

Table des matières

Résumé	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	

Synthèse bibliographique

<i>I. Le lait</i>	1
1. Le lait de chèvre	1
1.1. Les races caprins en Algérie	1
2. Le lait de chamelle	3
2.1 Les races dromadaires Algérienne	3
3. Caractérisation du lait de chèvre et de chamelle	6
3.1. Caractères organoleptiques et physico chimique du lait de chamelle et de chèvre	6
3.2. Caractères chimiques du lait de chamelle et de chèvre	6
3.3. Caractères microbiologiques du lait de chamelle et de chèvre	8
<i>II. Les bactéries lactiques</i>	9
1. Présentation des bactéries lactiques	9
2. Ecologie et classification des bactéries lactiques	10
3. Caractérisation des principaux genres des bactéries lactiques	12
3.1. Genre <i>Leuconostoc</i>	12
3.2. Genre <i>Weissella</i>	12
3.3. Genre <i>Lactobacillus</i>	13
<i>III. Application des bactéries lactiques</i>	15
1. Application dans secteur agroalimentaire	15
1.1. Les ferments lactiques.....	16
1.1.1. Production des ferments lactiques	16
1.1.2. Type des ferments lactiques	17
1.1.3. Critères de sélection des ferments lactiques	19
1.2. Bactéries lactiques comme probiotiques	25
1.2.1. Critères de sélection des microorganismes probiotiques	27
1.2.2. Mécanismes d'action des microorganismes probiotiques	28
1.3. Bio-conservateur.....	30

1.3.1. Bactériocines	30
1.3.2. Classification des bactériocines	30
1.3.3. Biosynthèse et immunité des bactériocines	33
1.3.4. Mécanisme de destruction des bactériocines	35
2. Application dans secteur médical	40
2. 1. Pouvoir antioxydant	40
2.1.1. Stress oxydant et maladies humaines	40
2.1.2. Les radicaux libres	41
2.1.3. Mécanisme d'action des antioxydants	43
2.1.4. Les exemples des bactéries lactiques antioxydants	44
2.2. Bactéries lactiques comme anti-biofilm	46
2.2.1. biofilm	46
2.2.1.1. Localisation de biofilm	46
2.2.1.2. Processus de formation du biofilm	49
2.2.2. Les approche anti-biofilm	51

Matériel et méthodes

1. Échantillonnage	54
2. Isolement et purification des bactéries lactiques	55
3. Conservation des isolats	55
4. Identification phénotypique et génotypique des isolats	55
4. 1. Identification phénotypique	55
4. 2. Identification génotypique	58
4. 2.1. Identification par séquençage du gène 16S ARNr	58
4. 2. 2. Typage par RAPD.....	60
5. Fonctionnalités technologiques.....	60
5. 1. Aertivité antimicrobienne	60
5. 2. Activité acidifiante.....	65
5. 3. Pouvoir protéolytique.....	65
5. 4. Pouvoir lipolytique.....	65
5. 5. Pouvoir texturant.....	66
5. 6. Pouvoir aromatisant.....	66
6. Critères de performance.....	67
6. 1. Activité hémolytique.....	67

6. 2. Résistance aux antibiotiques.....	67
7. Profil probiotiques.....	68
7. 1. Tolerance à l'acidité.....	68
7. 2. Résistance aux sels biliaires.....	68
7. 3. Hydrolyse du sel biliaire.....	68
7. 4. Résistance à la pepsine.....	68
7. 5. Test d'hydrophobicité.....	69
7. 6. Auto-agrégation.....	69
8. Evaluation de l'activité antioxydante par DPPH.....	70
9. Activité anti-formation du biofim.....	70

Résultats et discussion

1. Identification phénotypique et génotypique des isolats.....	71
2. Fonctionnalités technologiques.....	80
2. 1. Activité antimicrobienne	80
2. 2. Activité acidifiante.....	93
2. 3. Pouvoir protéolytique.....	96
2. 4. Pouvoir lipolytique.....	96
2. 5. Pouvoir texturant.....	97
2. 6. Pouvoir aromatisant.....	98
3. Critères de performance.....	100
3. 1. Activité hémolytique.....	100
3. 2. Résistance aux antibiotiques.....	100
4. Profil probiotiques.....	103
4. 1. Tolerance à l'acidité.....	103
4. 2. Résistance Hydrolyse aux sels biliaires.....	104
4. 3. Résistance à la pepsine.....	105
4. 4. Test d'hydrophobicité.....	106
4. 5. Auto-agrégation.....	107
5. Evaluation de l'activité antioxydante par DPPH.....	108
6. Activité anti-formation du biofim.....	109
Conclusion	110
References bibliographiques	112
Annexe	

تلخيص

النمط المظهري و الوراثي لواحد وثلاثون سلالة التي تم عزلها من ست عينات من حليب الإبل وحليب الماعز سمح لنا بتحديد سلالات كالأتي % 12.90 *Weissella cibaria* و % 22.58 *Leuconostoc mesenteroides* و % 3.23 *Weissella confusa* و % 22.58 *Lactobacillus paracasei* و % 35.48 *Lactobacillus plantarum* و % 3.23 *Lactobacillus casei*. أظهرت هذه السلالات نشاطا مضادا للميكروبات مثير للاهتمام ضد السلالات الممرضة التي تم اختبارها. وقد أتاح تحديد طبيعة المواد المضادة للميكروبات اختبار 20 سلالة تنتج مواد ذات طبيعة بروتينية (البكتريوسين المفترض). من بين هذه السلالات ، اخترنا انجع 11 سلالة لدراسة الخصائص الوظيفية والتكنولوجية .

وفقا لمعايير الأداء التي تم الحصول عليها، سمحت لنا بالكشف عن نشاط قوي للحموضة لكل من

Leuconostoc mesenteroides (V1) و *Lactobacillus plantarum* (AM15 ، AM17 و AM22)

و *Lactobacillus paracasei* (AM6 و AM13) ونشاط بروتيني قوي لسلالات التالية

Weissella cibaria (AM10 و AM12) و *Lactobacillus plantarum* (AM15 و AM17)

Leuconostoc mesenteroides (V3 و N3). كما لوحظ عدم وجود نشاط لتحلل الدهون وانحلال الدم مع حساسية لبعض المضادات الحيوية. كما أظهرت دراسة البروبيوتيك أن السلالات ذات طبيعة غير محبة للماء وتتميز بظاهرة التجمع الذاتي و الذي يتراوح بين (% 49،19-85،49) و (% 31-76،36) كما لوحظ قدرتها على التعايش في الحواجز البيولوجية المتنوعة مثل الأحماض (درجة الحموضة 3 و 4) والأملاح الصفراوية (0.5 % ، 1 % و 2 %) و البييسين 3مغ/مل في درجة الحموضة 3. كشف نشاط مضاد التأكسد لسلالات المعزولة إمكانية تثبيط بين (32.91-69.94 %). كما أظهرت دراسة منع تشكل البيوفيلم أنه من الممكن تثبيط تشكل البيوفيلم (% 42،02-76،28) *Listeria ivanovii* بواسطة

، (% 62،7-80،32) *Pseudomonas fluorescens* و (% 44 ،6-65،9) *E.coli* (% 19،08 74،2) *klebsiella sp* ،

يمكن اعتبار البكتيريا اللبنية المختارة مرشحة لتطبيق في الأغذية الوظيفية (البروبيوتيك) وبشكل رئيسي في الوقاية والطرق العلاجية

الكلمات المفاتيحية:

البكتيريا اللبنية، المواد المضادة للميكروبات ، البروبيوتيك ، مضادات الأكسدة ، البيوفيلم ، علاجية

Abstract

The phenotypic and genotypic characterization of 31 strains isolated from six samples of camel milk and goat's milk allowed the identification of strains as 22.58 % of *Leuconostoc mesenteroides*, 12.90 % of *Weissella cibaria*, 3.23 % of *Weissella confusa*, 35.48 % of *Lactobacillus plantarum*, 3.23 % of *Lactobacillus casei* and 22.58 % of *Lactobacillus paracasei*. In order to study the performance criteria, strains have shown an interesting antimicrobial activity against the tested indicator strains. In addition, the determination of the nature of the antimicrobial compound has led to the selection of 20 strains producing proteolytic compounds (putative bacteriocins). Among these strains, 11 strains were selected for functional and technological properties. Results obtained reveal a strong acidifiable activity of the strains *Leuconostoc mesenteroides* (V1) at 71°C at pH 4.5, *Lactobacillus plantarum* (AM15, AM17 and AM22) at 73°C at pH 4.5, 63°C at pH 5, 58°C at pH 5.2 respectively and *Lactobacillus paracasei* (AM6 and AM13) at 66°C at pH 4.8 and 78°C at pH 4.2 respectively after 48 hours of incubation, a strong proteolytic activity for strains *Lactobacillus plantarum* (AM15 and AM17), *Lactobacillus paracasei* (AM6 and AM13), *Weissella cibaria* (AM10 and AM12) and *Leuconostoc mesenteroides* (V3 and N3) have been noticed. An absence of lipolytic activity and hemolytic activity with a high sensitivity for antibiotics such as chloramphenicol, clindamycin, doxycycline and ampicillin were also observed. The study of probiotic profiles showed that strains were hydrophobic and had a phenomenon of auto-aggregation varying between (49.19-85.49 %) and (31.76-36 %) respectively. Furthermore, strains showed a capacity to survive in diverse biological barriers such as acids (pH 3 and 4), biliary salts (0.5 %, 1 % and 2 %) and pepsin 3mg/ml in pH 3. The antioxidant activity of the strains by radical DPPH revealed an inhibition of DPPH between (32.91-69.94 %). The antibiofilm potential of the supernatant of strains showed that it was possible to inhibit biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* (62.7-80.32 %), *Listeria ivanovii* (42.02-76.28 %), *E. coli* (44.6-65.9 %) and *Klebsiella sp* (19.08-74.2 %). The selected lactic bacteria could be considered as conditional candidates for a later application in functional food (probiotics) and mainly in the prevention and therapeutic approaches.

Keywords:

Lactic acid bacteria, Antimicrobial compound, Probiotic, Antioxidant, Biofilm, Therapeutic

Résumé

La caractérisation phénotypique et génotypique des 31 souches isolées à partir de six échantillons de lait cru de chamelle et de chèvre a permis d'identifier des souches comme 22.58 % de *Leuconostoc mesenteroides*, 12.90 % de *Weissella cibaria*, 3.23 % de *Weissella confusa*, 35.48 % de *Lactobacillus plantarum*, 3.23 % de *Lactobacillus casei* et 22.58 % de *Lactobacillus paracasei*. Dans le but de sélection les critères de performance les souches isolées ont montré une activité antimicrobienne intéressante contre les souches indicatrices testées. En plus la détermination de nature de substances antimicrobiennes a permis de sélectionner 20 souches produisent des substances de nature protéique (Bactériocine putative). Parmi ces souches, on a sélectionné 11 souches les plus performantes pour l'étude des propriétés fonctionnelles et technologiques. Selon les critères de performance résultats obtenu révéler une forte activité acidifiante des souches *Leuconostoc mesenteroides* (V1) de 71°D en pH 4.5, *Lactobacillus plantarum* (AM15, AM17 et AM22) de 73°D à pH 4.5, 63°D à pH 5, 58°D à pH 5.2 et *Lactobacillus paracasei* (AM6 et AM13) de 66°D à pH 4.8 et 78°D à pH 4.2 respectivement pendant 48h, une forte activité protéolytique pour les souches *Lactobacillus plantarum* (AM15 et AM17), *Lactobacillus paracasei* (AM6, et AM13), *Weissella cibaria* AM10 et AM12) et *Leuconostoc mesenteroides* (V3 et N3) a été remarqués. Une absence de l'activité lipolytique et l'activité hémolytique avec une grande sensibilité aux antibiotiques tels que le chloramphénicol, la clindamycine, la doxycycline et l'ampicilline ont été aussi observés. L'étude de profil probiotique a montré des souches une nature hydrophobe et un phénomène d'auto-agrégation entre (49,19–85,49 %) et (31-76,36 %) respectivement avec la capacité de la survie dans diverses barrières biologiques telles que les acides (pH 3 et 4), les sels biliaires (0.5 %, 1 % et 2 %) et pepsine 3mg / ml à pH 3. L'activité antioxydante des souches par radical DPPH a révélé une inhibition du DPPH entre (32.91-69.94 %). Le potentiel antibiofilm du surnageant des souches a montré qu'il était possible d'inhiber la formation de biofilms de *Pseudomonas fluorescens* (62,7–80,32 %), *Listeria ivanovii* (42,02-76,28 %), *E. coli* (44,6-65,9 %) et *klebsiella* sp (19,08 -74,2 %). Les bactéries lactiques sélectionnées pourraient être considérées comme conditionnelles pour une application ultérieure dans les aliments fonctionnels (probiotiques) et principalement dans la prévention et les approches thérapeutiques.

Mot clés :

Bactéries lactiques, Substances antimicrobiennes, Probiotique, Antioxydante, Biofilm, Thérapeutiques

Liste des abréviations

ADN: Acide désoxyribonucléique

ARN: Acide ribonucléique

ATCC: American Type Culture Collection

BHI: Brain Heart Infusion (Infusion de coeur et de cervelle)

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

DO: densité optique

EFSA: European Food Safety Authority

FAO: Food and Agriculture Organization

MRS: Man Rogosa and Sharpe

NCBI: National Center for Biotechnology Information

PCR: Polymerase Chain Reaction

pH: potentiel d'hydrogène

RAPD: Random Amplification of Polymorphic DNA

UFC: Unité formant colonie

WHO: World Health Organisation

Liste des figures

Figure 1 : Arbre phylogénétiques des bactéries lactiques (Holzapfel <i>et al.</i> , 2001).....	10
Figure 2 : Ensemble de l'application potentiel de LAB (De Vuyst et Leroy, 2007).....	14
Figure 3 : Interaction bactéries-cellules hôtes (Artis, 2008).....	28
Figure 4 : Diagramme schématique de la biosynthèse de la nisine A (Perez <i>et al.</i> , 2014).....	33
Figure 5 : Mécanisme de destruction des bactériocines de la nisine classe I (Wiedemann <i>et al.</i> , 2001).....	35
Figure 6 : Principales infections associées aux biofilms (David <i>et al.</i> , 2012).....	47
Figure 7 : Protocole de l'extraction de l'ADN par kite microlyse	58
Figure 8 : Aspect microscopique de souche AM17	70
Figure 9 : La production du CO ₂ à partir du glucose.....	72
Figure 10 : Test de l'hydrolyse de l'arginine	73
Figure 11 : Test utilisation de citrate en milieu KMK.....	74
Figure 12 : Le profil fermentaires des isolats effectué sur microplaque.....	75
Figure 13 : Distribution du pourcentage des isolats lactiques.....	76
Figure 14 : L'apparition des bandes électrophorétiques des 1500pd.....	77
Figure 15 : Extrait du chromatogramme correspondant au spectre de la souche <i>Lactobacillus paracasei</i> AM13.....	78
Figure 16 : La séquence de souche <i>Lactobacillus paracasei</i> AM13 après la correction manuellement du chromatogramme	78
Figure 17 : Dendrogramme dérivé des profils RAPD-PCR combinés générés avec les amorces M13, D11344 et D8635.....	80
Figure 18 : L'activité antagoniste des souches (<i>Weissella cibaria</i> AM12, <i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i> AM15 et AM18, <i>Lactobacillus paracasei</i> AM16) par méthode fleming et al., 1975 vis- à-vis <i>Listeria ivanovii</i>	81

Figure 19 : Interaction bactérienne par la méthode indirect des souches de <i>Weissella cibaria</i> (AM10, AM12, AM10*) et <i>Lactobacillus plantarum</i> (AM15, AM18 et AM19) vis-à vis <i>Pseudomonas fluorescens</i>	83
Figure 20 : Interaction bactérienne par la méthode indirect des souches de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (V3, V3*, N3*, N3 et O61) et <i>Weissella cibaria</i> (AM10*) vis-à vis <i>Chryseobacterium joostei</i>	84
Figure 21 : Interaction bactérienne par la méthode indirecte des souches de <i>Weissella cibaria</i> (AM10), <i>Lactobacillus plantarum</i> (AM3, AM17, AM19, AM20 et AM28) vis-à vis <i>Listeria innocua</i>	84
Figure 22 : Interaction bactérienne par la méthode indirecte des souches traité et non traité par protéinase K vis-à vis de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	85
Figure 23 : Cinétique de croissance en culture pure chez (a) : <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (V1, V3 et N3), (b) : <i>Weissella cibaria</i> (AM10 et AM12) et <i>Weissella confusa</i> (AM4), (c) : <i>Lactobacillus paracasei</i> (AM6 et AM13), (d) : <i>Lb. plantarum</i> (AM15, AM17 et AM22)...	90
Figure 24 : Cinétique de croissance de souche <i>Pseudomonas fluorescens</i> en culture pure et culture mixte avec <i>Weissella confusa</i> (AM4), <i>Weissella cibaria</i> (AM10 et AM12) et <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (V3 et N3).....	91
Figure 25 : Cinétique de croissance de souche <i>Pseudomonas fluorescens</i> en culture pure et culture mixte avec <i>Lactobacillus plantarum</i> (AM15, AM17 et AM22) et <i>Lactobacillus paracasei</i> (AM6 et AM13).....	91
Figure 26 : Cinétique de croissance de souche <i>Listeria ivanovii</i> en culture pure et culture mixte avec <i>Weissella confusa</i> (AM4), <i>Weissella cibaria</i> (AM10 et AM12) et <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (V3 et N3).....	92
Figure 27 : Cinétique de croissance de souche <i>Listeria ivanovii</i> en culture pure et culture mixte avec <i>Lactobacillus plantarum</i> (AM15, AM17 et AM22) et <i>Lactobacillus paracasei</i> (AM6 et AM13).....	92
Figure 28: Evolution de pH chez (a) : <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (V1, V3 et N3), (b) : <i>Weissella cibaria</i> (AM10 et AM12) et <i>Weissella confusa</i> (AM4), (c) : <i>Lactobacillus plantarum</i> (AM15, AM17 et AM22), (d) : <i>Lb. paracasei</i> (AM6 et AM13).....	94



Figure 29: Evolution de l'acidité Dornic chez (a) : <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (V1, V3 et N3), (b) : <i>Weissella cibaria</i> (AM10 et AM12) et <i>Weissella confusa</i> (AM4), (c) : <i>Lactobacillus plantarum</i> (AM15, AM17 et AM22), (d) : <i>Lb. paracasei</i> (AM6 et AM13).....	95
Figure 30 : L'activité protéolytique des souches <i>Weissella cibaria</i> AM10, <i>Lactobacillus paracasei</i> AM13, <i>Lactobacillus plantarum</i> AM15 et <i>Leuconostoc mesenteroides</i> N3 et V3...	96
Figure 31 : Aspect des souches <i>Leuconostoc mesenteroides</i> V3 et <i>Weissella cibaria</i> AM12 productrices d'exopolysaccharides sur milieu hypersccharosé.....	97
Figure 32 : La production d'acétoïne des souches de <i>Lactobacillus paracasei</i> AM6 et AM13, de <i>Weissella cibaria</i> AM12, de <i>Lactobacillus plantarum</i> AM17 et de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> V3 et N3.....	98
Figure 33 : Test antibiotiques de souche <i>Leuconostoc mesenteroides</i> N3.....	101
Figure 34: Pourcentage des hydrophobicité des souches.....	105
Figure 35 : Pourcentage des auto-agrégations des souches.....	106
Figure 36 : Pourcentage des inhibitions le DPPH radical des souches.....	107
Figure 37 : Effet des surnageant des souches lactiques sur l'adhésion de <i>E.coli</i> , <i>Listeria ivanovii</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> et <i>Klebsiella</i> sp.	109

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition du lait de chèvre et de chamelle en élément minéraux majeur (Gueguen, 1996 ; Attia <i>et al.</i> , 2000).....	6
Tableau 2: Composition en vitamine du lait de chèvre et de chamelle (Jaubret, 1996 ; Siboutaur, 2007 ; Haddadin <i>et al.</i> , 2008).....	6
Tableau 3: Culture starters, microorganisme associés et leurs application en industrie laitière (Hui, 1992).....	17
Tableau 4 : Les bactéries lactiques considérés comme probiotiques (Hozalpfel <i>et al.</i> , 1998).....	25
Tableau 5 : Caractéristiques des chammelles et des chèvres dont on a prélevé le lait	53
Tableau 6: Souches indicatrices utilisées dans l'activité antimicrobienne.....	60
Tableau 7: Liste des antibiotiques testés	66
Tableau 8: Résultats des identifications phénotypiques des isolats	76
Tableau 9 : Identification des bactéries lactiques isolées par technique de l'ARNR16s.....	79
Tableau 10 : L'étude de l'activité antibactérienne des souches lactiques par la méthode directe...	82
Tableau 11 : L'étude de l'activité antibactérienne des souches lactiques par la méthode indirecte.	85
Tableau 12 : L'étude de l'activité antibactérienne des souches lactiques cultivé en MRS tamponnée à pH 7.....	86
Tableau 13: Effet de la temperature sur l'activité de la bactériocine des souches vis-à vis <i>Listeria ivanovii</i>	87
Tableau 14 : Effet du pH sur l'activité de la bactériocine des souches isolées.....	88
Tableau 15 : Caractères technologiques des souches isolées.....	99
Tableau 16 : Résultats de test sensibilité des antibiotiques	101
Tableau 17 : Effet du pH acide sur la viabilité des souches.....	102
Tableau 18: Effet des différentes concentrations des sels biliaires sur les souches.....	103
Tableau 19: Effet de la pepsine à différents pH sur la viabilité des souches.....	104

Introduction

À ce jour, l'industrie utilisait de nombreux additifs alimentaires synthétiques (chlore, nitrate, nitrite, acide benzoïque et acide sorbique) pour contrôler la contamination bactérienne et prolonger la durée de conservation des aliments (**Sharpe et al., 2013**). Dernièrement, les recherches sont axées sur des substances de conservation naturelles telles que les bactéries lactiques qui ne contiennent pas des additifs synthétiques avec qualité égale ou supérieure due à leur potentiel probiotique, et qui produisent des agents antimicrobiens avec pouvoir antioxydant et antibiofilm.

Les bactéries lactiques se réfèrent à un grand groupe de bactéries, plutôt qu'à une seule espèce ou souche, qui produisent de l'acide lactique en tant que sous-produit de la digestion de leur source de nourriture (habituellement des glucides). Ils font partie des groupes de microorganismes les plus importants utilisés dans la fermentation des aliments, qui contribuent à la saveur et à la texture des produits fermentés (**David et al., 2013**).

Récemment, le rôle du LAB dans la santé et la fonctionnalité de l'intestin humain et du bétail a été souligné, principalement en raison de leur capacité à croître à un pH bas et à produire des agents antimicrobiens tels que l'acide lactique, le peroxyde d'hydrogène, les bactériophages et les bactériocines (**Foulquié Moreno et al., 2006**).

Les bactériocines sont considérées comme des conservateurs naturels ou des bio-conservateurs. Elles sont des toxines protéiniques produites par des bactéries lactiques pour inhiber la croissance de souches bactériennes similaires ou étroitement liées. Ce sont des agents antibiotiques qui sont codés dans les plasmides, les chromosomes ou les transposons et sont des peptides antimicrobiens synthétisés par le ribosome.

