acquis une grande importance par leur présence dans l'industrie agro-alimentaire et ce depuis longtemps. Elles assurent des caractéristiques particulières telles que l'arôme, la texture et une bonne sécurité alimentaire grâce aux acides organiques produits qui abaissent le pH dans le milieu.

La synthèse de bactériocines permet aussi le renforcement de la conservation des produits alimentaires contenant les bactéries lactiques.

Le genre *Leuconostoc* était ciblé dans notre isolement à partir de lait cru de chamelle et de chèvre.

Après une purification, les souches ont subi des tests biochimiques et physiologiques différents qui ont abouti a l'identification de deux sous espèces :*Ln. mesenteroides* subsp *dextranicum* et *Ln. mesenteroides* subsp *mesenteroides, tandis que* les résultats de l'évaluation des aptitudes technologiques indiquent que l'ensemble des souches ne présentent pas un bon pouvoir lipolytique ni protéolytique, mais l'étude des interactions entre les bactéries lactiques(*Ln. mesenteroides* et *Lb. plantarum*) a révélé une interaction positive qui se caractérise par La symbiose entre les deux qui a permis l'idée d'utiliser les deux espèces ensemble dans l'industrie alimentaire. Alors que l'activité antibactérienne qui a été réalisé à l'encontre de 4 souches pathogènes ou altérantes : (*Listeria inocoua* ATCC 33090 et *Listeria ivanovii* ATCC19119, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922) nous a permis de sélectionner parmi 15 isolats 6 candidats ayant un potentiel antagoniste envers les bactéries pathogènes après une élimination de l'effet de l'acide lactique, de peroxyde et la révélation de la nature protéique de la substance antibactérienne (bactériocine). A la présence des isolats les plus performants (M9 et V1) on a réalisée un suivie cinétique d'acidification et de la croissance en culture pure et mixte dans le milieu lait. L'étude de ces caractéristiques biotechnologiques ont conduit à la possibilité d'exploiter les potentialités de ce genre pour développer un levain lactique local capable de lutter contre les germes indésirables.

Mots clés :

Listeria Ivanovii; Staphylococcus Aureus; Escherichia Coli; Leuconostoc Mesenteroides; Lait De Chamelle; Lait De Chèvre; Effet Antimicrobien; Caractéristiques Biotechnologiques; Bactériocines; Acide Lactique.