De nombreuses bactéries lactiques sont prouvées avec des fonctions probiotiques, qui sont bénéfiques pour l'hôte lors qu'il est pris en quantités suffisantes. La viabilité des bactéries probiotiques est importante pour la survie dans les aliments pendant la durée de conservation et le transit dans les conditions acides de l'estomac. Pour le dépistage des bactéries probiotiques, elles doivent également être résistantes à la dégradation par les enzymes hydrolytiques et les sels biliaires dans l'intestin grêle (**Belma et Gulcin, 2009**).

Les médicaments à base d'antioxydants et les formulations pour la prévention et le traitement de maladies complexes ont suscité un grand intérêt dans la recherche d'antioxydants naturels comme les bactéries lactiques. Pour sélectionner les bactéries lactiques antioxydant divers tests in vitro ont été réalisés comme la réduction du pouvoir, le pouvoir antioxydant réducteur ferrique, le dosage de l'acide linoléique, le DPPH, l'oxyde nitrique, le superoxyde et le peroxyde d'hydrogène (**Venkatachalam, 2012**).

Les bactéries lactiques sont caractérisées ainsi par leur capacité à empêcher la formation de biofilms de bactéries indésirables. Les biofilms, une communauté bactérienne adhérent à une surface biotique tel que canalisation de distribution de l'eau potable, et une surface abiotique tels que des tissus humains et les racines des végétaux.

Dans ce travail nous sommes intéressés par la sélection des bactéries lactiques isolées à partir du lait de chamelle et du lait de chèvre qui produisent des substances antimicrobiennes. En plus, nous avons étudié la caractérisation de leurs profils technologiques et probiotiques, ainsi que le potentiel de l'activité antioxydante et antibiofilm.

Synthèse
bibliographique

I. Le lait

Le lait est un liquide biologique comestible généralement de couleur blanchâtre produit par les glandes mammaires des mammifères femelles. Riche en lactose, et considérée comme principale source de nutriments pour les jeunes mammifères avant qu'ils puissent digérer d'autres types d'aliments. Le lait en début de lactation contient le colostrum, qui porte les anticorps de la mère afin de réduire le risque de nombreuses maladies chez le nouveau-né. Il contient également de nombreux autres nutriments.

Le lait a été défini en 1909 par le congrès internationale de la répression des fraudes comme : « le lait est le produit intégral de la traite totale interrompue d'une femelle laitière bien portante bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum »

I. 1. Le lait de chèvre

En Algérie, le lait de chèvre représente une part négligeable dans la production nationale de lait. La production de lait de chèvre est 267,000 tonnes en 2012 (FAO, 2013). L'élevage en Algérie se caractérise par des pratiques et des systèmes de production extensifs des cultures fourragères peu développées et l'utilisation d'un matériel biologique local. Le développement de l'élevage s'impose comme une nécessité en égard à une demande de plus accrue de la part d'une population en plein essor démographique et en plus soumise aux transformations, telles que l'industrialisation et l'urbanisation qu'accompagnent des exigences alimentaires.(Feknous, 1991).

1.1. Les races caprines en Algérie

Le cheptel caprin Algérien est très hétérogène et composé d'animaux de population locale, et de population croisée.

Population locale : Elle est représentée essentiellement par la race arabe, et kabyle, et chèvre de M'zab :

Race arabe (Arbia) : C'est la race la plus dominante. Elle se localise dans les hauts plateaux, les zones steppiques et semi-steppiques ; elle se caractérise par une taille basse de 50 – 70 cm, une tête pourvue de corne avec des longues oreilles et pendantes, sa robe est multicolore (noire, gris



marron) à poil long de 12 à 15 cm. La chèvre arabe a une production laitière moyenne de 1,5 litre par jour.

Race kabyle : C'est une chèvre autochtone qui peuple les massifs montagneux de Kabylie et des Aurès, elle est robuste, massive, de petite taille d'où son nom (naine de Kabylie), la tête est connue par ses longues oreilles et tombantes, la robe est à poil long et couleur est variée, (noire blanche, ou brune) (Hellal, 1986). Sa production laitière est mauvaise 1 L/j ; elle est élevée généralement pour la production de viande qui est de qualité appréciable (Aoun, 2008).



Chèvre de M'zab : Dénommée aussi «la chèvre rouge des oasis». Elle est originaire de Metlili ou Berriane, et se caractérise par un corps allongé, droit et rectiligne, la taille est de 68cm pour le mâle, et 65cm pour la femelle, avec des poids respectifs de 50kg et 35kg. La robe est de trois couleurs : le chamois qui domine, le brun et le noir, le poil est court (3-7cm) chez la majorité des individus, la tête est fine, porte des cornes rejetées en arrière lorsqu'elles existent, le chanfrein est convexe, les oreilles sont longues et tombantes (15cm). Sa production laitière est bonne (2 – 3 litre/jour) (Bey et Laloui, 2005).



La race Makatia: D'après (Guelmaoui et Abderehmani, 1995), elle est originaire d'Ouled Nail, on la trouve dans la région de Laghouat. Elle est sans doute le résultat du croisement entre l'ARABIA et la CHERKIA. Selon (Hellal, 1986), le chèvre Makatia présente un corps allongé à dessus droit, Chanfrein légèrement convexe chez quelques sujets, robe variée de couleur grise, beige, blanche et brune à poils ras et fins, longueur entre 3-5 cm. La tête est forte chez le mâle, et chez la femelle elle porte des cornes dirigées vers l'arrière, possède d'une barbiche et, deux pendeloques (moins fréquentes) et de longues oreilles tombantes qui peuvent atteindre 16 cm. Le poids est de 60 kg pour le mâle et 40 kg pour la femelle, alors que la hauteur au garrot est de 72 cm et 63 cm respectivement, ont de gros trayons, la production laitière est de 1 à 2 L/J



Population croisée

Est constituée par des sujets issus des croisements non contrôlés entre la population locale et d'autres races, mais les essais sont très limités, les produits ont une taille remarquable, une carcasse pleine, souvent des gestations gémellaires, et une production laitière appréciable, les poils sont généralement courts (**Khelifi, 1997**). Ces produits sont rencontrés principalement au sein des exploitations de l'Etat (**Chellig, 1978**).

I. 2. Le lait de chamelle

Le lait de chamelle est apprécié traditionnellement pour sa propriété anti-infectieuse, anticancéreuse, antidiabétique et plus généralement comme reconstituante chez les malades convalescents (**Konuspayeva, 2004**). On évalue de 6 à 9 litres la production journalière d'une chamelle. Selon le **F.A.O** en **2013** la production de lait de camelin est 13,000 tonnes en 2012.

2.1. Les races dromadaire algériennes

Les différentes races rencontrées en Algérie se retrouvent dans les trois pays d'Afrique du Nord; ce sont des races de selles, de bât et de trait. Il s'agit des races suivantes selon (**Messaoudi, 1999**)

CHAAMBI: C'est un animal lourd très souvent utilisé pour les transports, c'est le dromadaire le plus productif en viande. Il n'exceptionnellement pas utilisé pour la selle, a une taille moyenne. Sa robe va de baie à la cendre avec des touffes des poils courtes très fournies particulièrement au sommet de la bosse et dans la région de l'auge et des parotides. Sa répartition va du Grand Erg Occidental au Grand Erg Oriental sur bande qui s'étend du Nord au Sud du chott El Honda jusque dans le Metlili des chaâmba dans la vallée du M'zab, et jusqu'au Nord d'Adrar et de Béni Abbés. Cela dit, c'est une race que l'on peut rencontrer dans toutes les régions à vocation cameline

TARGUI : C'est le dromadaire de course par excellence, il est très haut sur des membres fins et secs, avec une robe grise à poils très courts et fins. C'est le dromadaire des Touaregs du Nord, on le retrouve dans le Sahara central, l' Hoggar et l'extrême Sud Algérien (Tamanrasset). On le rencontre très souvent un peu plus au Nord, parce qu'il est très souvent utilisé comme reproducteur et, bien entendu, pour les courses des dromadaires.

L'AJJER : C'est le dromadaire du Tassili, il ressemble à s'y méprendre au Targui, et n'en diffère que par la taille, il est plus court, et par son poil plus long que celui de Targui. C'est un

dromadaire de selle, mais il est plus souvent utilisé comme porteur. On le rencontre dans la région du Tassili, mais aussi dans le Sud des wilayas de Tébessa, d'El-Oued et de Biskra.

REGUIBI : C'est un dromadaire de taille moyenne à la robe cendrée avec toutes les nuances du clair au foncé, il est indifféremment utilisé pour le transport ou pour la selle. On le rencontre dans le Sud-Ouest Algérien, dans la région du Béchar, Tindouf et jusqu'aux régions d'Adrar.

Autres races : Les autres races sont constituées par le Bérbéri dromadaire de steppe et du Nord Sahara, le Sahraoui considéré comme le produit de croisement du Chaâmbi et du Ouled Sidi Cheikh. Cette dernière est une race de dromadaire peuplant les régions de Naâma et d'El-Bayadh ; l'Ait-Khebbach qui est un dromadaire, de petite taille, à robe fauve à fauve sable utilisé comme animal de bât, et se répartit dans la bande comprise entre Nord-Ouest d'Adrar et l'Est du Béchar. Enfin la race dite Aftouh dont les origines ne sont pas encore tout à fait cernées. Il semblerait que ce serait un produit de croisement de Reguibi à qui il ressemble le plus sauf que l'Aftouh est beaucoup plus massif. Ils vivent dans la même région, l'Aftouh est particulièrement utilisé pour le transport.

I. 3. Caractérisation du lait de chèvre et de chamelle

1. 3.1. Caractéristiques organoleptiques et physico chimiques du lait de chèvre et de chamelle

Le lait de chamelle et le lait de chèvre sont un liquide blanc mat dû à la présence et l'absence de β -carotène (Sawaya *et al.*, 1984). Le lait de chamelle présente un goût sucré, acide et parfois même salé et pour le lait de chèvre un goût douceâtre.

Le pH du lait camelin se situe 6,68 et l'acidité est l'ordre de 15°Dornic (Ghennan *et al.*, 2007) et sa densité est 1,028 (Alloui-Lombrakia *et al.*, 2007)

Le pH du lait de chèvre est de 6,5 qui peut varier jusqu'à 6,7 et l'acidité se situe entre 14 et 18°Dornic (Vignalo, 2002) et la densité est comprise entre 1,026 et 1,042.

I. 3.2. Caractéristiques chimiques du lait de chèvre et de chamelle

- **La matière grasse**

La matière grasse laitière qui représente une source importante d'énergie, est constituée essentiellement de lipides et de substances lipoidiques. Néanmoins des composés protéiques

sont présents dans la membrane du globule gras. Elle constitue également, un apport important en acides gras essentiels et en vitamines liposolubles. Quelques études consacrées à cette matière ont mis en évidence son apport quantitatif et qualitatif (**Glass *et al.*, 1967 ; Hagrass *et al.*, 1987 ; Haddin, 2008**).

Dans le lait de chamelle, la matière grasse (MG), représentant 2,7 à 3,6 % de la composition globale, est dispersée sous forme de globules gras (GG) (**Farah, 1996 ; Karray *et al.*, 2005**). La teneur en M.G du lait de chèvre est 3.44% (**Guegen, 1997**)

- **Les minéraux**

Le lait contient une bonne source d'apport en minéraux. Le lait camelin constitue les macroéléments tel que Sodium, potassium, calcium, magnésium (**Tableau 1**), et se caractérise néanmoins par des taux plus élevés en oligoéléments (**Yagil et Etzion, 1980a ; Bengoumi *et al.*, 1994 ; Gorban et Izzeldin, 1997**). Le lait de chèvre plus riche par calcium, potassium, phosphore et magnésium (**Van Werbek, 2008**), contient aussi des oligoéléments indispensables à l'organisme tel que le fer, cuivre, chrome, fluor, sélénium.

Tableau 1 : Composition du lait de chèvre et de chamelle en élément minéraux majeur (**Guegen, 1996 ; Attia *et al.*, 2000**)

Composition g/l	Lait de chèvre	Lait de chamelle
Calcium	1,26	1,23
Phosphore	0,97	1,02
Potassium	1,9	1,72
Magnésium	0,13	0,09
Sodium	0,38	0,66

- **Les vitamines**

Le lait de chamelle contient fortes teneurs en vitamine B2, B5 que le lait de chèvre. Il se distingue par sa richesse en vitamine C (Jaubret, 1996 ; Siboutaur, 2007 ; Haddadin *et al.*, 2008) (Tableau 2). Le lait de chèvre est particulièrement pauvre en vitamine C, B6, B12 et acide folique. Le manque de ces deux dernières vitamines peut entraîner l'anémie chez les nourrissons alimentés au lait de chèvre.

Tableau 2 : Composition en vitamine du lait de chèvre et de chamelle (Jaubret, 1996 ; Siboutaur, 2007 ; Haddadin *et al.*, 2008)

Composition mg/l	Lait de chèvre	Lait de chamelle
A (Rétinol)	0,04	0,264
B1 (Thiamine)	0,05	0,48
B2 (Riboflavine)	0,14	1,68
B3 (Niacine)	0,27	0,78
B5 (Acide pantothénique)	0,31	3,68
B6 (Pyridoxine)	0,05	0,55
B9 (Acide folique)	0,001	0,087
B12 (Cobalamine)	0,00006	0,0085
C (Acide ascorbique)	1,3	33
E (Tocophérol)	0,04	0,0178

- **Les protéines**

Les protéines du lait ont, en gros, la même composition que les protéines totales de l'œuf (protéines de référence), sauf en ce qui concerne le taux de methionine et de cystine, sensiblement plus bas. En effet, les acides aminés soufrés sont les facteurs limitants du lait (Konte, 1999). Le taux de protéines de lait de chamelle et de lait de chèvre variant de 2,5 à 4% et 3,08% respectivement (Guegen, 1997)

I. 3.3. Caractéristiques microbiologiques du lait de chèvre et de chamelle

Le lait referme inévitablement une microflore dont la nature et l'importance sont conditionnées par l'état sanitaire de l'animal, les conditions de traite, la température, la durée de conservation...ect. Sous des conditions rigoureuses de collecte, sa charge ne dépasse cependant pas 5.10^3 germes/ml (**Larpent et al., 1997**).

Les microflores du lait sont réparties en deux grandes classes :

La flore indigène : est un ensemble des microorganismes retrouvés dans le lait à la sortie du pis, ces micro organismes dépendent de l'alimentation, de la race et d'autres facteurs. La majorité des germes est constituée de souches indigènes. Il s'agit essentiellement de germes saprophytes du pis tel que les bactéries lactiques (**Vignola et al., 2002**).

Selon **Karam, 2006** Les genres bactériens lactiques rencontrés dans huit échantillons du lait de chamelle algérienne étaient représentés par des souches de *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* et *Lactobacillus*, plus de la moitié des bactéries lactiques isolées appartenaient aux genres *Enterococcus* (34,6%) et *Lactococcus* (34,6%). Pour ce dernier genre les espèces étaient présentes en proportions différentes: *Lactococcus lactis* ssp. *diacetylactis* (28,4%), *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (4,9%) et *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (1,2%). Le genre *Leuconostoc* était représenté par 12,3% des souches isolées et comprend *Leuconostoc lactis* (7,4%) et *Leuconostoc dextranicum* (4,9%). Les souches de *Lactobacillus plantarum* constituaient 18,5% des bactéries lactiques isolées.

La distribution qualitative des bactéries lactiques de 19 échantillons du lait cru de chèvre de deux populations caprines algériennes (Kabyle et Arabia), a montré que le genre *Lactobacillus* est nettement prédominant dans la population Kabyle (61,48 %); suivi de *Lactococcus* (22,9%), *Streptococcus* (8,88%), *Leuconostoc* (5,92%) et de loin de *Pediococcus* (0,74 %), alors que les deux genres *Leuconostoc* et *Lactococcus* sont représentés de façon presque similaire dans la population Arabia (32,64 % et 31,02 % respectivement), ainsi que *Lactobacillus* (15,27 %), *Streptococcus* (14,82 %) et *Pediococcus* avec une faible représentation (6,25 %) (**Badis et al., 2005**)

La flore contaminant : est un ensemble des microorganismes peut se composer d'une flore d'altération s'agit *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *E.coli*, *Clostridium*, Entérobactéries et certaines levures et moisissures, qui causera des défauts sensoriels tels que du gout, de

l'arôme et de la texture, et qui réduira la durée de conservation des produits. Aussi composer d'une flore pathogène est responsable des affections reliées à la santé des consommateurs. Ce dernier on en retrouve deux genres, les bactéries infectieuses s'agissent de *Salmonella* sp., *E.coli* O157:H7, *Listeria monocytogènes*, *Clostridium perfringens*, *Brucella* et *Campylobacter* sp., et les bactéries toxinogènes s'agissent de *Staphylococcus* sp. et *Clostridium botulinum* qui produisent une toxine dans l'aliment (**Lamontagne et al., 2002**)

II. Les Bactéries lactiques

II. 1. Présentation des bactéries lactiques

En 1873 dix ans après, Louis Pasteur a étudié la fermentation lactique (entre 1857 et 1863), **Lister** a obtenu la première culture pure d'une bactérie lactique (LAB) ("Bacterium lactis" maintenant connue sous le nom de *Lactococcus lactis*). Les cultures de starter pour le fromage et la production de lait aigre ont été introduites en 1890, tandis que les aliments fermentés ont été utilisés par l'homme pendant plus de 5 000 ans (**Schlegel, 1999 ; Stiles et Holzappel, 1997**). La première monographie par Orla-Jensen est apparue en 1919.

Les bactéries lactiques (LAB) constituent un groupe hétérogène à Gram positives, généralement immobiles, asporulées, cocci ou bacille, catalase négative et ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (**Dellaglio et al., 1994 ; Hogg, 2005**).

Les bactéries lactiques se réfèrent à un grand groupe de bactéries, plutôt qu'à une seule espèce ou à une souche, qui produisent de l'acide lactique comme sous-produit de la digestion de leur source alimentaire (généralement des glucides). Elles sont parmi les groupes les plus importants de microorganismes utilisés dans la fermentation alimentaire, ce qui contribue au goût et à la texture des produits fermentés et à l'inhibition de la détérioration des aliments causée par d'autres microorganismes (**Nordqvist, 2004 ; David et al., 2013**).

Les bactéries lactiques sont regroupées soit comme Homofermentaires ou Hétérofermentaires en fonction du produit final de leur fermentation. Les Homofermentaires produisent de l'acide lactique comme produit principal de la fermentation du glucose. Les Hétérofermentaires produisent un certain nombre de produits en plus de l'acide lactique, y compris le dioxyde de carbone, l'acide acétique et l'éthanol à partir de la fermentation du glucose.

II. 2. Ecologie et classification des bactéries lactiques

En général, LAB se trouve dans des habitats avec une alimentation riche en nutrition. Elle se retrouve sur des matières végétales et des fruits, dans les produits laitiers, la viande et le poisson fermentés, les céréales, les betteraves, les légumes en conserve, les levures, les ensilages, les boissons fermentées, les jus, les eaux usées et les cavités (bouche, organes génitaux, intestinaux et respiratoires tractus) des êtres humains et des animaux (**König et al., 2009**)

Les bactéries lactiques constituent un groupe de bactéries avoir morphologiques, métabolique et physiologique similitude et ils sont aussi relativement proches phylogénétiquement. Les révisions taxonomiques récentes ont proposé plusieurs nouveaux genres et le groupe restant comprend maintenant (**Figure 1**): *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella*. Les lactobacilles, les carnobactéries et certains *Weissella* sont tiges tandis que les genres restants sont des cocci (**Jin et al., 2009**). Pour l'identification de LAB, les méthodes phénotypiques ont été le plus souvent utilisés (**Corsetti et al., 2001**). Plus récemment, des techniques génétiques, telles que la 16S. Le séquençage de l'ADNr a été développé, ce qui permet identification plus cohérente et précise de souches individuelles (**Buddhiman et al., 2008**). Une nouvelle méthode d'identification basée sur l'analyse protéomique, qui étudie le profil protéique des bactéries (**Izquierdo et al., 2009**).

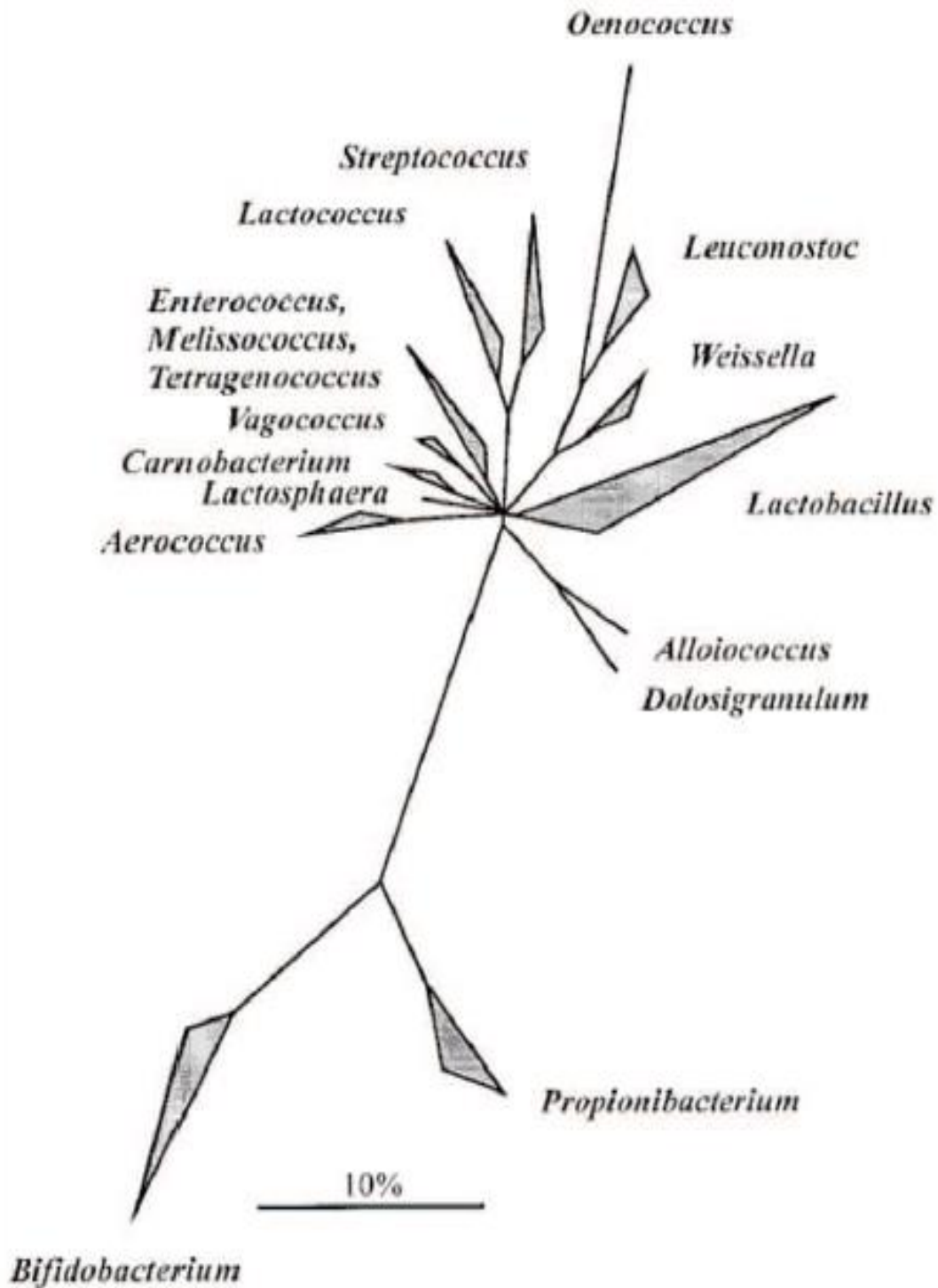


Figure 1 : Arbre phylogénétique des bactéries lactiques (Holzapfel *et al.*, 2001)

II. 3. Caractérisation des principaux genres des bactéries lactiques

II. 3.1. Genre *Leuconostoc*

Les *Leuconostoc* sont hétérofermentaires. Ils produisent de l'acide lactique, du CO₂ et de l'éthanol. Ce sont des coques groupées en paires ou en chaînes, catalase (-) (**Larpent et al., 1997**). Leur température optimale de croissance se situe entre 25 °C et 30 °C. Le développement des *Leuconostoc* entraîne souvent l'apparition d'une viscosité dans le milieu (**Guiraud et al., 2003**).

Seules quatre espèces de *Leuconostoc* ont été incluses dans le manuel de Bergey de la systématique bactériologique (**Garvie et al., 1986**), les espèces de *Ln. mesenteroides* comportant trois sous-espèces *Ln. mesenteroides* subsp *mesenteroides*, *Ln. mesenteroides* subsp *dextranicum* et *Ln. mesenteroides* subsp *cremoris*. Des nouvelles espèces ont été décrites : *Ln. lactis*, *Ln. pseudomesenteroides*, *Ln. citreum*, *Ln. amelibiosum*, *Ln. gelidum*, *Ln. flax*, *Ln. argentinum*, *Ln. gasicomitaatum*, *Ln. kimchii*, *Ln. inhae*, *Ln. ficulneum* et *Ln. carnosum* (**Farrow et al., 1989 ; Reeson et al., 2003**).

III. 3. 2. Genre *Weissella*

Dans la famille des *Leuconostocaceae*, la séparation des *Weissella* du groupe des *Leuconostoc* et de certaines autres bactéries lactiques hétérofermentaires est toujours problématique. En général, les espèces du genre *Weissella* sont constituées de courts bacilles, de coccobacilles ou des coques ovoïdes, à Gram positif, se présentant de manière isolée ou groupés par deux ou en courtes chaînes, non sporulés, immobiles, catalase négative (*Weissella paramesenteroides* peut produire une pseudo-catalase lorsqu'elle est cultivée sur un milieu pauvre en glucose), oxydase négative, aéro-anaérobies ou micro-aérophiles, chimio-organotrophes, hétérofermentaires stricts, cultivant à 15 °C, ayant des exigences nutritionnelles complexes.

Une étude taxonomique sur des souches bactériennes ressemblant à des *Leuconostoc*, isolées de saucissons secs fabriqués en Grèce, a été réalisée en 1993 par Collins et ses collaborateurs. L'étude des séquences des ARNr 16S permet de classer ces souches dans le groupe constitué par *Leuconostoc paramesenteroides* et cinq espèces de lactobacilles hétérofermentaires. En se basant sur les résultats obtenus, **Collins et al., 1993**, transfère l'ensemble de ces espèces dans le nouveau genre *Weissella* et propose la création de six nouvelles combinaisons (*W. confusa*, *W. halotolerans*, *W. kandleri*, *W. minor*, *W. viridescens* et *W. paramesenteroides*) pour reclasser *Lb. confusus*, *Lb. halotolerans*, *Lb. kandleri*, *Lb.*

minor, *Lb. viridescens* et *Ln. paramesenteroides* ainsi que la création d'une nouvelle espèce (*Weissella hellenica*) pour les souches isolées de saucissons grecs.

Ultérieurement, cinq nouvelles espèces, *W. cibaria*, *W. kimchii*, *W. koreensis*, *W. soli* et *W. thailandensis*, ont été incluses dans le genre *Weissella* sur la base des résultats des homologies ADN - ADN et du séquençage des ARNr 16S (Björkroth *et al.*, 2004 ; Lee *et al.*, 2002, Choi *et al.*, 2002). En 2004, Ennahar et Cai montrent que *W. cibaria* et *W. kimchii* constituent une unique espèce qui, en fonction des règles de priorité, doit être appelée *W. cibaria*.

Plusieurs espèces de *Weissella* sont associées à la viande et les produits carnés. Ces bactéries peuvent être des agents d'altération à basse température. Les *Weissella thailandensis* ont été isolés de poisson fermenté de Thaïlande (Tanasupawat *et al.*, 2000).

Koort *et al.*, 2006, ont identifié les *Weissella viridescens* sur du « Morcilla de Burgos » -un produit carné cuit d'Espagne- par l'analyse des séquences de ARNr 16S.

II. 3.3. Genre *Lactobacillus*

Le genre *Lactobacillus* est le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae*. Il contient de nombreuses espèces qui sont des agents de fermentation lactique intervenant dans de nombreuses industries ou qui sont rencontrées comme contaminants (Guiraud, 2003)

Il s'agit de bacilles souvent allongés, Gram +, non sporulés, parfois groupés en paires ou en chaînes, généralement immobiles. Ils sont catalase (-) (certains ont un pseudo-catalase mais sa benzidine (-), micro-aérophile ou anaérobie. Ils ont un métabolisme fermentaire produisant de l'acide lactique.

Les lactobacilles homofermentaires stricts (par exemple les *Lb. delbrueckii*) utilise la voie de la glycolyse ; les pentoses et le gluconate ne sont pas fermentés. Parmi les hétérofermentaires, certains sont facultatifs (par exemple les *Lb. casei*) : ils utilisent la glycolyse ou le cycle des pentoses ; les pentoses et le gluconate sont fermentés par l'intermédiaire de ce dernier. Les hétérofermentaires stricts (*Lb. brevis*) n'utilisent que le cycle des pentoses. Les lactobacilles exigent pour leur développement des milieux bien adaptés, riches en acides aminés, en vitamines et en acides gras : ils sont acidophiles. Ils sont généralement peu protéolytiques et peu lipolytiques.

Le genre *Lactobacillus* a été subdivisé par Orla Jensen, 1919 en trois groupes et cette classification est encore utilisée en milieu industriel :

- Groupe I ou “*Thermobacterium*”

Il comprend les lactobacilles homofermentaires stricts, la plupart étant thermophiles, qui se développent à 45 °C mais pas à 15 °C. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation (lait, yaourts, fromages) sont *Lb. helveticus*, *Lb. jugurti*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. lactis*, *Lb. acidophilus*, *Lb. leichamii*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. kefirifaciens*, *Lb. mali*,...

- Groupe II ou “*Streptobacterium*”

Il regroupe les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs mésophiles qui se développent à 15 °C. Ces bactéries fermentent les pentoses par la voie hétérofermentaire et les hexoses par la voie homofermentaire. Il comporte les *Lb. casei* qui sont les lactobacilles prédominants du lait, les *Lb. plantarum* rencontré dans la choucroute, les *Lb. curvatus*, *Lb. sake*, *Lb. acetotolerans*, *Lb. graminis*, *Lb. rhamnosus*,...présents dans diverses matrices alimentaires végétales et animales.

- Groupe III ou “*Betabacterium*”

Il comprend les lactobacilles hétérofermentaires stricts. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation sont *Lb. fermentum*, *Lb. buchneri*, *Lb. brevis*, *Lb. fructivorans*, *Lb. hilgardii*, *Lb. sanfrancisco*,...

Ces lactobacilles contaminent fréquemment les produits alimentaires et sont les agents de sùrissement. Ils ne sont jamais pathogènes. Dans les viandes, ils provoquent le verdissement par action de l'H₂O₂ qui transforme l'hémoglobine en cholé globine, ou de l'H₂S qui forme de la sulfo-myoglobine. Dans les produits conservés par des acides, *Lactobacillus acetotolerant* et les autres lactobacilles (*Lb. plantarum*, *Lb. buchneri*, *Lb. brevis*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. casei* ou *Lb. fructivorans*) peuvent résister et causer des altérations. Dans le cas de l'altération du vin, les *Lactobacillus* ont souvent été incriminés, en particulier les *Lb. hilgardii*, identifiés comme la cause majeure de l'altération (**Guiraud et al., 2003**).

III. Application des bactéries lactiques

III. 1. Application dans Secteur agroalimentaire

Dans l'industrie alimentaire, les bactéries lactiques sont impliquées dans la fermentation et bioconservation des différents aliments, les souches *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* sont utilisées pour la production du yaourt (Yateem *et al.*, 2008), le vin, les poissons, les viandes, les charcuteries, le pain au levain entre autres sont aussi des produits de fermentation par des bactéries lactiques (Badis *et al.*, 2005) (Figure 2).

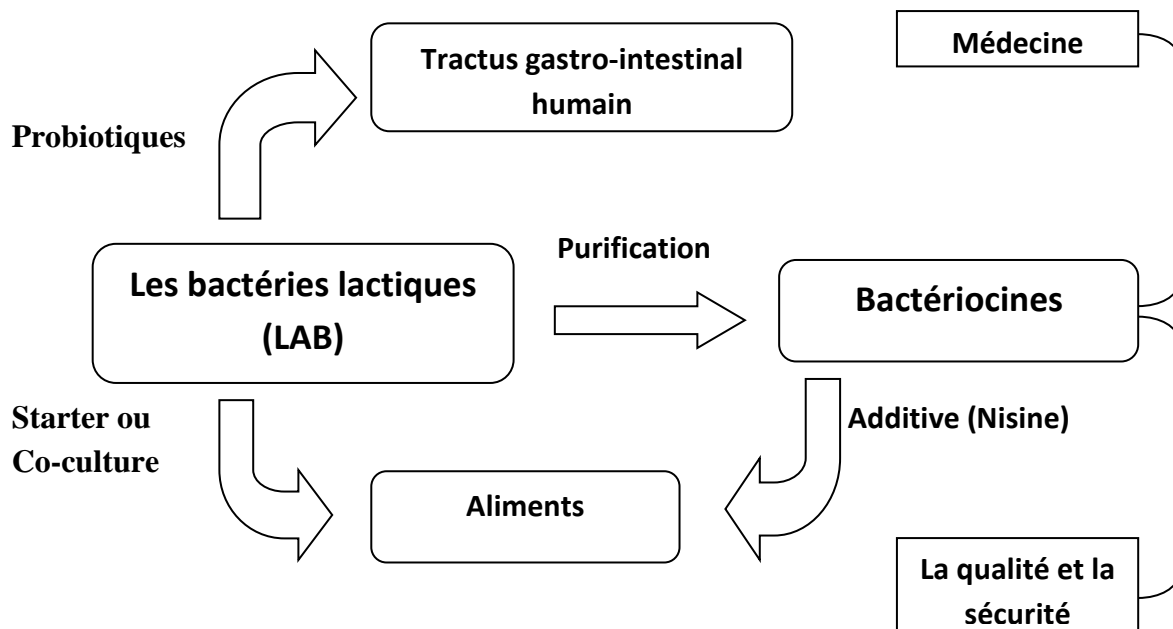


Figure 2 : Ensemble de l'application potentiel de LAB (De Vuyst et Leroy, 2007)

III. 1.1. Les ferments lactiques

Les bactéries lactiques sont introduites dans le lait sous forme de «levains » lactiques, encore appelés «ferments » pour démarrer le procédé de fermentation. Ils sont employés pour la production d'une grande gamme de produits laitiers comme le yaourt, le lait fermenté, le fromage, le beurre et la crème (**Wildaman, 2007 ; Chen, 2010 ; Yildiz, 2010**). Les LAB les plus souvent identifiées dans les produits de panification sont une flore hétérogène essentiellement homofermentaire et composées appartiennent aux genres *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Ln mesenteroides*, *Pediococcus* et *Lactobacillus* homofermentaire: *Lb coryneformis*, *Lb planétarium*, *Lb casei*, *Lb salivarium* et *Lb curvatus*. Et *Lactobacillus* hétérofermentaire: *Lb cellobiosus*, *Lb brevis* et *Lb fermentum* sont le plus représentés. En peut ajouter d'autres genres moins fréquents comme : *Streptococcus* et *Enterococcus*, en mise évidence des nouvelles espèces jusque-là non décrites : *Lb. Spicheri*, *Lb hammesii*, *Lb nantensis*, *Lb rossia*, *Lb acidifirinae* et *Lb zymae* (**Jean-Paul Larpent, 1997**). Les levains de panification ont des effets sur la qualité du pain (la texture des pâtes et du pain, caractéristiques organoleptiques des produits, conservation et retard au rassissement,...), ces effets sont en relation avec l'activité des bactéries lactiques dans la pâte.

III. 1.1.1. Production des ferments lactiques

Selon **PriouIt, 2007** la production de ferments concentrés visent à obtenir des ferments ayant une activité élevée, une grande quantité de cellules viables et un équilibre entre les souches dans les ferments mixtes. Différentes méthodes sont utilisées pour produire des ferments concentrés dont les cultures discontinues ou continues (en cellules libres ou immobilisées). La culture discontinue est la plus couramment utilisée en industrie, mais une inhibition de croissance des bactéries est observée par l'acide lactique produit au cours de la fermentation. La culture continue en cellules libres, très peu utilisée en industrie pour des raisons technologiques, élimine ce problème par un renouvellement constant du milieu de fermentation. La technique de l'immobilisation cellulaire (TCI) est utilisée actuellement en industrie pour la fermentation de la bière et la fabrication du pain. Cette technique a été proposée pour la production de ferments mixtes en continu car, elle permet d'une part, d'éviter les différents problèmes précédemment cités pour les cultures discontinues et continues en cellules libres et, d'autre part, de produire efficacement et de façon stable un ferment mixte grâce au relargage des cellules en croissance dans les micro-

colonies proches de la surface des billes.

III. 1.1. 2. Type de ferments lactiques

Les ferments lactiques sont généralement classés en deux groupes; les ferments mésophiles et thermophiles (**Tableau 3**). Ces derniers ont une température optimale de croissance variante de 37°C à 43°C et sont généralement formés des bactéries *St. thermophilus* et *Lactobacillus helveticus* ou *Lb. delbrueckii* (sous-espèces *bulgaricus* ou *lactis*) (**Hoier et al., 1999**).

Les ferments mésophiles sont majoritairement composés de lactocoques de sous-espèces variées, dont la température optimale de croissance est d'environ 30°C. Les sous-espèces *lactis* et *cremoris* sont essentiellement utilisées pour leur caractéristique d'acidification, alors que le biovar *diacetylactis* et les bactéries du genre *Leuconostoc* sont principalement utilisés pour leur capacité de métaboliser le citrate.

Ces ferments peuvent être produits de façon mixte, par combinaison prédéfinie de plusieurs microorganismes, ou en culture pure. De nombreux levains mixtes sont composés de deux types de bactéries, l'un étant responsable de la production d'acide et l'autre de la production d'arôme.

Les bactéries acidifiantes prédominantes sont généralement des souches de *S. cremoris*, parfois de *S. lactis*, tandis que les bactéries aromatiques sont des *leuconostocs* ou *S. lactis* subsp. *diacetylactis*. Cette dernière espèce exerce une double fonction puisqu'elle produit aussi de grandes quantités d'acide. On distingue trois types de levains dans l'industrie laitière; type O, qui ne contiennent qu'une flore acidifiante, formée de *L. lactis* ssp. *lactis* et *cremoris*; type D, auxquels sont ajoutés le biovar *diacetylactis*, et type DL, qui contiennent en plus de la flore acidifiante *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* et *L. lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* (**Champagne, 1998a**).

Tableau 3: Culture starters, microorganisme associés et leurs application en industrie laitière (Hui, 1992).

<i>Ferment lactiques</i>	<i>Micro-organismes associés</i>	<i>Produits</i>
Mésophiles	<i>S. lactic var diacetylactis</i>	Cheddar, Colby,
<i>Streptococcus lactis</i>	<i>Pennicillium camemberti</i>	Cottage, Camembert,
<i>S. thermophilus</i>	<i>P. roqueforti</i>	Brie, Roquefort,
<i>S. lactis var. diacetylactis</i>	<i>P. caseicolum</i>	gorgonzolla,
<i>Leuconostoc cremoris</i>	<i>Brevibacterium linens</i>	Limburger
Thermophiles	<i>Candida kefir</i>	Yaourt, Parmesan,
<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Torulopsis ssp</i>	Romano, Kéfir,
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Lb.brevis</i>	Culture lait
<i>Lb. lactis</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	thérapeutique,
<i>Lb. Casei</i>	<i>Propionibacterium</i>	Gruyère
<i>Lb. helveticus</i>	<i>fureudenreichii</i>	
<i>Lb.plantarum</i>	<i>P. shermanii</i>	
<i>Enterococcus faecium</i>		
Mix de starters		Cheddar modifié,
<i>S. lactis ; Streptococcus thermophilus</i>		Mozzarella italienne
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>		
<i>Lb. helveticus</i>		
<i>Enterococcus faecium</i>		

III. 1.1.3. Critères de sélection des ferments lactiques

La sélection des ferments lactiques s'appuie sur de nombreux critères afin de répondre à la fois aux spécifications demandées par l'utilisateur et aux contraintes imposées par le producteur. Ces critères relèvent éventuellement des fonctionnalités technologiques des souches, de leur performance et de leur sécurité. Ils diffèrent selon le type de produit désiré, les caractéristiques des matières premières à transformer et la technique appliquée (**Béal et al., 2008**).

- **Critères de sécurité**

Les bactéries susceptibles d'être produites et utilisées comme ferments lactiques ne doivent évidemment pas présenter de caractère pathogène et ne pas générer de substances toxiques. C'est le cas de la plupart des espèces de bactéries lactiques, qui possèdent le statut GRAS (*Generally Recognized As Safe*) à l'exception de certains entérocoques (**Ammor et al., 2006 ; Monnet et al., 2008**).

- **Critères de performance**

La sélection d'un ferment lactique doit prendre en compte des critères de performance des bactéries. Les bactéries devront répondre à certaines des spécificités suivantes (**Béal et al., 2008**) :

- ✓ - Résistance aux bactériophages et aux traitements mécaniques ;
- ✓ - Tolérance aux inhibiteurs de croissance (antibiotiques, chlorure de sodium, saccharose, l'acidité, l'éthanol et la température élevée) ;
- ✓ - Aptitude à la congélation ou à la lyophilisation et à la conservation ;
- ✓ - Comportement en présence d'oxygène ;
- ✓ - Croissance à des températures non optimales ;
- ✓ - Compatibilité avec d'autres souches ;
- ✓ - Facilité d'emploi.

- **Critères de la fonctionnalité technologique**

Les fonctionnalités technologiques des ferments lactiques relèvent les propriétés suivantes :

- ✓ **Activité acidifiante**

La fonction acidifiante constitue la propriété métabolique la plus recherchée des bactéries lactiques utilisées dans les industries alimentaires. Elle se manifeste par la

production de l'acide lactique à partir de la fermentation des hydrates de carbone au cours de la croissance bactérienne (**Mäyrä- Mäkinen et Bigret, 2004 ; Monnet et al., 2008**).

Les conséquences, d'ordre physico-chimique et microbiologique, peuvent se résumer ainsi par (**Béal et al., 2008**) :

- Accumulation d'acide lactique participant à la saveur des aliments fermentés ;
- Abaissement progressif du pH des milieux de culture et des matrices alimentaires ;
- Limitation des risques de développement des flores pathogène et d'altération dans les produits finaux ;
- Déstabilisation des micelles de caséine, coagulation des laits et participation à la synérèse.

Pour un ferment donné, il s'agit de permettre une vitesse d'acidification élevée et/ou d'atteindre un niveau d'acidité finale prédéfinie. Le niveau d'acidité dépend des spécifications du produit, lesquelles vont conditionner le choix des souches (**Monnet et al., 2008**).

✓ **Activité protéolytique**

La croissance jusqu'à des densités cellulaires permettant aux bactéries lactiques d'assurer les fonctions de fermentation repose sur un système protéolytique capable de satisfaire tous les besoins en acides aminés en hydrolysant les protéines. Les bactéries lactiques démontrent des potentialités différentes, liées à leur équipement enzymatique, pour l'utilisation de la fraction azotée. Les lactobacilles présentent généralement une activité protéolytique plus prononcée que les lactocoques (**Donkor et al., 2007 ; Monnet et al., 2008 ; Roudj et al., 2009**).

✓ **Activité lipolytique**

La lipase c'est une enzyme répandue chez les microorganismes tels que les levures, les champignons filamenteux et les bactéries. elle est joué un rôle important dans l'augment la concentration en acide gras libre des produits fermentés qui réduisent la durée de leur maturation sans améliorer leur saveur (**Zalacain et al., 1996**).

Les propriétés lipolytiques sont généralement faibles chez les bactéries lactiques, les lactocoques sont considérés comme plus lipolytiques que *Streptococcus thermophilus* et les lactobacilles. Elles peuvent cependant présenter un intérêt pour certaines applications fromagères (**Béal et al., 2008**).

✓ Production des arômes

Les bactéries lactiques sont capables de produire de nombreux composés aromatiques (tels que : l'a-acétolactate, l'acétaldéhyde, le diacétyl, l'acétoïne et 2,3-butanediol, l'éthanol, l'acétate, le formiate, ...etc.) principalement à partir du lactose, du citrate, des acides aminés et des matières grasses (Cholet, 2006). Souches de *Lactococcus lactis* sous-espèce *lactis biovariety diacetylactis* (*L. diacetylactis*), et quelques espèces appartenant à *Leuconostoc* et *Weissella* sont utilisées comme producteurs de diacétyl par l'industrie laitière. Ainsi, la plupart des connaissances de l'utilisation du citrate de LAB ont été dérivées de ces produits laitiers. En outre, dans fromages traditionnels les espèces d'*Enterococcus* contribuent à l'arôme en faisant fermenter le citrate. De plus, d'autres bactéries telles que *Lactobacillus plantarum* et *Oenococcus oeni* utilisent fréquemment du citrate présent dans les milieux de culture et produisent une fermentation secondaire dans le vin, la bière et les saucisses. Dans ces cas, une concentration élevée de diacétyl confère aux produits un goût de beurre délétère et affecte négativement la saveur du produit (Quintans *et al.*, 2008)

✓ Production des exo-polysaccharides

Plusieurs bactéries lactiques synthétisent des polysaccharides exocellulaires, qui comprennent à la fois des polysaccharides capsulaires et des boues EPS. Ce dernier peut être lié de manière lâche à la paroi cellulaire ou libérée dans les environnements extracellulaires (Palomo *et al.*, 2014 ; Ruiz-Rodriguez *et al.*, 2017).

La capacité des bactéries lactiques à synthétiser des exopolysaccharides (EPS) joue un rôle important pour la consistance et la rhéologie des produits transformés (Welman *et al.*, 2003 ; Ruas- Madiedo *et al.*, 2002). Ces composés polymères sont généralement considérés comme des agents épaississants naturels en industrie alimentaire. Les *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* produisant des EPS sont utilisés en tant que starters fonctionnels dans la fabrication des yaourts, ceci afin d'améliorer la texture, éviter la synérèse et augmenter la viscosité des produits finis (Durlu-Özkaya *et al.*, 2007 ; Amatayakul *et al.*, 2006).

✓ Production des substances antimicrobiennes

Les bactéries lactiques produisent une variété de composés antimicrobiens tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl et les bactériocines, qui sont utilisées dans la fermentation et la bioconservation des aliments (Labioui *et al.*, 2005).

a. Acides organiques (acide lactique et acide acétique)

LAB produit des acides organiques pendant la croissance; L'acide lactique et l'acide acétique sont deux des acides qui jouent un rôle important dans l'inhibition de la croissance des microorganismes (**Cabo et al., 2002**). Les LAB ont la capacité de produire de l'acide organique à partir d'hydrates de carbone grâce au processus appelé fermentation. Le système de fermentation de LAB est divisé en trois groupes basés sur la fermentation des hydrates de carbone dans des conditions illimitées; homofermentaires, hétérofermentaires et hétérofermentaires facultatives (**Hutkins, 2006**).

Pendant des millénaires, les gens ont utilisé la fermentation lactique, qui est un processus naturel pour préserver les aliments et les aliments pour animaux (**Wood, 1985 ; Campbell-Platt et Cook, 1995**). LAB transforme le sucre en acide lactique à travers le processus de fermentation dans des conditions anaérobies. L'acide lactique est un composé naturel, à faible pH, efficace et conservateur. La fermentation du sucre, suivie d'une réduction du pH à un niveau «sûr» de 4,5 ou moins (**Holzappel, 1997**) en raison de la production d'acides lactiques et autres acides organiques, est un facteur important pour l'inhibition de la croissance de micro-organismes indésirables. Le faible pH rend les acides organiques liposolubles, leur permettant de percer la membrane cellulaire et d'atteindre le cytoplasme des pathogènes en libérant des lipopolysaccharides (**Haller et al., 2001**). Comme les acides lactique et acétique sont tous deux lipophiles, ils peuvent diffuser rapidement dans la cellule et se dissocier au pH quasi neutre du cytoplasme en libérant des protons et des anions jusqu'à ce qu'un équilibre entre les concentrations externes et internes soit atteint. De cette manière, la croissance cellulaire peut être inhibée si l'accumulation de protons à l'intérieur du cytoplasme dépasse la capacité tampon de la cellule ou sa capacité à pomper des protons par des porteurs de H⁺ -ATPase (**Corsetti et al., 2015**).

b. Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Les LAB ont la capacité de produire du peroxyde d'hydrogène en présence d'oxygène lors de l'action de certaines enzymes comme le nicotinamide adénine hydroxyle di nucléotide oxydase (NAHD), la flavonoprotéine oxydase et le glycérophosphate oxydase (**Ross et al., 2002**). LAB ne produira pas de catalase pour l'élimination du peroxyde d'hydrogène.

Ito et al. (2003) ont montré que le filtrat sans cellule de *Lc. lactis subsp. lactis* AI 62 contenant 300-380 ppm de peroxyde d'hydrogène avait un fort effet bactéricide contre les pathogènes psychrotrophes d'origine alimentaire tel que les espèces *Listeria*, *Yersinia* et

Aeromonas, et des mésophile tels que *E. coli*. Le peroxyde d'hydrogène est bien étudié et le mode d'action par lequel il est l'un des oxydants les plus puissants est connu. L'oxygène destructeur dans le peroxyde d'hydrogène est connu comme un radical libre. Le peroxyde est composé de deux atomes d'oxygène, qui réagissent avec les structures des parois cellulaires bactériennes. L'activité antimicrobienne du peroxyde d'hydrogène est due à l'effet fortement oxydant sur les cellules bactériennes et à la destruction des structures moléculaires de base des protéines cellulaires (Magnusson, 2003).

c. Production de Dioxyde de carbone (CO₂)

Le CO₂ est produit par LAB hétérofermentaire. La quantité de CO₂ produite par LAB passera d'un LAB à l'autre (Strom, 2005). La synthèse du CO₂ et l'effet antimicrobien se produit dans des conditions anaérobies (Cleveland *et al.*, 2001). L'activité antimicrobienne de ce composé est due à sa capacité à remplacer l'oxygène moléculaire existant dans les produits alimentaires, créant des conditions anaérobies toxiques pour certains microorganismes alimentaires aérobies tels que les moisissures et les bactéries Gram négatives par son action sur les membranes des cellules microbiennes et sa capacité. Pour réduire le pH interne et externe (Caplice et Fitzgerald, 1999). De plus, l'activité antimicrobienne du CO₂ est due à l'inhibition de la décarboxylation enzymatique et à l'accumulation de CO₂ dans la bicouche lipidique membranaire, ce qui entraîne une fonction défectueuse de la perméabilité membranaire (Lindgren et Dobrogosz, 1990).

d. Production de Diacétyle

Le diacétyle est un composé aromatique (2,3-butanedione) produit par beaucoup de LAB à la suite du métabolisme du pyruvate et du citrate. Le diacétyle a une odeur de beurre. On le trouve dans la plupart des produits fermentés, en particulier les produits laitiers et les produits de la fermentation lactique. Diacétyle montre plus d'effet inhibiteur sur les bactéries Gram négatif, les champignons et les levures que les bactéries Gram-positives. Les LAB sont également très résistant au diacétyle (Jay, 1982 ; Cogan et Hill, 1993 ; De Vuyst et Vandamme, 1994 ; Magnusson, 2003). Helander *et al.*, 1997 ont rapporté que le diacétyle peut pénétrer dans la cellule d'une bactérie à Gram négatif à travers la protéine porine, sans modifier la perméabilité de la membrane externe. Le mode proposé pour l'action antimicrobienne repose sur la réaction entre le diacétyle et les protéines péri-plasmiques qui lient l'arginine, interférant ainsi avec le métabolisme d'un tel acide aminé. Le manque de protéines de liaison similaires et la possibilité d'utiliser un motif plus large d'acides aminés

confèrent aux bactéries Gram-positives une plus grande résistance à ce composé (Jay *et al.*, 2005). Les concentrations de diacétyl peuvent être présentes dans les aliments fermentés dans une gamme de 0,5-20 à 44,0-66,5 mg / kg dans les produits laitiers et de boulangerie, respectivement, comme indiqué par Escamilla *et al.*, 2000. Cependant, le diacétyl peut agir en synergie avec d'autres facteurs antimicrobiens et contribuer à des systèmes de conservation combinés dans les aliments fermentés (Jay, 1982).

e. Production des Bactériocines

Les bactériocines de LAB sont des peptides synthétisés par voie ribosomique ou des protéines ayant une activité bactéricide ou bactériostatique (De Vuyst et Vandamme, 1994 ; Chen et Hoover, 2006). Ces dernières années, les bactériocines LAB ont suscité un intérêt en raison de leur potentiel en tant que bio-conservateur sans danger. Les bactériocines LAB jouent un rôle important dans les industries alimentaires pour améliorer la qualité et accroître la sécurité et la durée de conservation des produits alimentaires (De Vuyst et Leroy, 2007). Les bactériocines LAB sont différents si on les compare aux antibiotiques comme suit (Tableau 3). Richard *et al.*, 2006 ont signalé la possibilité d'utiliser des bactériocines en tant qu'alternatives aux antibiotiques pour jouer un rôle important dans la conservation des aliments et également être utilisé pour des cas de traitement médical. Un autre facteur important à considérer sera les aspects économiques ou le coût de l'utilisation de la bactériocine dans les aliments. Une façon de réduire le coût consiste à déterminer les paramètres optimaux pour la production d'une bactériocine. Pour une utilisation économique dans les aliments, les bactériocines doivent être produites en grande quantité, de préférence en cultivant les souches dans des milieux contenant des ingrédients de qualité alimentaire (Ennahar *et al.*, 2000). LAB et leurs bactériocines ont un spectre inhibiteur contre les micro-organismes qui comprend la détérioration des aliments et les micro-organismes pathogènes (Schillinger *et al.*, 1996).

III. 1.2. Bactéries lactiques comme probiotique

Les différents produits commercialisés en tant que probiotiques humains ou animaux sont constitués soit d'un seul microorganisme (produits dits mono-souches) ou d'une association de plusieurs espèces (produits dits pluri-souches). De nos jours, les produits probiotiques sont commercialisés sous trois formes (**Patterson, 2008**) :

- Un concentré de culture ajouté à des aliments et boissons à base de produits laitiers, de fruits et de céréales ;
- Un ingrédient ajouté à un aliment à base de lait ou de soja et auquel on permet d'atteindre une concentration élevée par fermentation ;
- Des cellules séchées, concentrées, en poudre, en capsule ou en comprimés.

Les probiotiques sont généralement associés aux produits laitiers de culture. La gamme de produits probiotiques comprend maintenant des fromages, des crèmes glacées et des yogourts glacés de même que des aliments et des boissons non laitiers (**Patterson, 2008**).

Le terme probiotique a été introduit pour la première fois par **Lilly et Stillwell, 1965** pour décrire les substances produites par un microorganisme et stimulant la croissance d'autres microorganismes. En 1991, Fuller redéfinit les probiotiques comme étant des préparations microbiennes vivantes utilisées comme additifs alimentaires et qui ont une action bénéfique sur l'hôte en améliorant la digestion et l'hygiène intestinale (**Fuller, 1991**). Aujourd'hui, selon la définition adoptée par le groupe de travail mixte formé par l'Organisation des Nations Unies (ONU) pour l'agriculture et l'alimentation et l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS) (Rapport FAO/OMS, 2002), les probiotiques sont des « microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate, produisent un bénéfice pour la santé de l'hôte ». Ce sont des acteurs incontournables de développement et d'innovation dans les domaines des industries alimentaires et médicales. Ces microorganismes, généralement des bactéries, influencent la santé humaine et animale et protègent par exemple de certaines infections intestinales, participent à la digestion et influencent le système immunitaire. Leur consommation régulière permet de contribuer à l'action des 600 espèces bactériennes (représentant environ 1014 bactéries) présentes dans l'intestin humain.

Les principaux microorganismes probiotiques connus à ce jour sont des bactéries *Escherichia coli* et Entérocoques, quelques bactéries lactiques (**Tableau 4**) et des levures (*Saccharomyces boulardii*) (**Hozalpfel et al., 1998 ; Ouwehand et al., 2002 ; Marteau et Seksik, 2005**).

Tableau 4 : Les bactéries lactiques considérés comme probiotiques (Hozalpfel *et al.*, 1998 ; Marteau et Seksik, 2005).

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Autres bactéries lactiques
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>L. salivarius</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Lactococcus</i>
<i>L. helveticus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>lactis</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>L. lactis</i>	<i>B. breve</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>L. amylovirus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>
<i>L. brevis</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Streptococcus thermophilis</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus diacetylactis</i>
<i>L. cellubios</i>	<i>B. thermophilum</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>
<i>L. crispatus</i>		<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. curvatus</i>		
<i>L. bulgaricus</i>		
<i>L. farciminis</i>		
<i>L. fermentum</i>		
<i>L. gallinarum</i>		
<i>L. gasseri</i>		
<i>L. johnsonii</i>		
<i>L. paracasei</i>		
<i>L. plantarum</i>		
<i>L. reuteri</i>		
<i>L. rhamnosus</i>		

III. 1.2.1. Critères de sélection des micro-organismes probiotiques

Avant de pouvoir être commercialisé, un produit contenant un micro-organisme probiotique doit satisfaire à des critères scientifiques, réglementaires et économiques. Ainsi, la souche probiotique doit bénéficier d'un dossier scientifique valide résumant ses aptitudes, être conforme à la réglementation en vigueur pour garantir la sécurité du consommateur, et pouvoir être produite à large échelle au meilleur coût.

Tout d'abord, pour qu'un produit, contenant un ou plusieurs micro-organisme(s) probiotique(s), puisse être commercialisé, il doit respecter les critères de recommandation des autorités compétentes. En 2002, la FAO et l'OMS ont établi les lignes directrices à suivre pour commercialiser un produit contenant des probiotiques. La sélection de souches probiotiques peut donc être divisée en quatre catégories distinctes :

- ✓ Bénéfice santé
- ✓ Innocuité
- ✓ Production industrielle
- ✓ Résistance aux stress du tractus gastro-intestinal

La première caractéristique d'une souche probiotique est d'avoir un effet bénéfique sur la santé de l'hôte. Pour bénéficier d'une allégation santé, une bactérie doit être parfaitement identifiée et caractérisée. Elle doit avoir le statut « Generally regarded as safe » (GRAS) et être déposé dans une collection internationale. Depuis 2007, l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) a adopté l'approche « Qualified Presumption of Safety » (QPS) pour l'évaluation des risques potentiels à l'utilisation de micro-organismes (EFSA, 2007; Sanders *et al.*, 2010) et a durci les conditions d'acceptation des demandes d'allégations santé. Dans un rapport de 2009, l'EFSA a estimé que les allégations utilisées pour les produits probiotiques déjà sur le marché manquaient de preuves scientifiques (étude clinique) et/ou que les souches n'étaient pas assez caractérisées.

La caractérisation concerne l'innocuité (résistance aux antibiotiques, production de toxines), la fonctionnalité (activité métabolique, adhésion) et la capacité de résistance aux perturbations du tractus. Ainsi, pour être probiotique, la bactérie doit être sensible aux antibiotiques et résistante aux stress gastro-intestinaux. La souche doit enfin faire l'objet d'études *in vivo* chez l'animal puis chez l'homme (Jankovic *et al.*, 2010)

Une souche probiotique doit donc répondre aux critères réglementaires ainsi qu'aux critères de production industrielle avant d'être commercialisée. Les directives concernent également la qualité et la quantité des bactéries ingérées. Ainsi, les micro-organismes doivent être consommés vivants et la dose a été fixée autour de 10^9 UFC/g. Aucune quantité précise de bactéries probiotiques n'est nécessaire pour assurer un effet bénéfique. La quantité efficace, pour une souche donnée et un effet donné, est la quantité qui a pu démontrer ses effets en étude clinique. Cependant, il a déjà été démontré que l'effet des souches était dépendant de la dose de bactérie (**Ghadimi et al., 2008**). Si le tractus gastro-intestinal de l'être humain où d'autres écosystèmes représentent des sources importantes de potentiels probiotiques, très peu de souches ont un effet sur la santé, sont cultivables facilement et répondent aux critères réglementaires.

III. 1.2.3. Mécanismes d'action des micro-organismes probiotiques

Les effets des micro-organismes probiotiques varient selon les souches et résultent généralement de mécanismes complexes, souvent non totalement élucidés. Ces effets sont dus, soit à la présence de la souche, soit à une interaction avec la flore autochtone/le système immunitaire. Il est généralement admis que les probiotiques contribuent à l'homéostasie intestinale par quatre grands modes d'action :

- ✓ Amélioration des fonctions digestives
- ✓ Exclusion ou inhibition des pathogènes
- ✓ Renforcement de la fonction barrière de l'intestin
- ✓ Modulation du système immunitaire

Concernant le premier point, la présence de la souche bénéfique va permettre la digestion de nutriments (**Fuller, 1991**) ou la production de vitamine. De plus, la colonisation de la muqueuse associée à une rémanence de quelques heures à quelques semaines va avoir pour conséquence une évolution transitoire de la composition et/ou de la fonctionnalité de la flore.

La sécrétion d'antimicrobiens (peroxyde d'hydrogène, acides organiques, bactériocines, antibiotiques), la diminution du pH luminal ou encore l'inhibition par compétition limitent l'adhésion d'autres bactéries aux cellules épithéliales (**Ingrassia et al., 2005; Ouwehand et al., 2002**). De plus, certaines souches sont capables d'interagir avec les cellules hôtes pour modifier la production de défensives, induire la sécrétion de mucus, augmenter la production d'IgA ou inhiber la translocation bactérienne (**Corthésy et al., 2007**). Ces effets favorisent le renforcement de la fonction barrière. Enfin, les probiotiques peuvent moduler la réponse

immunitaire de l'hôte au niveau local et au niveau systémique en induisant la synthèse de cytokines pro/anti-inflammatoire.

Ces échanges entre procaryotes et cellules eucaryotes se font à travers la production de métabolites (Sokol *et al.*, 2008) ou par contact direct (Lebeer *et al.*, 2010). Ainsi, les interactions avec l'hôte ont lieu dans le tractus, au niveau des cellules dendritiques, des cellules épithéliales ou des plaques de Peyer (Figure 3). Les cellules de l'hôte expriment des récepteurs particuliers, les Pattern Recognition Receptor (PRR), qui vont pouvoir reconnaître des motifs bactériens spécifiques. Parmi ces PRR, les récepteurs toll-like (TLRs), qui sont des protéines transmembranaires présentes à la surface ou sur les organites cellulaires, sont les mieux caractérisés (Kumar *et al.*, 2009).

L'interaction motif bactérien-TLR induit alors une cascade de signaux intracellulaires conduisant à la translocation nucléaire de facteurs de transcription et à la libération de cytokines. Les structures bactériennes à l'origine de l'effet probiotique ne sont pas totalement caractérisées. Cependant, il semble que le peptidoglycane, les acides teichoïques, les pili, les polysaccharides et l'acide désoxyribonucléique (ADN) bactérien (Klinman *et al.*, 1996) soient fortement associés à la reconnaissance (Grangette *et al.*, 2005; Lebeer *et al.*, 2012; Lebeer *et al.*, 2010).

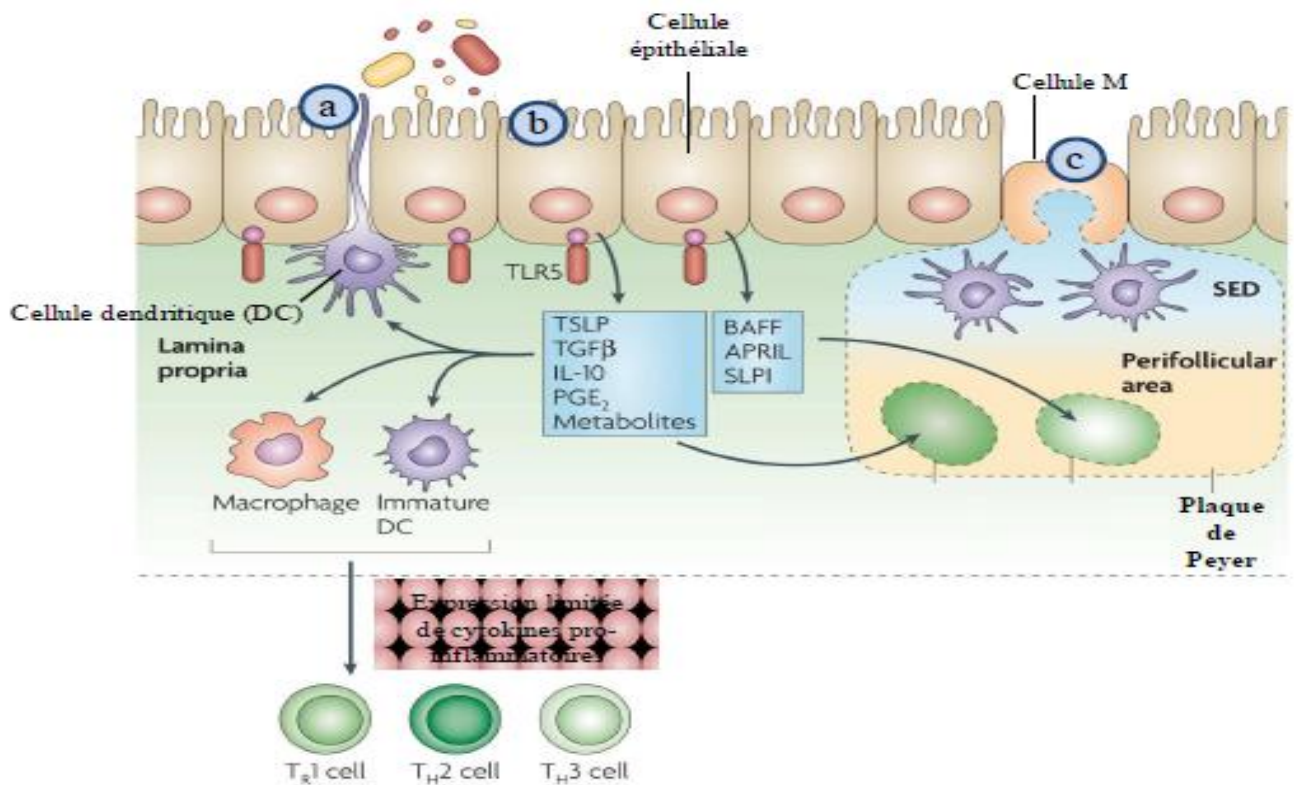


Figure 3 : Interactions bactéries - cellules hôtes (Artis, 2008).

III. 1.3. Bio-conservateur

Les bactéries lactiques sont les bactéries les plus intéressantes pour la biopréservation. De nombreuses études ont montré leur potentiel dans toutes sortes de produits alimentaires. Certaines bactéries lactiques peuvent se développer rapidement dans les produits réfrigérés et emballés sous vide ou sous atmosphère modifiée. Certaines souches produisent des composés antimicrobiens (acides organiques, peroxyde d'hydrogène, diacétyl et bactériocines) et elles sont généralement reconnues sans risque dans l'alimentation (**Stiles, 1996 et Guinane et al., 2005**).

III. 1.3.1. Bactériocines

Les bactériocines LAB ont plusieurs caractères importants qui les transforment en une substance appropriée à utiliser comme conservateur alimentaire: nature protéique, faible poids moléculaire, non-toxicité pour les aliments testés en laboratoire et une activité létale importante contre les bactéries Gram-positives et les bactéries à Gram négatif, qui comprennent diverses bactéries pathogènes telles que *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Salmonella sp.*, et *Staphylococcus aureus*. Récemment, les bactériocines sont devenues d'un grand intérêt pour les fabricants d'aliments qui les utilisent en tant que conservateurs biologiques dans les produits alimentaires en général et dans les aliments périssables en particulier (**Parada et al., 2007**).

III. 1.3.2. Classification des bactériocines

Selon **Klaenhammer, 1993** les bactériocines peuvent être divisées en quatre classes. La classe I des lantibiotiques, représentée par la nisine, regroupe des peptides thermostables de très faible poids moléculaire (<5 kDa) caractérisé par la présence de lanthionines et de dérivés. La classe II est composée de petits peptides thermostables (<10 kDa) divisés en trois sous-classes: IIa (pédicocine et enterocine), IIb (lactocine G) et IIc (lactocine B). La classe III est représentée par des peptides thermolabiles de poids moléculaire élevé (> 30 kDa) tels que l'helvéticine J, tandis que dans la classe IV, on peut trouver de grands peptides complexes avec des hydrates de carbone ou des lipides. Cependant, Cleveland, Montville, Nés et Chikindas (2001) estiment que ces structures sont des artefacts de purification partielle et pas une nouvelle classe de bactériocines.

Hill et Ross, 2005 ont suggéré une nouvelle classification où les bactériocines sont divisées en deux catégories: les lantibiotiques (classe I) et ne contenant pas de lantibiotiques

de lanthionine (classe II), tandis que les peptides thermolabiles de poids moléculaire élevé, qui sont formellement des composants de ce qui précède classe III, seraient désignés séparément comme "bactériolysines". Ces auteurs ont également suggéré que la classe IV ci-dessus devrait être éteinte. Enfin, **Drider et al., 2006** ont divisé les bactériocines en trois grandes classes en fonction de leurs caractéristiques génétiques et biochimiques, et nous allons nous référer à une telle classification dans ce qui suit.

A. Classe I ou lantibiotiques

Les lantibiotiques sont de petits peptides (19e38 résidus d'acides aminés) avec des acides aminés thermostables rares dans leur composition, ce qui peut résulter de la combinaison de deux alanines liées par une liaison disulfure comme pour la lanthionine, ou à partir d'un acide aminobutyrique lié à une alanine par un disulfure en liaison avec le b-méthyl-lanthionine (**Jarvis et al., 1968**).

Le principal représentant de cette classe est la nisine, produite par certaines souches de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* et se compose de 34 résidus d'acides aminés. Deux variantes de la nisine sont la nisine A et la nisine Z, qui diffèrent structurellement dans un seul acide aminé, mais ont une activité similaire (**Mulders et al., 1991**). En raison de la nature acide de sa molécule, la nisine est complètement stable en solution à pH 2,0 et peut-être stockée pendant une longue période dans la plage de températures de 2-7 ° C, alors que l'inactivation supérieure à pH 7,0 se produit même à température ambiante (**Delves-Broughton, 1990**).

B. Classe II

Cette classe est composée de petits peptides thermostables (<10 kDa) avec une structure hélicoïdale amphiphile qui permet leur insertion dans la membrane cytoplasmique de la cellule cible, favorisant ainsi la dépolarisation de la membrane et la mort cellulaire. Trois subdivisions sont proposées pour cette classe, selon (**Drider et al., 2006**).

La majorité des bactériocines produites par les LAB associées aux aliments appartiennent aux classes I et II (**Lowe et Arendt, 2012**).

a- Sous-classe IIa

La sous-classe IIa est composée de bactériocines présentant une spécificité élevée contre *L. monocytogenes*. Ses représentants ont 37 - 48 résidus d'acides aminés avec une partie N-terminale avec une configuration en feuilles plissée et une terminaison C contenant une ou deux à-hélice (**Fimland et al., 2005**). Les bactériocines de cette classe tombent dans la

membrane cellulaire du microorganisme cible par l'extrémité C, favorisant la formation de pores et la dissipation consécutive de la force motrice du proton (**Kaiser & Montville, 1996**). Dans le tenté de maintenir ou de restaurer la force motrice du proton, il y a une accélération de la consommation d'ATP et par conséquent de la mort cellulaire.

La pédiocine PA-1, composée de 44 résidus d'acides aminés, est la seule bactériocine appartenant à la sous-classe IIa qui est synthétisée non seulement par différentes espèces, mais aussi par différents genres de LAB. Il a d'abord été détecté dans *Pediococcus acidilactici* (**Bhunja et al., 1987**). Depuis lors, d'autres souches et des espèces de pediococci ont été décrites comme des producteurs de pédicocine (**Díez et al., 2012**). **Ennahar et al., 1996** a isolé une souche de *L. plantarum* dans le fromage Munster capable pour produire de la pédiocine AcH, une bactériocine ayant un effet antagoniste sur les microorganismes pathogènes et détériorés, y compris *L. monocytogenes*, *S. aureus* et *Clostridium perfringens* (**Bhunja et al., 1987; Loessner et al., 2003**).

Le premier enterocin a été identifié par **Kjems, 1955** et a ensuite été classé comme membre de la famille des pédiatres. Depuis lors, plusieurs enterocins ont été décrits, qui a des représentants dans plus d'une classe de bactériocines. Habituellement, ils sont thermostables (121 ° C / 15 min) et résistent à la lyophilisation et au stockage à -20 ° C pendant de longues périodes. Selon (**Cintas et al., 1997**), ces composés ont une activité antimicrobienne sélective, ne présentent pas d'antagonisme avec *Leuconostoc* et *Lactococcus*, mais attaquent *C. perfringens*, *Clostridium botulinum*, *S. aureus* et surtout des espèces du genre *Listeria*.

b- Sous-classe IIB

Cette sous-classe comprend des bactériocines hétérodimères, c'est-à-dire des bactériocines nécessitant l'activité combinée de deux peptides. Normalement, les gènes sont situés dans le même opéron et exprimés simultanément, et les deux peptides agissent en combinaison montrant fréquemment une action synergique importante. Leur mécanisme d'action implique également la dissipation du potentiel de membrane et une diminution de la concentration ATP intracellulaire. Ces peptides ont une très faible activité lorsqu'ils sont employés individuellement (**Garneau et al., 2002**).

c- Sous-classe IIC

Les bactériocines appartenant à cette sous-classe ont une liaison covalente entre les terminaux C et N, ce qui entraîne une structure cyclique (**Kawai et al., 2004**). Enterocin AS-48, circularin A et reuterin 6 sont des représentants de cette sous-classe.

C. Classe III

Cette classe regroupe de grandes bactériocines thermolabiles (> 30 kDa) qui ont une activité complexe et une structure protéinique. Leur mécanisme d'action est différent de celui d'autres bactériocines, en ce sens qu'ils favorisent la lyse de la paroi cellulaire du microorganisme cible. Leur partie terminale N est homologue à une endopeptidase impliquée dans la synthèse de la paroi cellulaire, tandis que la partie C-terminale est responsable de reconnaissance de la cellule cible (**Lai et al., 2002**).

II. 4.1.3.3. Biosynthèse et immunité des bactériocines

Les bactériocines ont un mécanisme biosynthétique relativement plus simple car ce sont des métabolites primaires (codés par des gènes et synthétisés par le ribosome). Les gènes codants pour la bactériocine sont souvent associés à des éléments transférables tels que des transposons conjugatifs ou des plasmides (**Klaenhammer, 1993 ; Riley et Wertz, 2002**). Les gènes liés à la biosynthèse des bactériocines sont généralement regroupés avec le mécanisme génétique minimal constitué du gène structural et des gènes de l'immunité apparentée (**Klaenhammer, 1993**). Les bactériocines sont synthétisées en tant que peptides précurseurs biologiquement inactifs qui contiennent les peptides leaders N-terminaux attachés au pro-peptide C-terminaux. Ceux-ci subiraient alors des processus enzymatiques (souvent appelés maturation bactériocine) pour donner les bactériocines actives «matures» (**Diep et Nes, 2002 ; Riley et Wertz, 2002**). Le peptide leader sert de site de reconnaissance pour les enzymes biosynthétiques impliquées dans le processus de maturation et son transport vers l'espace extracellulaire, protège la souche productrice de l'activité inhibitrice de la bactériocine en maintenant la bactériocine inactive (précurseure et interagit avec le domaine propeptidique du peptide précurseur pour assurer une conformation appropriée essentielle pour l'interaction enzyme-substrat (peptide précurseur et enzyme (s) biosynthétique (s)) (**Klaenhammer, 1993 ; der Meer et al., 1994 ; van Belkum et al., 1997 ; Oman et van der Donk, 2009**).

Les souches productrices de bactériocines doivent se protéger de l'action, l'effet toxique de leur propre bactériocine (**Deegan et al., 2006**). Cela se produit par la production de protéines immunitaires spécifiques. Les gènes codants pour les protéines d'immunité sont

III. 1.3.4. Mécanismes de destruction des bactériocine

Les bactériocines sont connues pour leur très forte activité contre leurs souches cibles. En général, l'activité de la bactériocine est limitée aux souches étroitement apparentées à la souche productrice de bactériocine (bioactivité à spectre étroit) bien que, récemment, de nombreuses bactériocines aient montré une activité antimicrobienne contre un large éventail de genres (bioactivité à spectre large). Le mécanisme de destruction des bactériocines est spécifique à chaque groupe de bactériocines. De plus, la nature cationique générale des bactériocines joue un rôle très important dans leur interaction initiale avec la membrane cellulaire de leurs souches cibles. La charge négative des membranes cellulaires bactériennes et la charge positive des molécules de bactériocine créent une interaction électrostatique entre elles, facilitant ainsi l'approche des molécules vers les membranes. Cependant, cette interaction n'est pas responsable de la destruction des cellules bactériennes cibles. Cette interaction est également responsable de l'inactivité de la plupart des bactériocines vis-à-vis des souches bactériennes à Gram négatif. La composition de la membrane bactérienne Gram-négative diffère de celle de la membrane bactérienne Gram-positif en ce que la première contient une membrane externe de lipopolysaccharide. Les bactériocines de LAB ne deviennent actives contre les bactéries à Gram négatif que lorsqu'elles sont combinées avec d'autres agents qui compromettent l'intégrité de la membrane externe, comme les surfactants (**Stevens *et al.*, 1991 ; Zhang et Mustapha, 1999**). Comme mentionné ci-dessus, le mode d'action des bactériocines est différent entre les classes. Pour appliquer leur mécanisme de destruction, les bactériocines ont besoin d'une molécule réceptrice ou d'une molécule d'amarrage présente dans leur membrane cellulaire bactérienne cible, qui diffère entre différentes classes et sous-classes.

III. 1.3.4.1. Bactériocines de classe I (lantibiotiques)

Les lantibiotiques, comme la nisine, ont deux mécanismes de destruction connus, bien que les deux systèmes partagent un dénominateur commun (**Breukink *et al.*, 1999 ; Wiedemann *et al.*, 2001 ; Hsu *et al.*, 2004**). Il a été montré depuis longtemps que la nisine lantibiotique perturbe l'intégrité de la membrane cellulaire bactérienne en formant des pores qui conduiraient à la dissipation du potentiel membranaire et à l'efflux de petits métabolites tels que les ions, acides aminés, nucléotides et autres solutés cytoplasmiques, résultant à la fin de tous les processus de biosynthèse, conduisant à la mort cellulaire (**Ruhr et Sahl, 1985 ; Sahl *et al.*, 1987**). Nisin est extrêmement puissant contre ses souches bactériennes cibles, montrant une activité antimicrobienne même à une concentration nanomolaire à un chiffre. À des

concentrations plus faibles, il a été démontré que la nisine tue les bactéries ciblent en inhibant l'enzyme. Il a été montré que la molécule de nisine se lie au lipide II, qui est le transporteur principal des sous-unités peptidoglycanes du cytoplasme à la paroi cellulaire (**Figure 5**). Le peptidoglycane est le composant principal de la paroi cellulaire bactérienne. La liaison de la nisine au lipide II entraîne la prévention de la synthèse de la paroi cellulaire appropriée, provoquant ainsi la mort cellulaire. En outre, à des concentrations plus élevées, le complexe de la molécule nisine-lipide II initie l'insertion de la membrane qui crée des pores dans la membrane cellulaire bactérienne. Ainsi, la liaison de la nisine au lipide II facilite son double mode d'action préventif impliquant la synthèse de la paroi cellulaire et la formation de pores de la membrane (**Breukink *et al.*, 1999, Wiedemann *et al.*, 2001**)

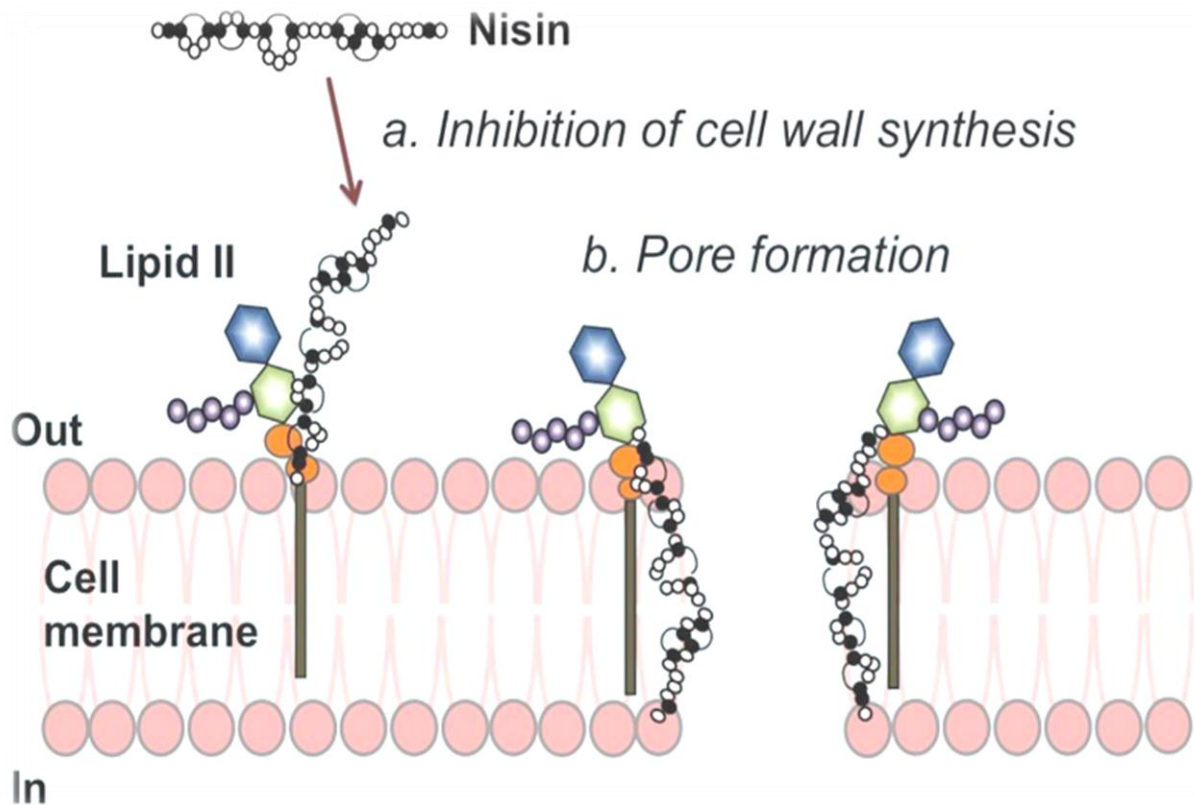


Figure 5 : Mécanisme de destruction des bactériocines de la nisine classe I (**Wiedemann *et al.*, 2001**)

III. 1.3.4.2. Bactériocines de classe II (non-lantibiotiques)

Les non-lantibiotiques sont les bactériocines les plus courantes. La plupart des membres des bactériocines de classe II exercent leur action antimicrobienne en induisant une perméabilisation membranaire qui conduit ensuite à la fuite de molécules cytoplasmiques, provoquant la mort cellulaire des bactéries cibles. Les mécanismes de l'action antimicrobienne des bactériocines de classe II diffèrent entre les sous-classes (**Perez et al., 2014**).

Bactériocines de classe IIa (bactériocines du type pédiocine)

Les membres des bactériocines de classe IIa sont connus pour leur forte activité contre *L. monocytogenes*, une bactérie d'origine alimentaire hautement pathogène et robuste. Il a été démontré que les bactériocines de classe II se lient aux protéines du système mannose phosphotransférase (Man-PTS), le système d'absorption du sucre des bactéries cibles, en tant que molécule d'amarrage pour leur mécanisme de destruction. La séquence d'acides aminés YGNGV conservée à la région N-terminale des bactériocines de classe IIa est responsable de l'activité antimicrobienne anti-listeriale, tandis que le domaine C-terminal moins conservé est responsable de leur activité antimicrobienne contre d'autres souches cibles (**Johnsen et al., 2005**).

Bactériocines de classe IIb (bactériocines à deux peptides)

Les bactériocines à deux peptides nécessitent l'activité synergique des deux peptides pour promouvoir leur activité de destruction contre leurs bactéries cibles. Ces peptides présentent une activité de bactériocine très faible, voire nulle, lorsqu'ils sont testés individuellement. Ainsi, les deux peptides de bactériocines de classe IIb devraient être considérés comme une unité antimicrobienne au lieu de deux peptides antimicrobiens indépendants qui montrent une activité synergique (**Oppegard et al., 2007**). Les membres des bactériocines de classe IIb peuvent être classés en deux types: les peptides du type E (amélioré) et du type S (synergique) (**Garneau et al., 2002**). Les mécanismes de destruction des bactériocines de classe IIb impliquent la perméabilisation membranaire de leurs souches bactériennes cibles, ce qui entraîne la fuite de petites molécules cytoplasmiques telles que les cations monovalents Na⁺, K⁺, Li⁺, Cs⁺, Rb⁺, mais pas de cations divalents tels que Mg²⁺ ou phosphates (**Oppegard et al., 2007**). Les pores de la membrane formés à la suite de bactériocines de classe IIb sont relativement plus petits que ceux des lantibiotiques.

Bactériocines de classe IIc (bactériocines circulaires)

Par rapport aux autres classes de bactériocines, les bactériocines circulaires présentent un spectre d'activité antimicrobienne plus large vis-à-vis de diverses bactéries à Gram positif, y compris de nombreuses bactéries pathogènes d'origine alimentaire et pathogènes. Les bactériocines circulaires sont bactéricides envers leurs cellules bactériennes cibles. Comme de nombreuses autres bactériocines, les bactériocines circulaires appliquent leur mécanisme de destruction à leurs bactéries cible par perméation de la membrane cellulaire bactérienne, entraînant la fuite d'ions, la dissipation du potentiel membranaire et finalement la mort cellulaire (**Gabrielsen et al., 2014**). Des études sur le mode d'action de l'entéroïne AS-48, de la gasséricine A, de la subtilosine A et de la carnocycline A ont suggéré que les bactériocines circulaires ne nécessitent pas de molécule réceptrice pour leur activité. On a pensé que les résidus d'acides aminés basiques des bactériocines circulaires qui se fixent à la surface de leur structure globulaire compacte hydrophobe étaient responsables de l'interaction électrostatique entre la bactériocine et la membrane de surface de la cellule cible (**van Belkum et al., 2011**). Cependant, une étude ultérieure sur la garvicine ML, un nouveau membre des bactériocines circulaires, a suggéré que la garvicine ML à un double mode d'action comme dans le cas de la nisine A. Outre le mécanisme de destruction des interactions électrostatiques non récepteur, un maltose ABC- la protéine de transport sert de récepteur ciblé de la garvicine ML, ce qui facilite l'efflux de solutés intracellulaires qui mène éventuellement à la mort cellulaire (**Gabrielsen et al., 2012**).

Bactériocines de classe IIId (bactériocines diverses)

Les mécanismes de destruction des bactériocines linéaires et sans plomb à un peptide non-pédiocine sont encore mal compris. Contrairement aux autres classes où les bactériocines du même groupe partagent un mécanisme similaire d'action antimicrobienne, les lantibiotiques utilisent le lipide II alors que les bactériocines du type pédiocine utilisent respectivement le Man-PTS comme molécules réceptrices. Les bactériocines de classe IIId ne partagent pas système commun pour leurs mécanismes de mise à mort. Ceci est principalement dû à la diversité fondamentale de leurs structures primaires (**Iwatani et al., 2011**). D'autre part, le mécanisme de destruction unique de la lacticine Q, une bactériocine sans plomb, a été bien caractérisé (**Yoneyama et al., 2009b**). Alors que la plupart des bactériocines nécessitent une molécule d'accueil pour leur action antimicrobienne, le lipide II pour la nisine A et d'autres lantibiotiques, et le transporteur de mannose ABC, MptD, pour la pédiocine PA-

1 / AcH et ses homologues bactériocines, la lacticine Q la perméabilisation membranaire de souches cibles sans besoin de récepteurs spécifique (**Yoneyama *et al.*, 2009a**). La Lacticine Q forme un énorme pore toroïdal (HTP) d'environ 4,6 à 6,6 nm, suffisamment pour provoquer une fuite de composants intracellulaires tels que les ions et l'ATP ainsi que de grosses molécules telles que les protéines, provoquant ainsi la mort cellulaire. Il a été montré que le mécanisme de formation de HTP commence par l'interaction électrostatique des molécules de lacticine Q cationiques et des membranes chargées négativement. La liaison rapide de la lacticine Q aux membranes des bicouches de phospholipides entraîne la formation de HTP couplées à une bascule lipidique. Les composants intracellulaires s'échappent alors de ces pores, conduisant à la mort cellulaire. Les pores formés dans la membrane ont une durée de vie courte parce que ces HTP se referment lorsque la masse moléculaire de la lacticine Q se déplace de la membrane cellulaire externe vers la membrane interne (**Yoneyama *et al.*, 2009b**). Cependant, le mécanisme de destruction par la formation de HTP de la lacticine Q est sélectif et fortement dépendant des caractéristiques physiologiques de la membrane externe des cellules ciblées, ce qui explique la non-toxicité de la lacticine Q contre les bactéries Gram négatives. En outre, très récemment, il a été suggéré qu'un autre mécanisme est responsable de l'activité antimicrobienne sélective de la lacticine Q, soit l'accumulation de radicaux hydroxyles par réaction de Fenton, avec des variations au sein des espèces et même dans certaines souches. Il a été déduit que la toxicité sélective de la lacticine Q dépendrait de la capacité des souches à piéger les radicaux hydroxyles (**Li *et al.*, 2013**).

III. 2. Application dans secteur médical

III. 2.1. Pouvoir antioxydant

Un antioxydant est une molécule assez stable pour faire don d'un électron à un radical libre rampant et le neutraliser, réduisant ainsi sa capacité à l'endommager. Ces antioxydants retardent ou inhibent les dommages cellulaires principalement grâce à leurs propriétés de piégeage des radicaux libres (Halliwell, 1995). Ces antioxydants de bas poids moléculaire peuvent interagir en toute sécurité avec les radicaux libres et mettre fin à la réaction en chaîne avant que les molécules vitales ne soient endommagées. Certains de ces antioxydants, y compris le glutathion, l'ubiquinol et l'acide urique, sont produits au cours du métabolisme normal dans le corps (Shi *et al.*, 1999). D'autres antioxydants plus légers sont présents dans l'alimentation. Bien qu'il existe plusieurs enzymes dans le corps qui piègent les radicaux libres, les principaux antioxydants (vitamines) sont la vitamine E (α -tocophérol), la vitamine C (acide ascorbique) et le B-carotène (Levine *et al.*, 1991). Le corps ne peut pas fabriquer ces micronutriments, ils doivent donc être fournis dans l'alimentation.

III. 2.1.1. Stress oxydant et maladies humaines

Le stress oxydatif, résultant d'un déséquilibre entre la production de radicaux libres et les défenses antioxydantes, est associé à des dommages à un large éventail d'espèces moléculaires, y compris les lipides, les protéines et les acides nucléiques (Mc Cord, 2000). Le stress oxydatif à court terme peut survenir dans les tissus lésés par un traumatisme, une infection, une blessure due à la chaleur, l'hypertoxie, des toxines et un exercice excessif. Ces tissus blessés produisent des enzymes génératrices radicalaires (par exemple xanthine oxydase, lipogénase, cyclo-oxygénase) activant les phagocytes, libérant du fer libre, des ions cuivreux, ou une perturbation des chaînes de transport d'électrons de la phosphorylation oxydative, produisant un excès de ROS. L'initiation, la promotion et la progression du cancer, ainsi que les effets secondaires de la radiothérapie et de la chimiothérapie, ont été liés au déséquilibre entre les ROS et le système de défense antioxydant. Les ROS ont été impliqués dans l'induction et les complications du diabète sucré, de la maladie oculaire liée à l'âge et des maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson (Rao *et al.*, 2006).

Un rôle du stress oxydatif a été postulé dans de nombreuses conditions, y compris l'athérosclérose, l'inflammation, certains cancers et le processus de vieillissement. On pense maintenant que le stress oxydatif contribue significativement à toutes les maladies inflammatoires (arthrite, vascularite, glomérulonéphrite, lupus érythémateux, syndrome respiratoire adulte), aux

maladies ischémiques (maladies cardiaques, accident vasculaire cérébral, ischémie intestinale), hémochromatose, syndrome d'immunodéficience acquise, emphysème, la transplantation d'organes, les ulcères gastriques, l'hypertension et la prééclampsie, les troubles neurologiques (maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson, dystrophie musculaire), l'alcoolisme, les maladies liées au tabagisme et bien d'autres (Stefanis *et al.*, 1997). Un excès de stress oxydatif peut conduire à l'oxydation des lipides et des protéines, ce qui est associé à des changements dans leur structure et leurs fonctions.

III. 2.1.2. Radicaux libres

Un radical libre peut être défini comme toute espèce moléculaire capable d'existence indépendante qui contient un électron non apparié dans une orbitale atomique. La présence d'un électron non apparié entraîne certaines propriétés communes partagées par la plupart des radicaux. Beaucoup de radicaux sont instables et très réactifs. Ils peuvent soit donner un électron soit accepter un électron d'autres molécules, donc se comporter comme des oxydants ou des réducteurs (Cheeseman & Slater, 1993). Les radicaux libres oxygénés les plus importants dans de nombreux états pathologiques sont le radical hydroxyle, le radical anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, le singulet d'oxygène, l'hypochlorite, le radical oxyde nitrique et la radicale peroxydinitrite. Ce sont des espèces très réactives, capables dans le noyau, et dans les membranes des cellules de molécules biologiquement pertinentes dommageables telles que l'ADN, les protéines, les hydrates de carbone et les lipides (Young & Woodside, 2001). Les radicaux libres attaquent les macromolécules importantes entraînant des dommages cellulaires et une perturbation homéostatique. Les cibles des radicaux libres comprennent toutes sortes de molécules dans le corps. Parmi eux, les lipides, les acides nucléiques et les protéines sont les principales cibles.

Les radicaux libres en biologie

On s'attend à ce que les réactions des radicaux libres produisent des changements défavorables progressifs qui s'accumulent avec l'âge dans tout le corps. De tels changements «normaux» avec l'âge sont relativement communs à tous. Cependant, sur ce modèle commun se superposent des motifs influencés par la génétique et les différences environnementales qui modulent les dommages causés par les radicaux libres. Ceux-ci se manifestent comme des maladies à certains âges déterminés par des facteurs génétiques et environnementaux. Le cancer et l'athérosclérose, deux causes majeures de décès, sont des maladies «radicalaires»

saillantes. L'initiation et la promotion du cancer sont associées à des anomalies chromosomiques et à l'activation des oncogènes. Il est possible que des réactions radicalaires endogènes, comme celles initiées par les rayonnements ionisants, puissent entraîner la formation de tumeurs. La corrélation hautement significative entre la consommation de graisses et d'huiles et les taux de mortalité dus à la leucémie et aux néoplasies malins du sein, des ovaires et du rectum chez les personnes de plus de 55 ans peut refléter une plus grande peroxydation lipidique (**Lea, 1966**). Des études sur l'athérosclérose révèlent la probabilité que la maladie puisse être due à des réactions radicalaires impliquant des lipides dérivés de l'alimentation dans la paroi artérielle et le sérum pour produire des peroxydes et d'autres substances. Ces composés induisent une lésion des cellules endothéliales et produisent des changements dans les parois artérielles (**Harman, 1992**).

Production de radicaux libres dans le corps humain

Les radicaux libres et autres ROS proviennent soit de processus métaboliques essentiels normaux dans le corps humain, soit de sources externes telles que l'exposition aux rayons X, à l'ozone, au tabagisme, aux polluants atmosphériques et aux produits chimiques industriels (**Bagchi & Puri, 1998**). La formation de radicaux libres se produit continuellement dans les cellules en conséquence de réactions à la fois enzymatiques et non enzymatiques. Les réactions enzymatiques, qui servent de source de radicaux libres, comprennent celles qui sont impliquées dans la chaîne respiratoire, dans la phagocytose, dans la synthèse des prostaglandines et dans le système du cytochrome P-450 (**Liu et al., 1999**). Des radicaux libres peuvent également se former dans des réactions non enzymatiques de l'oxygène avec des composés organiques ainsi que celles initiées par des réactions ionisantes.

• Certaines sources de radicaux libres générées en interne sont (**Ebadi, 2001**).

- ✓ Mitochondrie
- ✓ Xanthine oxydase
- ✓ Peroxysomes
- ✓ Inflammation
- ✓ Phagocytose
- ✓ Voies d'arachidonate
- ✓ Exercice physique
- ✓ Ischémie / lésion de reperfusion

• Certaines sources externes de radicaux libres sont:

- ✓ Fumée de cigarette
- ✓ Polluants environnementaux
- ✓ Radiation
- ✓ Certains médicaments, pesticides
- ✓ Solvants industriels
- ✓ Ozone

III. 2.1.4. Mécanisme d'action des antioxydants

Deux principaux mécanismes d'action ont été proposés pour les antioxydants (**Rice-Evans & Diplock, 1993**). Le premier est un mécanisme de rupture de chaîne par lequel l'antioxydant primaire donne un électron au radical libre présent dans les systèmes. Le deuxième mécanisme implique l'élimination des initiateurs d'espèces ROS / réactifs azotés (antioxydants secondaires) en désactivant le catalyseur d'initiation de chaîne. Les antioxydants peuvent exercer leur effet sur les systèmes biologiques par différents mécanismes, y compris le don d'électrons, la chélation des ions métalliques, les co-antioxydants, ou par la régulation de l'expression des gènes (**Krinsky, 1992**).

Les antioxydants agissant dans les systèmes de défense agissent à différents niveaux tels que la prévention, l'élimination radicale, la réparation et de novo, et la quatrième ligne de défense, c'est-à-dire l'adaptation.

- La première ligne de défense est les antioxydants préventifs, qui suppriment la formation de radicaux libres. Bien que le mécanisme et le site précis de la formation de radicaux *in vivo* ne soient pas encore bien élucidés, les décompositions induites par les métaux des hydroperoxydes et du peroxyde d'hydrogène doivent être l'une des sources importantes. Pour supprimer de telles réactions, certains antioxydants réduisent préalablement les hydroperoxydes et le peroxyde d'hydrogène en alcools et en eau, respectivement, sans générer de radicaux libres et certaines protéines séquestrent les ions métalliques.

Le glutathion peroxydase, la glutathione-s-transférase, l'hydroperoxyde de phospholipide glutathion peroxydase (PHGPX) et la peroxydase sont connus pour décomposer les hydroperoxydes lipidiques en alcools correspondants. PHGPX est unique en ce sens qu'il permet de réduire les hydroperoxydes de phospholipides intégrés dans les biomembranes. Le glutathion peroxydase et la catalase réduisent le peroxyde d'hydrogène en eau.

- La deuxième ligne de défense est les antioxydants qui piègent les radicaux actifs pour supprimer l'initiation de la chaîne et / ou rompre les réactions de propagation de la chaîne. Divers antioxydants endogènes de piégeage des radicaux sont connus : certains sont hydrophiles et d'autres sont lipophiles. La vitamine C, l'acide urique, la bilirubine, l'albumine et les thiols sont des antioxydants hydrophiles qui éliminent les radicaux, tandis que la vitamine E et l'ubiquinol sont des antioxydants lipophiles qui éliminent les radicaux. La vitamine E est acceptée comme l'antioxydant lipophile le plus puissant contre les radicaux libres.

- La troisième ligne de défense est la réparation et les antioxydants de novo. Les enzymes protéolytiques, les protéases, les protéases et les peptidases, présentes dans le cytosol et dans les mitochondries des cellules de mammifères, reconnaissent, dégradent et éliminent les protéines modifiées par oxydation et empêchent l'accumulation de protéines oxydées.

Les systèmes de réparation de l'ADN jouent également un rôle important dans le système de défense total contre les dommages oxydatifs. Divers types d'enzymes tels que les glycosylases et les nucléases, qui réparent l'ADN endommagé, sont connus.

- La quatrième ligne de défense est une fonction importante appelée adaptation où le signal pour la production et les réactions des radicaux libres induits la formation et le transport de l'antioxydant approprié vers le bon site (Niki, 1993).

III. 2.1.4. Les exemples des bactéries lactiques antioxydants

Truusalu et al., 2004 ont testé la capacité probiotique de *Lactobacillus* spp. (Avec un potentiel antimicrobien et antioxydant élevé dans des tests *in vitro*) pour concurrencer l'infection invasive de *Salmonella enterica* sérovar *Typhimurium* et protéger la muqueuse intestinale contre un stress oxydatif excessif pendant une lésion tissulaire inflammatoire dans un modèle de souris. L'étude a conclu que l'administration de *Lactobacilli* probiotiques d'origine humaine n'augmente pas la résistance à la colonisation contre *S. typhimurium* dans l'intestin de la souris, mais démontre la capacité des *Lactobacilles* probiotiques spécifiques à réduire les niveaux de pro-oxydants et les indices de stress oxydatif.

Jaina et al., 2009 ont étudiés trois souches de bactéries lactiques (LAB) *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* et *Lactococcus lactis* dans le lait fermenté pour des activités d'assimilation des antioxydants et du cholestérol *in vitro* et *in vivo* en les introduisant dans l'intestin des souris avec un régime complété par du lait fermenté. Les trois souches

sélectionnées présentaient un 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl, du malonaldehyde ont capacités de piégeage des radicaux peroxydent d'hydrogène ainsi que l'inhibition de l'activité de peroxydation de l'acide linoléique. Ces activités étaient les plus élevées chez *L. casei*, suivies de *L. acidophilus* et *L. lactis*. Ces résultats indiquent que les souches LAB sélectionnées ont de bonnes activités d'élimination des antioxydants, de l'hypocholestérolémie et des coliformes.

Klayraung et Okonogi, 2009 isolent des souches de *Lactobacillus fermentum* souches de miang (sortes de feuilles de thé fermentées traditionnelles, largement consommées la Thaïlande comme collation) et a étudié leurs activités antibactériennes et antioxydantes.

L'activité antioxydante a été étudiée au moyen du piégeage des radicaux libres et réduction ferriques des dosages de puissance. L'étude sur les antioxydants a suggéré que *L. fermentum* FTL2311 et *L. fermentum* FTLIOBR pourraient libérer certaines substances d'activité antioxydante

Zhang et al., 2011 ont évalué l'effet antioxydant des cellules intactes et extrait sans cellules de *Lactobacillus casei* subsp. *casei* SY13 et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LJJ, isolé du yogourt traditionnel. Les résultats ont montré que deux souches de *Lactobacillus* avaient une bonne capacité antioxydante inhibant la peroxydation de l'acide linoléique de 62,95% et 66,16%. La cellule libre l'extrait a montré un excellent anion superoxyde de piégeage et des radicaux hydroxyles activité. Les cellules intactes sur le radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH) la capacité de piégeage et la capacité d'ions ferreux chélatants étaient supérieures aux cellules sans cellules extrait.

Amaretti et al., 2013 ont analysées *in vitro* l'activité antioxydante des trente-quatre souches de bactéries lactiques (7 *Bifidobacterium*, 11 *Lactobacillus*, 6 *Lactococcus* et 10 *Streptococcus thermophilus*). La souche *Lactobacillus brevis* DSMZ 23034 présentaient la plus haute capacité antioxydant dans les lactobacilles et les bifidobactéries.

III.2.2. Bcteries lactiques comme anti-biofilm

III. 2.2.1. Biofilm

Le biofilm est une communauté structurée de micro-organismes, se fixant à une surface inerte ou vivante et réuni au sein d'une matrice d'exo-polysaccharides adhésif et protecteur qu'ils sécrètent. C'est une structure vivante en perpétuel remaniement. Il constitue le mode de vie majoritairement des micro-organismes, par opposition à l'état planctonique libre et isolé dans l'environnement (**Costerton *et al.*, 1999 ; Espinasse *et al.*, 2010**). Un biofilm peut être constitué d'une ou plusieurs espèces de micro-organismes (**Behlau et Gilmore, 2008**).

III. 2.2.1.1. Localisation de biofilm

Les communautés microbiennes peuvent se développer sur une grande variété de surface, incluant les tissus vivants, les dispositifs médicaux, les canalisations des systèmes d'eau potable ou industrielle, ou sur tous autres supports retrouvés dans le sol ou dans les milieux aquatiques (**Donlan, 2002**).

a) Biofilm dans environnement et industrie

La croissance des microorganismes sous forme de biofilms prédomine tous les systèmes aquatiques faisant partie des écosystèmes naturels (**Costerton *et al.*, 1995**). A plus large échelle, les biofilms sont nécessaires à la survie des bactéries sur la planète et la continuité de la chaîne alimentaire (**Burin des Rozières *et al.*, 2002**). Les biofilms posent des problèmes dans de nombreux secteurs industriels. Dans l'industrie pétrolière par exemple, la colonisation des systèmes d'injection d'eau peut entraîner une acidification du pétrole qui devient alors inutilisable. La formation de biofilms sur les coques des navires, appelée phénomène de « biofouling », conduit à une augmentation des forces de friction, une diminution de la vitesse des bateaux et des surcoûts énergétiques considérables (**Agnès *et al.*, 2006**).

Les biofilms formés sur les parois des réseaux d'eau chaude et de conditionnement d'air sont le lieu privilégié d'accumulation d'espèces pathogènes (*Legionella*, amibes...) qui peuvent ensuite contaminer l'environnement, ils sont responsables des dégradations des installations immergées, de la formation de bio salissure, de risques de corrosion accrus, de la contamination des équipements en agroalimentaire et des réseaux de distribution d'eau (**Géraldine *et al.*, 2010**).

Toutefois, les biofilms peuvent être bénéfiques. C'est le cas lorsqu'ils sont utilisés dans les réacteurs de bioconversion appelés aussi réacteurs à bactéries fixées ou lorsqu'ils interviennent dans certains procédés de fermentation, de filtration et d'épuration (**Burin des Roziers et al., 2002**)

b) Biofilm sur dispositifs médicaux

Les biofilms ont la capacité de se développer sur divers instruments médicaux tels que les sondes urinaires, les cathéters veineux et les tubes endotrachéaux. La colonisation de dispositifs médicaux par des microorganismes est un événement fréquent, potentiellement à l'origine de la survenue ultérieure de pathologies infectieuses. Ces microorganismes proviennent essentiellement des flores des patients ou de leur environnement, et sont associés dans un certain nombre de cas à des épisodes infectieux (**Bakini et al., 2014**). La **figure 6** montre l'ensemble des infections liées aux biofilms ainsi que celles associées aux dispositifs médicaux. Les cathéters veineux centraux (CVC) sont de plus en plus utilisés dans les pratiques médicales. Cependant, l'incidence de colonisation sur cathéter (environ 13 %), le taux de bactériémie (environ 3 %) et le taux de septicémie (environ 4,4 %) ne sont pas négligeables. Ces infections, associées à une morbidité et une mortalité accrue, augmentent la durée et les coûts d'hospitalisation. La colonisation microbienne du cathéter se faisant par voie endoluminale ou extraluminale (**Bougel et al., 2003**).

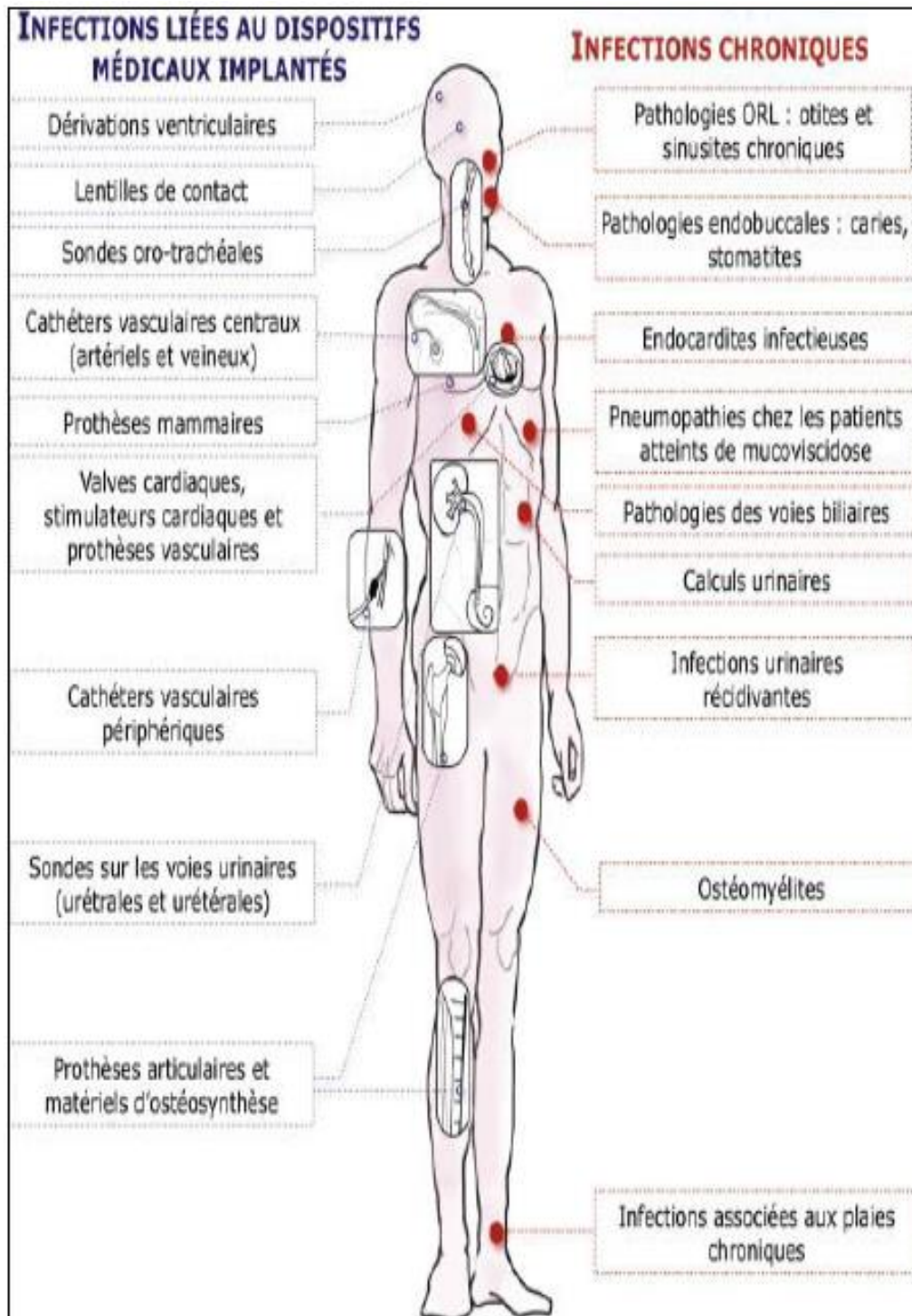


Figure 6. Principales infections associées aux biofilms (David *et al.*, 2012).

II. 2.2.1.2. Processus de formation du biofilm

On distingue cinq étapes dans le mécanisme de formation des biofilms. Tout d'abord, les bactéries interagissent avec un substrat et s'y fixent de façon réversible par des interactions non spécifiques de type liaison hydrogène ou liaison de Van der Waals : on parle d'adhérence (**Van Houdt, 2005**). Puis les bactéries se fixent de façon irréversible et spécifique au substrat grâce à des molécules d'adhésion comme par exemple les pili, et synthétisent une matrice d'exopolysaccharides : il s'agit de la phase d'adhésion et de maturation du biofilm. Puis, sous l'effet de facteurs environnementaux, des bactéries vont se détacher du biofilm, et se disperser sous forme planctonique dans le milieu environnant : on parle d'essaimage du biofilm (**Clutterbuck, 2007**).

A. L'adhérence réversible

Dans un premier temps, les cellules bactériennes sous forme planctonique vont venir s'associer à une surface biotique ou abiotique par l'intermédiaire du transport passif (ex : Sédimentation) ou alors de transport actif en faisant notamment intervenir des structures particulières de la surface de la bactérie telle que : flagelles chez *Pseudomonas aeruginosa*, et PNAG ou PIA qui présente la molécule d'adhésion la plus importante chez les staphylocoques (**Goetz et al., 2016**). En outre, dans le cas de *B.cereus*, il a été montré que les flagelles ont aussi un rôle important dans l'initiation du biofilm dans des conditions statiques à l'interface air-liquide (**Houry et al., 2010**). Il s'ensuivra une adhésion réversible correspondant à un attachement faible des cellules bactériennes à la surface déclenchée, lorsque les microorganismes arrivent sur le support à une certaine distance, et faisant intervenir des forces non covalentes ou des interactions faibles de type forces de Van der Waals et liaisons électrostatiques (**Bos et al., 1999 ; Akbas, 2015 ; Goetz et al., 2016**).

B. L'adhérence irréversible

L'adhésion correspond à une fixation active et spécifique des micro-organismes sur une surface. Les structures d'adhésion varient selon les types de micro-organismes concernés. Pour les bactéries Gram négatives, il s'agit des pili, des curlus, des capsules et du glycocalix. Pour les bactéries Gram positives, ce sont les acides teichoïques, l'acide mycolique, la capsule et le glycocalix. D'autres bactéries vivantes presque uniquement fixées (comme par exemple *Caulobacter* ou *Hyphomicrobium*) utilisent des structures spécifiques comme le pédoncule ou la gaine (**Van Houdt, 2005**). Ces molécules d'adhésion permettent d'établir des contacts

cellule- surface et des contacts cellule-cellule (**Lemon *et al.*, 2008**). Chez certaines souches de streptocoques, des protéines exprimées à la surface des bactéries, entre autres la protéine Bap, favorisent les contacts entre cellules et contribuent à la synthèse de la matrice extracellulaire (**Lasa, 2006**).

C. Le développement précoce du biofilm

Les bactéries se multiplient lentement et continuent de produire des exopolysaccharides. Elles s'agrègent entre elles et forment des microcolonies, qui sont protégées par la matrice exopolysaccharidique.

D. La maturation du biofilm

L'architecture complexe du biofilm se met en place avec la formation des canaux aqueux et des pores entre les microcolonies, permettant l'acheminement d'oxygène et de nutriments nécessaires à la croissance des micro-organismes, ainsi que l'élimination des déchets (**Filloux & Vallet, 2003; Tenke *et al.*, 2006**). La production et la sécrétion d'enzymes ou de toxines provoquent la dégradation des tissus environnants de l'hôte et permet ainsi la libération de nutriments (**Jacobsen *et al.*, 2008**). Un biofilm est approximativement constitué de 85 % de matrice extracellulaire et de 15 % de micro-organismes (**Behlau & Gilmore, 2008**). La matrice extracellulaire est principalement constituée d'eau (97 %) et incluent également des polymères d'exopolysaccharides, des protéines, des acides nucléiques, des phospholipides, des nutriments et des métabolites (**Beloin *et al.*, 2008**).

E. Le détachement de bactéries

Comme pour les autres étapes, le détachement des bactéries est un processus complexe qui implique des signaux environnementaux et une communication entre les bactéries, notamment par le quorum sensing. Lorsque la densité bactérienne sur une surface devient très élevée, des bactéries se détachent du biofilm et se dispersent dans le milieu environnant après un retour à l'état planctonique. Traditionnellement, le détachement de bactéries est considéré comme un phénomène passif, dépendant notamment des forces du flux du milieu dans lequel le biofilm se trouve. Cependant, le détachement de bactéries peut aussi être une stratégie active, initiée par les bactéries elles-mêmes, leur permettant de coloniser de nouvelles surfaces et de survivre lorsque l'espace et les nutriments deviennent limités. Les bactéries peuvent se détacher seules ou par petits ou gros amas ou fragments selon les mécanismes

impliqués (**Kaplan, 2010**). Ainsi, un biofilm établi constitue un réservoir de bactéries viables, capables d'aller coloniser d'autres surfaces.

III. 2.2.2. Les approches anti-biofilms

L'impact des infections cliniques et le problème de l'industrie agro-alimentaire liés aux biofilms a contribué au développement de très nombreuses études. Près de vingt années de recherche fondamentale sur la formation et les fonctions des biofilms bactériens ont permis de dégager plusieurs axes originaux exploitables pour le développement, à plus long terme, de moyens de lutte contre les biofilms bactériens.

Il existe différentes stratégies permettant d'empêcher la formation des biofilms et/ou d'éliminer des biofilms déjà formés.

✓ **Inhiber l'adhérence initiale**

L'objectif de cette approche est d'empêcher la formation du biofilm en inhibant l'adhérence initiale et en maintenant les bactéries dans un état isolé et sensible au système immunitaire et aux antibiotiques (**Sing et al., 2002**). Ce blocage des étapes précoces du développement du biofilm peut s'effectuer soit en ciblant l'interaction entre les adhésines bactériennes et leur substrat, soit en bloquant la biogenèse des structures d'adhérence elle-même (**Korea et al., 2011**). La principale limite de cette approche correspond à la multiplicité des structures impliquées dans le phénomène d'adhérence. Bien que le recours à des inhibiteurs multivalents fixés sur un échafaudage de glycopolymères ou de glyconanoparticules permette de cibler plusieurs adhésines en même temps, il est encore difficile d'envisager l'émergence d'une solution antiadhérence universelle (**Korea et al., 2011**).

✓ **Brouiller les communications et limiter la maturation du biofilm**

Dans cette approche, il s'agit d'empêcher la maturation du biofilm en interférant avec les signaux de communication intra ou interbactériens. Une approche proposée pour lutter contre les biofilms formés par *P. aeruginosa* repose sur l'inhibition du quorum-sensing en utilisant des analogues structuraux des homosérine lactones, comme les furanones, qui réduisent le biofilm de *P. aeruginosa*, in vitro et in vivo (**Hentzer & Givskov, 2003 ; Landini et al., 2010**).

✓ **Disperser le biofilm**

De nombreux facteurs environnementaux et bactériens ont été impliqués dans la dispersion du biofilm, qui libère des bactéries à nouveau sensibles au système immunitaire et aux antibiotiques (Davies, 2003 ; Lewis, 2007). Différentes approches ont été proposées pour disperser les biofilms infectieux comme l'utilisation d'enzymes capables de dissocier les polymères composant la matrice extracellulaire du biofilm (Fey, 2010 ; Fleming & Wingender, 2010) ou l'utilisation de petites molécules comme le monoxyde d'azote (NO), l'acide cis-2-decenoid ou les acides aminés dextrogyres (Davies, 2009). Bien que cette approche soit particulièrement adaptée aux biofilms développés en contexte industriel (Fleming & Wingender, 2010), elle entraîne cependant la libération d'un grand nombre de bactéries à partir du site contaminé, induisant un risque de forte réponse inflammatoire et d'infection systémique aiguë (O'Toole, 2004 ; Boles, 2008 ; Kolodkin-Gal *et al.*, 2010).

✓ **Diminuer la tolérance du biofilm**

Outre le crible de chimiothèques menant à l'identification de composés antibiotiques spécifiquement actifs contre les cellules persistantes (dont l'efficacité reste à évaluer *in vivo*) (Kim *et al.*, 2011), une équipe américaine vient de montrer que des sucres (mannitol, fructose) exerçaient un effet adjuvant en association à des antibiotiques. Ces sucres augmentaient l'entrée d'aminosides dans des bactéries persistantes, entraînant une plus grande mortalité bactérienne *in vitro* et dans un modèle *in vivo* d'infection liée à un biofilm d'*E. coli* sur matériel implanté (Allison *et al.*, 2011).

✓ **Bactéries lactiques comme une approche innovante**

Les difficultés d'éradication des bactéries sous forme de biofilms nécessitent la mise au point de nouvelles stratégies innovantes (Miquel *et al.*, 2016). Il a été montré récemment que certaines bactéries produisent naturellement des molécules à activité anti-biofilm, capables d'interférer avec la constitution, voire de décimer des biofilms (Rendueles and Ghigo, 2015). Elles sont aussi bien décrites chez des bactéries pathogènes que chez des bactéries aux « propriétés bénéfiques sur la santé de l'hôte » c'est-à-dire les probiotiques (Vuotto *et al.*, 2014).

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques aux milieux de culture pour entraver l'adhérence cellulaire initiale et la formation de biofilm de certaines sensibles bactéries (da Silva et De Martinis, 2013) et en utilisant de telles protéines ou le probiotique se soulever

pour lutter contre les biofilms dans l'industrie alimentaire est une ambition plausible (**Woo et Ahn, 2013**)

Les bactéries lactiques du genre *Lactobacillus*, bénéficient du statut GRAS (Generally recognized as safe), et sont pour la plupart associées à des effets bénéfiques sur l'hôte.

Les biosurfactants synthétisés par *Lactobacillus* avaient une activité d'inhibition sur la formation de biofilms pour *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella arizonae* et *Listeria monocytogenus* (**Fracchia et al., 2010**). **Ali, 2012** a démontré que le biosurfactant isolé de *L. acidophilus* inhibe la formation de *Proteus mirabilis* par le biofilm. **Salman et Alimer, 2014** ont montré que le biosurfactant purifié partiel isolé de *L. rhamnosus* présentait une activité antibiofilmique contre les bactéries responsables d'une infection urinaire.

L'analyse de l'activité anti-biofilm de 140 surnageants de souches de *Lactobacillus* vis-à-vis de *Klebsiella pneumoniae*, pathogène majeur associé aux infections liées à des biofilms, a permis de sélectionner une souche, *Lactobacillus plantarum* CIRM653, au fort potentiel anti-biofilm (**Lagrafeuille et al., 2016**). Cependant, la description d'une activité anti-biofilm in vitro ne serait pas synonyme d'une réduction in vivo de la colonisation de surfaces biotiques (modèle murin de colonisation intestinale), mais à une plus grande capacité de dissémination. Ces observations démontrent l'importance d'une expertise précise des mécanismes d'action anti-biofilm mis en jeu. L'implication de lectines à la fois dans l'activité anti-biofilm et dans la spécificité du tropisme cellulaire épithélial a récemment été décrite (**Petrova et al., 2016a, 2016b**). Ainsi, une connaissance fondamentale des interactions bactéries/bactéries et bactéries/hôte permettra une utilisation des bactéries bénéfiques d'un point de vue prophylactique et curatif vis-à-vis des biofilms tout en maîtrisant le ratio bénéfice- risque de leur utilisation.

Matériel et méthodes

Rapport-Gratuit.com

1. Échantillonnage

L'échantillon du lait cru de chèvre et de chamelle prélevés provient de différentes régions de l'Algérie. Le **Tableau 5** représente les caractéristiques des chamelles et des chèvres dont on a prélevé le lait.

Le prélèvement a été effectué dans des conditions stériles. Le lait est traité manuellement après lavage des mamelles (pis), directement dans des flacons stériles. Les échantillons ont été transportés dans une boîte isotherme et conservés à 4°C jusqu'à leurs utilisation.

Tableau 5: Caractéristiques des chamelles et des chèvres dont on a prélevé le lait.

	Région	Age	Couleur	Période de colleté
Ech1	Oran (Messrighin)	5 ans	Marron clair	Février 2015
Ech2	Nâama	7 ans	Marron	Mars 2015
Ech3	El Bayadh	7 ans	Jaunâtre	Mars 2015
Ech4	Ouargla	5 ans	Marron	Mars 2015
Ech5 (chèvre)	Relizane	9 mois	Noir	Mars 2016
Ech6 (chèvre)	El Bayadh (El kheiter)	11 mois	Noir et gris	2013

2. Isolement et purification des bactéries lactiques

A partir de chaque échantillon 1ml du lait a été pris, nous avons réalisé des dilutions décimales de 10^{-1} jusqu'à 10^{-7} dans l'eau physiologie. 1ml des trois dernières dilutions (10^{-5} , 10^{-6} et 10^{-7}) ont été ensemencées en profondeur dans les milieux MRS acidifié, MRS additionnée 30 μ g/ml de Vancomycine, MSE et MRS acidifié. Les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 24 à 72 heures.

La purification des colonies isolées consiste à réaliser des repiquages successifs sur bouillon et gélose MRS jusqu'à l'obtention des colonies de même taille et même forme renseignant sur la pureté des souches.

3. Conservation des isolats

3. 1. Conservation de courte durée

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

3. 2. Conservation de longue durée

La conservation de longue durée était réalisée à -20°C sur milieu MRS liquides additionnés de glycérol à 20% (V/V)

4. Identification phénotypique et génotypique des isolats

4. 1. Identification phénotypique

L'identification phénotypique était basée sur les critères morphologiques, physiologiques et biochimiques. Elles consistent à soumettre les isolats aux tests suivants:

4. 1.1. Critères morphologiques

A. Caractérisation macroscopique:

En se basant sur l'observation à l'œil nu déterminer l'aspect, la taille, la forme, et la couleur des colonies des cultures bactériennes obtenues sur gélose MRS.

B. Caractérisation microscopique:

L'examen microscopique a été effectuée après coloration de Gram, à partir de culture jeune de 24h, Elle permet de décrire la forme des cellules, leur mode d'association

4. 1.2. Critères physiologiques et biochimiques

4. 1.2.1. Croissance à différentes conditions

a) Croissance à différentes températures et thermorésistances

Ce test est important car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles et les bactéries lactiques thermophiles. Après inoculation du bouillon MRS par les cultures pures, les tubes sont incubés pendant 24h à 72h aux températures 15°C et 45°C, au bout de ce délai, la croissance est appréciée par examen des milieux.

Le test de la thermorésistance a été effectué au bain-marie après l'inoculation des souches à 63.5°C pendant 30 minutes après refroidissement brusque, elles sont incubées à 30°C pendant 48 à 72h. Un résultat positif se traduit par un trouble (**Rouisset et Bensoltane, 2006**).

b) Croissance à différents pH

L'habilité des bactéries à croître dans milieu hyperalcalin est testé sur le bouillon MRS à pH 4.8, 6.5 et 9.6 pendant 2 à 3 jours. Après le temps d'incubation, l'observation d'un trouble signifie que la bactérie a pu résister dans ces conditions (**Saidi, 1997**).

c) Croissance à différentes concentrations de NaCl

La croissance en présence de différentes concentrations de chlorure de sodium (NaCl) donne des renseignements précieux pour l'identification. Les cultures à tester ont étéensemencées sur des bouillons hypersalés à 4% et à 6.5% de NaCl. Après une incubation à 30°C pendant 24 à 72h. La croissance de ces bactéries se manifeste par un trouble du milieu (**Guiraud et Galzy, 1980**).

a) 1.3. Tests biochimiques

a) Type fermentaire

Ce test permet de différencier les bactéries lactiques homofermentaires de celles hétérofermentaires. Il consiste à mettre en évidence la production de gaz (CO₂). Ce test a été réalisé dans un tube contenant le bouillon MRS (sans extrait de viande) et une cloche de Durham a inoculée avec la souche à étudier. Après une incubation à 30°C pendant 24 à 48h, la présence du gaz dans la cloche indique un métabolisme hétérofermentaire (**Hariri et al., 2009**).

b) Hydrolyse de l'arginine

La recherche de cette enzyme est intéressante pour la caractérisation des bactéries lactiques. Pour réaliser ce test, le milieu M16 BCP a été ensemencé par les cultures jeunes de 18h et incubé à 30°C pendant 24h à 48h (**Thomas, 1973**).

Les bactéries lactiques qui utilisent le lactose acidifient le milieu en donnant ainsi une coloration jaunâtre sur la gélose. 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.

c) Utilisation du citrate

Sur milieu KMK additionné d'une solution de ferricyanure de potassium et une solution de citrate ferrique, les bactéries lactiques ont été ensemencées et incubées à 30°C pendant 24 à 48h. La fermentation du citrate se traduit par l'apparition des colonies bleues. Les colonies incapables de fermenter le citrate apparaissent blanches (**Kempler et Mc Kay, 1980**).

d) Etude de profil fermentaire

La fermentation des carbohydrates a été menée sur le milieu MRSBCP-EV sans extrait de viande, sans sucre et additionné au pourpre de bromocrésol (BCP) comme indicateur de pH (**Badis et al., 2005**). La source de carbone est représentée par des sucres suivants : Arabinose, Sucrose, Sorbitol, Maltose, Tréhalose, Xylose et Rhamnose.

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 1 ml du milieu (MRSBCP-EV) additionné à la solution de sucre déjà préparée et 0.1 ml de la solution bactérienne (**Guessas et Kihal, 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 récentrifuger aux mêmes conditions pour se débarrasser des restes du milieu de culture et pour obtenir un culot cellulaire pure. A ce culot 0,2 ml de milieu de MRSBCP-EV est additionnée pour former cette solution. On ajoute 0.5ml d'huile de paraffine pour créer les conditions d'anaérobiose. Les résultats sont lus après 24 et 48 heures d'incubation (**Guessas, 2006**).

4. 2. Identification géotypique

4. 2.1. Identification par séquençage de l'ARNr 16S

L'ADN a été extrait de cultures bactériennes en utilisant le kit de microlyse (Labogen, Rho, Italie) en suivant les instructions du fabricant (**Figure 7**)

Le séquençage de l'ARNr 16S basé sur la PCR a été réalisé avec l'amorce universelle P8F (5'-AGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et P8R (5'-GGACTACCAGGTATCTAAT-3') (**McCabe et al., 1995**). La PCR a été réalisée dans un volume total de 25 µl contenant 2X Master Mix, 0,5 µM de chaque amorce et 50-100 ng d'ADN. Le programme d'amplification consistait en une étape de dénaturation initiale à 94 ° C pendant 7 minutes suivies de 30 cycles à 94 ° C pendant 1 minute, 55 ° C pendant 1 minute et 72 ° C pendant 1 minute; extension finale à 72 ° C pendant 15 minutes. Les produits de PCR amplifiés ont été visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5%. Les produits de PCR ont été purifiés selon les instructions de fournitures :

- Ajouter un volume égal de solution de liaison membranaire à la réaction PCR (ADN amplifié).
- Transférer le produit de PCR préparé à l'assemblage de la Minicolumn puis incubé à température ambiante pendant 1 minute et centrifuger à 16.000 × g pendant 1 minute
- Ajouter 700µl de solution de lavage de membrane et centrifuger pendant 1 minute
- Répéter le lavage avec 500 µl de solution de membrane et centrifuger pendant 5 minutes.
- Transférer la Minicolumn dans un tube d'éppendorf propre de 1,5 ml
- Ajouter 50µl d'eau sans nucléase à la Minicolumn et centrifuger pendant 1 minute
- Jeter la Minicolumn et stocker l'ADN à 4 ° C ou -20 ° C.

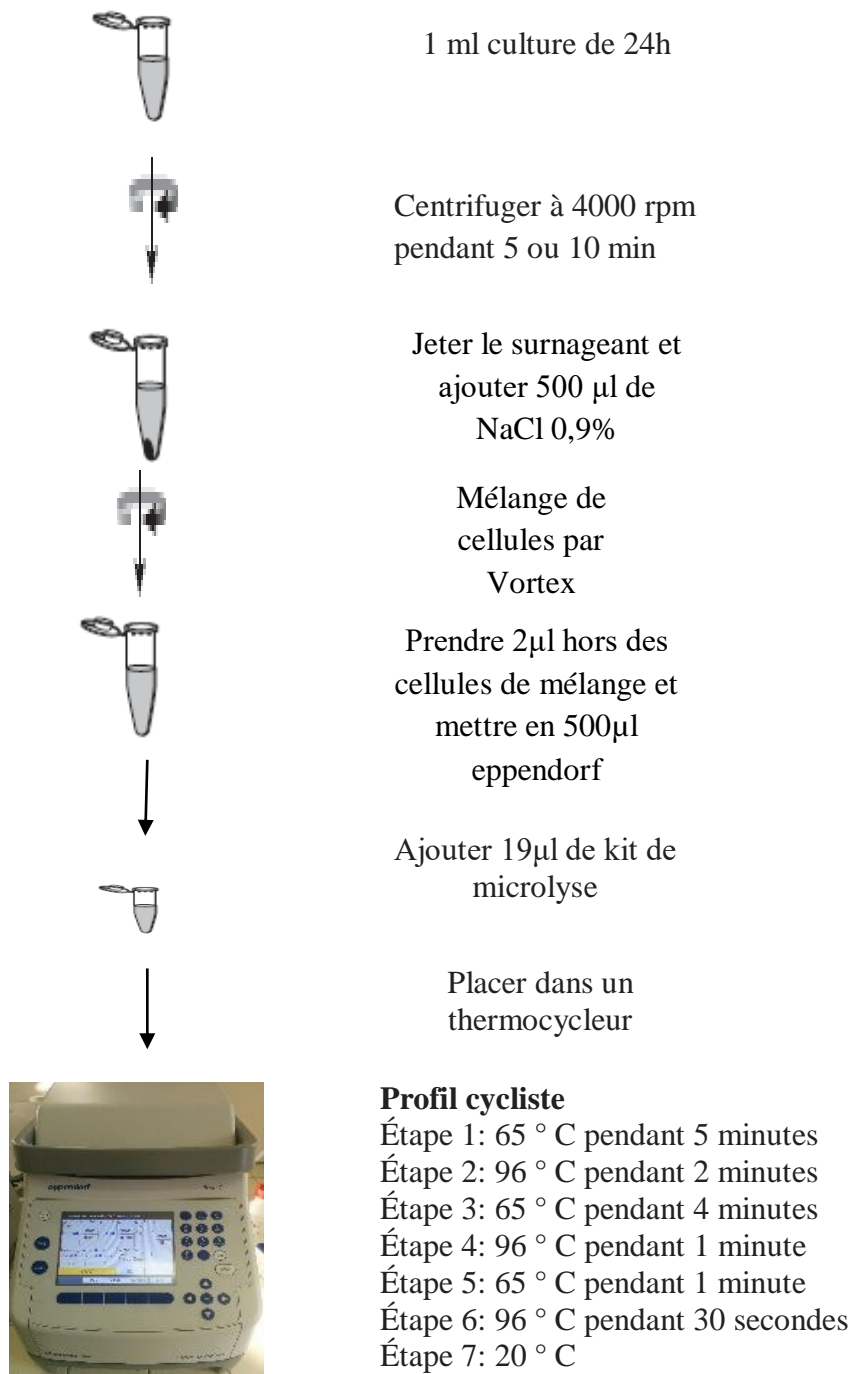


Figure 7 : Protocole de l'extraction de l'ADN par kite microlyse

4. 2.2. Typage par analyse ADN polymorphe amplifié au hasard (RAPD)

Des réactions RAPD-PCR ont été réalisées avec les amorces M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3'), D11344 (5'-AGTGAATTCGCGGTCAGATGCCA-3') et D8635 (5'-GAGCGGCCAAAGGGAGCAGAC-3'), en utilisant le programme suivant: dénaturation initiale à 94 ° C pendant 2 minutes suivies de 40 cycles à 94 ° C pendant 1 minute, 45 ° C pendant 20 secondes et 72 ° C pendant 2 minutes; allongement final à 72 ° C pendant 10 minutes pour l'amorce M13 et 94 ° C pendant 2 minutes suivis de 35 cycles à 94 ° C pendant 1 minute, 42 ° C pendant 1 minute et 72 ° C pendant 1 minute et 30 secondes; extension finale à 72 ° C pendant 10 min pour les amorces D11344 et D8635 (**Morandi et al., 2014**)

5. Fonctionnalités technologiques

5. 1. Activité antimicrobienne

Les souches indicatrices utilisées pour le test antimicrobien sont représentées dans le (Tableau 6).

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

✓ *Méthode directe*

L'activité antimicrobienne de nos souches a été évaluée sur le milieu solide selon la méthode de (**Fleming et al., 1975**). Le milieu MRS estensemencé en touche par nos isolats (souches inhibitrices). Après 24 heures d'incubation une couche de 8ml du milieu Mueller-Hinton semi-solideensemencée par la souche indicatrice et coulée à la surface puis ré-incubé pour 24 à 48 heures supplémentaires. Les souches présentant une zone claire tout autour sont considérées comme productrices de substances antimicrobiennes.

✓ *Méthode indirecte*

Cette méthode permet de mettre en contact le surnageant de la souche lactique productrice de substance antimicrobienne avec la souche indicatrice. Les souches précédemment sélectionnées pour leur production de substances antimicrobiennes sont concernées par ce test. Les souches sont cultivées dans un milieu MRS liquide et incubées pendant 18 heures. Après incubation, le milieu est centrifugé (8000 tr/mn 10 min) et le surnageant est conservé. Dans une boîte de Pétri contenant de la gélose nutritive a étéensemencée par la souche indicatrice, des puits sont réalisés avec un emporte-pièce. Les puits recevront 100 µl du surnageant de la souche à tester et les boîtes sont incubées pendant 24 à 48 heures. Les puits

entourés d'une zone claire dans la nappe de culture de la souche testent et ayant un diamètre supérieur à 2 mm sont considérées comme positive.

Tableau 6 : Souches indicatrices utilisées dans l'activité antimicrobienne.

Souches indicatrices	Source	Milieu	Incubation
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	BHI	37°C
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 19095	BHI	37°C
<i>Listeria monocytogen</i>	ATCC 9525	MH	37°C
<i>Brouchotrix thermosphacta</i>	ATCC 11509	BHI	37°C
<i>Pseudomonas aerogenosa</i>	CNR ISPA PS20	BHI	37°C
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CNR ISPA LPF3	BHI	30°C
<i>Serratia marcescens</i>	CNR ISPA S91	BHI	30°C
<i>Salmonella enterica</i> serovar thyphimurium	ATCC 1428	BHI	37°C
<i>Enterobacter cloacae</i>	CNR ISPA PS25	BHI	37°C
<i>Chryseobacterium joostei</i>	CNR ISPA LPR1	BHI	30°C
<i>Listeria ivanovii</i>	ATCC 19119	BHI	37°C
<i>Listeria innocua</i>	ATCC 33090	BHI	37°C
<i>Klebsiella sp</i>	LMT	B.N	37°C

5. 1. 1. Détermination de la nature de substance inhibitrice

Les bactéries lactiques sont capables d'inhiber d'autres bactéries du même groupe ou d'autres genres par la production d'un grand nombre d'agents inhibiteurs. Parmi lesquels nous pouvons citer principalement les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène ou les bactériocines (Meziani *et al.*, 2009).

a. Inhibition due à la production d'acides organiques

L'acide lactique est un facteur majeur dans les inhibitions par les bactéries lactiques. Afin d'éliminer son effet, les souches sont cultivées dans MRS liquide tamponné (tampon phosphate 0.1 M, pH7)

b. Inhibition due à la production de peroxyde d'hydrogène

Cet agent peut être dégradé par une enzyme, la catalase, présente chez certaines espèces bactériennes telles que *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua* et *Listeria ivanovii*.

La croissance de certaines bactéries lactiques entraîne la production de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) qui est considéré comme un inhibiteur de la croissance bactérienne (Cogan *et al.*, 1981).

c. Inhibition due à la production de substance de la nature protéique

Afin de confirmer la nature protéique de la substance inhibitrice, le surnageant de souche testé a été traité avec l'enzyme protéolytique.

À partir d'une culture jeune, 2 ml ont été prélevés et centrifugés à 8500 tpm pendant 10 min. 1ml du surnageant ont été additionnés d'1 ml de protéinase K de concentration finale 1mg/ml. Le mélange a été incubé à 37°C pendant 1h. On a stérilisé le tout par filtration à l'aide d'un filtre millipore. Les réactions enzymatiques ont été désactivées par une incubation à 65°C pendant 10 min (Trias *et al.*, 2008).

5. 1. 2. Caractérisation physico-chimique de substance de la nature protéique

Certaines propriétés physico-chimiques des bactériocines permettent de donner une idée sur leur classification. Il s'agit plus particulièrement de la thermorésistance, en effet, les bactériocines thermosensibles appartiennent à la classe III alors que les thermorésistantes sont de la classe I ou II (**Dortu et Thonart, 2009**).

De ce fait, des surnageant de culture ont été traités pour étudier l'effet de différents paramètres physico-chimiques sur l'activité de la bactériocine. Pour tous les tests réalisés dans cette partie nous avons utilisé la méthode de diffusion en puits.

✓ *Effet de la température*

Pour tester leur thermostabilité de l'activité de bactériocine, des surnageant de culture ont été chauffés à 60, 80 et 100 pendant 30min et 121°C pendant 15min.

La lecture des résultats consiste à faire la comparaison entre ceux obtenus avec les surnageant chauffés et le surnageant non chauffés.

✓ *Sensibilité au pH*

Nous avons ajusté le surnageant de culture à des pH acides ou basiques : pH 2, 4, 8 ou 10 en utilisant du HCl ou du NaOH à 2N. Puis nous avons réajusté le pH à 7 après d'incubation de deux heures.

La lecture des résultats consiste à faire la comparaison entre ceux obtenus avec les surnageant traités et le surnageant non traité.

5. 1. 3. La cinétique de croissance de *Listeria ivanovii* et *Pseudomonas fluorescens* en cultures pures et mixtes avec des souches lactiques (AM4, AM6, AM10, AM12, AM13, AM15, AM17, AM22, V3 et N3)

100 µL de la culture de 18 h ayant une concentration initiale de 10^8 UFC / ml pour les souches lactiques et 10^7 UFC / ml pour les souches indicatrices de *Listeria ivanovii* et de *Pseudomonas fluorescens*, ont été systématiquement repiqués dans 10 ml de lait écrémé avec 0,3% d'extrait de levure. Après incubation à 30 ° C pendant 18 h, les souches ont été inoculées séparément dans 100 ml de lait écrémé pour surveiller les cultures pures, et la culture mélangée a été préparée en mélangeant une culture de souche indicatrice avec la souche lactique. Les cultures ont été divisées en tubes et incubées à 30 ° C pendant 48 h. Toutes les quatre heures, les échantillons étaient prélevés de façon aseptique pour déterminer la cinétique de croissance (**Benmechernene et al., 2013**)

La mesure de la population bactérienne avec les souches indicatrices dans les cultures pures et mixtes a été effectuée en dénombrement dans le milieu MRS pour compter les souches lactiques et la gélose nutritive pour la souche de *Pseudomonas fluorescens*. Il se détermine par la formule :

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

C : est la somme des colonies comptées dans la première dilution.

V : volume de solution déposé (ml)

N : nombre totale des colonies dans toutes les boites.

n1 : Nombre de boites comptées dans la première dilution.

n2 : Nombre de boites comptées dans la seconde dilution.

n3 : Nombre de boites comptées dans la troisième dilution.

d : facteur de dilution à partir du quel les premiers comptages ont été obtenus.

5. 2. Pouvoir acidifiant

La mesure de l'activité acidifiante consiste à suivre d'une part l'évolution du pH des différentes cultures en fonction du temps et d'autre part à doser simultanément l'acidité totale par la soude.

100 µL de la culture de 18 h ayant une concentration initiale de 10^8 UFC / ml ont été systématiquement repiqués dans 10 ml de lait écrémé avec 0,3% d'extrait de levure. Puis la culture a été incubée à 30 ° C pendant 18 h, les souches ont été inoculées séparément dans 100 ml de lait écrémé. La culture a été divisée en tubes et incubées à 30 ° C pendant 48 h. Toutes les deux heures, les échantillons étaient prélevés de façon aseptique dans des tubes pour déterminer le pH et l'acidité à titrer (**Guessas *et al.*, 2005**)

L'acidité est déterminée par la formule :

$$\text{Acidité (°D)} = V_{\text{NaOH}} \times 10$$

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

La mesure de pH est faite directement par le pH-mètre, en plongeant l'électrode dans le volume du lait.

5. 3. Pouvoir protéolytique

L'activité protéolytique a été recherchée dans un milieu gélosé PCA additionné de 2% de lait écrémé. Les souches bactériennes à tester ont été déposées sur la surface du milieu gélosé et incubées à 30 ° C pendant 24 à 48 heures, l'activité protéolytique entraîne l'apparition d'un léger halo autour de touche (**Vuillemard, 1986**).

5. 4. Pouvoir lipolytique

L'activité lipolytique est recherchée sur le milieu 1% de Tween 80 agar (sources lipidiques artificielles). Les souches ont été déposées sur la surface de la gélose et incubées à 30 ° C pendant 24 heures. La lipolyse est révélée par une zone claire entourée de la touche (**Karam, 2012**).

5. 5. Pouvoir texturant

5. 5.1. Production d'exo polysaccharides (EPS)

Les souches ont été ensemencées en stries sur gélose hypersaccharose 5%. Après incubation à 30°C pendant 24h, la production des exo polysaccharides est détectée par l'apparition des colonies larges et gluantes (**Leveau *et al.*, 1991**).

5. 5.2. Quantification de la production d'exo polysaccharides (EPS)

Cette technique de quantification est celle de (**Mozzi *et al.*, 2001** et **Wu *et al.*, 2010**) :

Pour chaque souche, 100 ml du bouillon MRS a été inoculé par la culture à tester à raison de 1%. Après une incubation de 24h, la culture a été centrifugée à 6000 rpm pendant 20min. A un volume de surnageant, deux volumes de l'éthanol à 4°C ont été ajoutés, le tout a été incubé pendant 24 h à 4°C.

Les précipités ont été récupérés par centrifugation à 6000 rpm pendant 5min et resuspendus dans 2ml d'eau distillée. Le mélange précipité-eau a été filtré sur un millipore de 0.22 µm de porosité. Ensuite, 40µl du phénol à 80% et 2ml de l'acide sulfurique concentré ont été ajoutés à chaque 800µl du filtrat suivi d'une agitation au vortex. En parallèle un blanc a été préparé en remplaçant l'échantillon avec de l'eau distillée.

La lecture de l'absorbance est effectuée a une longueur d'onde de 490 nm, les résultats sont exprimés en milligrammes des exo polysaccharides (EPS) par litre (mg/l).

Les valeurs obtenues sont comparées avec celles de la courbe d'étalonnage tracé en utilisant le glucose (**voir Annexe 2**).

5. 6. Pouvoir aromatisant

La capacité des souches à produire des composés aromatisants au cours de leur croissance peut être mise en évidence sur lait écrème stérile. Chaque tube contenant du lait écrème stérile a été ensemencé par une des souches. Après incubation à 30°C pendant 24h à 48h, les réactifs de Vogues-Proskauer VPI et VPII ont été ajoutés et laissés reposer. La présence d'arôme est révélée par l'apparition d'un anneau rouge (**Harrigan et Mc Cance, 1976 ; Zourari *et al.* , 1991 ; Facklam et Elliot, 1995**)

6. Critères de performances

6. 1. Activité hémolytique

Un caractère hémolytique a été étudié en rayonnant la culture de la souche sur une gélose Columbia contenant 5% de sang humain. Après incubation pendant 24 heures, la souche peut être α -hémolytique (couleur verte autour des colonies); β -hémolytique (clarification autour des colonies) ou γ hémolytique (le milieu n'est pas changé)

6. 2. Résistance aux antibiotiques

Les souches ont été cultivées dans bouillon MRS à 30 ° C pendant 18 h et ensuite été ajustées à une échelle de 0,5 Mc Farland puis étalées sur la gélose MRS. Des disques d'antibiotiques ont été placés sur gélose et incubés pendant 24 heures à 30 ° C. Les antibiotiques incluent sont démontré au (**Tableau 7**)

Les zones inhibitrices émergeant après 24 h d'incubation ont été mesurées. L'activité a été évaluée comme étant sensible, S (≥ 21 mm); intermédiaire, I (16-20 mm) et résistant, R (≤ 15 mm), comme décrit précédemment par (**Liasi *et al.*, 2009**)

Tableau 7 : Liste des antibiotiques testé

Antibiotique	Charge de disque (μg)	Symbole
Amoxilline /Acide clavulanique	30	AUG
Clindamycine	2	CD
Tobramycine	10	TOB
Amikacine	30	AK
Tetracycline	30	TE
Doxycycline	30	DO
Chloramphenicol	30	C
Oxaciline	1	OX
Rifampicine	5	RA
Fosfomycine	50	FF
Ampiciline	10	AMP
Kanamycine	30	K

7. Profil probiotiques

7. 1. Tolérance à l'acidité

Les cellules bactériennes provenant de la culture de 18 h de souche incubées sur bouillon MRS ont été récupérées par centrifugation et lavées avec du PBS stérile (solution tampon phosphate) à pH 7. Les procédures de centrifugation et de lavage ont été répétées trois fois, les cellules bactériennes ont été récupérées dans PBS stérile ajusté à pH 2, 3 et 4, le nombre de cellules viables a été déterminé après exposition à l'état acide pendant 0 et 3 h à 37 ° C, selon la méthode de dénombrement et incubation à 30 ° C pendant 48 h (**Hossieni et al., 2009**). Les valeurs ont été exprimées en log UFC / ml.

7. 2. Résistance aux sels biliaire

Les cellules bactériennes des cultures de 18 h ont été récoltées par centrifugation, lavées et remises en suspension dans du PBS (pH 8) additionné de 0,5%, 1,0% ou 2,0% de sel biliaire. Le nombre de cellules viables a été déterminé après l'exposition à des sels biliaires pendant 0 et 4 h à 37 ° C, selon méthode de dénombrement et incubation à 30 ° C pendant 48 h. Les valeurs ont été exprimées en log UFC / ml.

7. 3. Hydrolyse du sel biliaire

Le test de sel de bile d'hydrolyse est basé sur la détermination de l'enzyme hydrolase biliaire qui catalyse l'hydrolyse du sel biliaire. Sur les boîtes de Pétri contenant du MRS modifié préparé avec 0,5% de sel biliaire, 0,1 ml de la culture de la souche a été inoculé à la surface et incubé à 30 ° C pendant 48 h.

7. 4. Résistance à la pepsine

Les cellules bactériennes de la culture de 18 h de la souche ont été récupérées par centrifugation et lavées avec du PBS stérile (solution saline tampon phosphate) à pH 8. Les cellules bactériennes ont finalement été remises en suspension dans du PBS stérile ajusté à pH 2 et 3 complétées par 3 mg / ml de pepsine respectivement. Le nombre de cellules viables a été déterminé après exposition à la pepsine pendant 0 et 3 h à 37 ° C, selon la méthode de dénombrement et incubation à 30 ° C pendant 48 h. Les valeurs ont été exprimées en log UFC / ml.

7. 5. Test d'hydrophobicité

L'hydrophobicité est déterminée selon la méthode décrite par (Iyer *et al.*, 2010). Le culot bactérien de 18h a été récupéré par centrifugation à froid à 10000 rpm/10min suivie de deux lavages successifs puis resuspendu en PBS (pH 7). La densité optique initiale de la suspension a été ajustée approximativement à 10^8 UFC/ml (DO_{600} initiale). Ensuite 1ml du xylène a été ajouté doucement à 3 ml de la suspension bactérienne. Ce mélange a été agité en utilisant un vortex pendant 2 min puis mesuré la densité optique de la phase aqueuse (DO_{600} finale), après incubation pendant 20 min à température ambiante.

La différence de la densité optique est considérée comme une mesure de l'hydrophobicité de la surface cellulaire (H%) calculé par l'équation suivante:

$$\% \text{ Hydrophobicité} = \text{DO initiale} - \text{DO finale} / \text{DO initiale} \times 100$$

7. 6. Auto-agrégation

Le test d'auto-agrégation des souches lactiques a été effectué selon la méthode décrite par (Kos *et al.*, 2003). Le culot bactérien des cultures jeunes a été récupéré après centrifugation à 13000 rpm/4min et lavage avec PBS, puis les cellules sont suspendues dans 4ml du PBS, et mixer par la suite pendant 10 secondes à l'aide du vortex. La suspension est incubée pendant 3h à 30°C. Après la période d'incubation 0.1 ml de la suspension est ajoutée à 3.9ml du PBS. La densité optique (DO_{600}) de chaque culture a été déterminé à Temps zéro heure (t_0) et pendant chaque une heure d'incubation (T_h).

$$\% \text{ Auto-agrégation} = 1 - (\text{DO}_{T_h} / \text{DO}_{\text{initiale } t_0}) \times 100$$

8. Evaluation de l'activité antioxydante par DPPH

La capacité de récupération des radicaux DPPH des isolats LAB était déterminée selon la méthode décrite par (Wang *et al.*, 2016) avec modification. En bref, 1 mL de cellules LAB avec 10^8 UFC / mL a été ajouté à 2 ml de solution éthanolique de radical DPPH (0,05 mM). Ce mélange (A_M) a été agité vigoureusement et incubé à température ambiante dans l'obscurité pendant 30 min. L'eau distillée et la solution de DPPH étaient utilisées comme contrôles (A_C). L'éthanol et les cellules étaient contenus dans le témoin. L'absorbance de la solution résultante a été mesurée en triple à 517 nm après centrifugation à 8000 g pendant 10 min. la capacité de récupération a été définie comme :

$$\% = ((A_C - A_M) / A_C) \times 100$$

9. Activité anti-formation du biofilm

Propriétés anti-formation du biofilm des huit souches de LAB contre *L.ivanovii*, *E. coli*, *P. fluorescens* et *Klibssila* sp ont été déterminés par la méthode de co-incubation décrite par (Bulgasem *et al.*, 2015) avec quelques modifications. 100 µl de surnageant de la souche de LAB ont été mélangée avec 100 µl des souches pathogènes ou/et d'altérations (10^7 UFC / ml) dans une microplaque à 96 puits et incubé pendant 24 h. Les puits contenant uniquement des souches pathogènes ou/et d'altérations ont été considérés comme un contrôle. Après 24 h d'incubation, le contenu des puits respectifs a été retiré et lavé trois fois avec du PBS (pH 7,2) afin d'éliminer les surnageant non adhérents. Les cellules sont fixées avec 200µl d'éthanol absolu et maintenues intacts pendant 15 min. L'éthanol a été jeté et les puits ont été laissé sécher. Après séchage à l'air, 200 µl de solution de coloration au violet cristal (0.1% m/v) ont été ajouté dans les puits et maintenu pendant 20 min. La tache a été jetée après la période d'incubation requise et les puits ont été lavés trois fois avec PBS. Les puits ont été autorisés à sécher puis ont été rempli par 200µl de l'acide acétique à 33% et l'absorbance a été lue à 630 nm en utilisant un lecteur ELISA. Le pourcentage de réduction de la formation du biofilm par des souches pathogènes ou/et d'altérations a été calculé comme :

$$\% = (1 - (DO_M / DO_C)) \times 100$$

DO_M = Absorbance du puits contenant du surnageant lactique + souche cible

DO_C = Absorbance du puits contenant uniquement souche cible

Résultats
et
Discussion

1. Isolements et caractérisation phénotypique et génotypique

L'isolement des bactéries lactiques sur différents milieux de culture MRS et MSE à partir de six échantillons du lait cru (quatre du lait de chamelle et deux du lait de chèvre) a permis l'obtention de cent trente-deux (132) isolats Gram (+) et catalase (-) correspondant à des bactéries lactiques.

La purification des isolats, nous a permis d'avoir soixante seize (76) souches pures.

Note : Nous avons sélectionnés trente-un (31) isolats produisant des substances antimicrobiennes pour faire l'objet de cette étude.

1. 1. Caractérisation phénotypique

Les trente-un (31) isolats de Bactéries lactiques obtenus ont été identifiés selon des critères morphologiques, physiologiques et biochimiques

1. 1.1. Critères morphologiques

A. Aspect macroscopique

Les isolats sont apparus de petite taille, de couleur blanchâtre, forme circulaire ou lenticulaire. L'aspect et la couleur des colonies selon (**Badis et al., 2006**)

B. Aspect microscopique

L'observation microscopique après coloration de Gram a montré que ces isolats sont Gram positif et se présentent deux groupes, groupe de forme bâtonnet et groupe de forme ovoïde déposée en paire ou en chaîne courte (**Figure 8**). L'aspect des colonies et l'aspect des cellules sont en accord avec ceux montrés par (**Leveau et al., 1991 ; Champagne et al., 2000**).

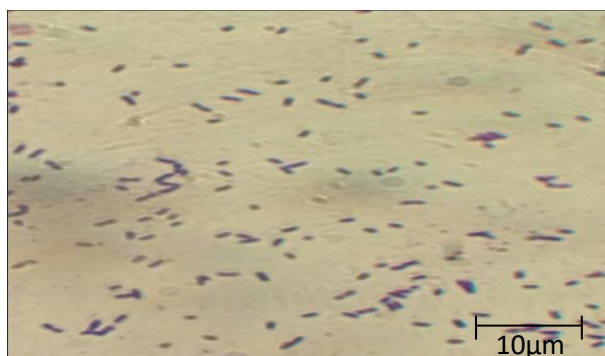


Figure 8: Aspect microscopique de souche *Lactobacillus plantarum* AM 17 (Gx100).

1. 1.2. Critères physiologique et biochimique

Les caractéristiques physiologiques et biochimiques des isolats sont présentées dans le **Tableau 8**. La comparaison des résultats est faite selon le tableau indiqué par (Axelsson, 2004) (Voir annexe 3)

1. 1.2.1. Croissance à différentes conditions

a) Croissance à différentes température et thermorésistante

Les résultats obtenus ont montré que tous les isolats isolés poussent à 15 °C et 30°C. Cependant, 9,67% des isolats poussent à 45°C.

Elles sont considérées 90,33% des isolats comme des bactéries lactiques mésophiles. Néanmoins, 9,67% ont une large gamme de températures de croissance, elles poussent à 15 °C, 30°C, et 45°C.

Après exposition à une température de 63,5°C pendant 30 min suivie d'une incubation de 48h. Cependant, 61,29% des isolats ont révélé un résultat positif

b) Croissance à différents pH

Les résultats révélés que 38,71% des isolats développée à pH 6,5 et 61,29% des isolats se développer à pH 6,5 et pH 4,8.

Tous les isolats ne développent pas à pH 9,6.

c) Croissance à différentes concentrations NaCl

Les résultats révélés que 61,29% des isolats développent à 4 et 6,5% de NaCl. Néanmoins, 38,71% des isolats poussent à 4% et pas à 6,5% de NaCl

1. 1.1.2. Tests biochimiques

a) Type fermentaire

Ce test permet d'apprécier le type de métabolisme par lequel le substrat carboné est transformé, il consiste à mettre en évidence la formation de CO₂ qui est piégé dans une cloche de Durham en milieu MRS (**Hassaine, 2013**).

61,29% des souches sont homofermentaires qui fermentent le sucre en lactate sans produire du gaz, et les autres souches sont hétérofermentaires où il y a un dégagement de gaz qui va pousser la cloche de Durham vers le haut (**Figure 9**).

Les bactéries lactiques qui fermentent le glucose en produisant, en plus de l'acide lactique, de l'acétate, de l'éthanol et du CO₂ sont dites hétérofermentaires. Les groupes principaux de bactéries présentant ce type de métabolisme sont les leuconostoc, Weissella et certains lactobacilles. (**Thompson et al., 1994**).

Les bactéries lactiques homofermentaires comprennent les espèces de lactocoques, pediocoques, ainsi que certains lactobacilles. Cette voie conduit dans des conditions optimales de croissance à la production de deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP par molécule de glucose consommée. (**Thompson et al., 1994**).

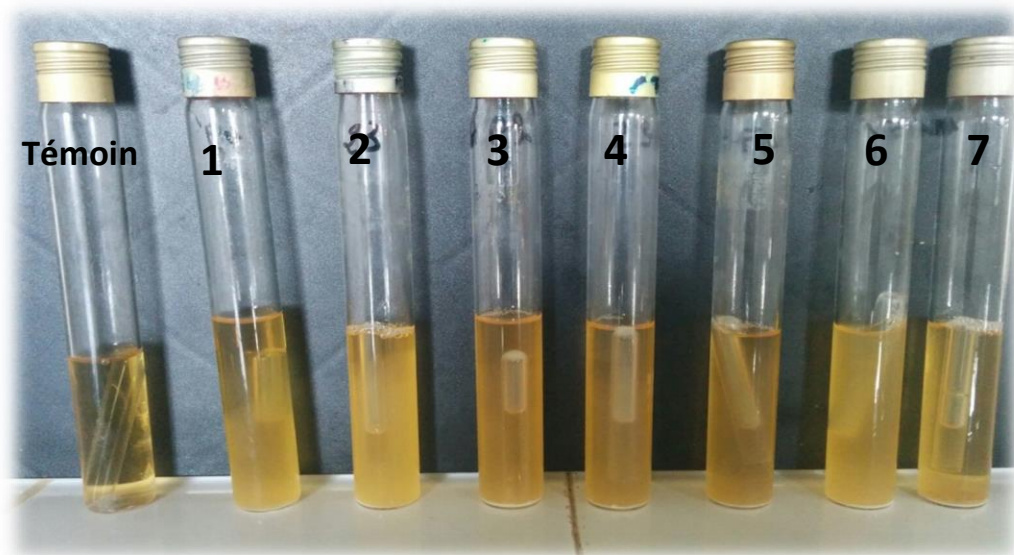


Figure 9 : la production du CO₂ à partir du glucose

1 : Isolats V3 forme cocci isolé à partir du lait de chamelle
2 : Isolats V3* forme cocci isolé à partir du lait de chamelle
3 : Isolats N3 forme cocci isolé à partir du lait de chèvre
4 : Isolats N3* forme cocci isolé à partir du lait de chèvre

5 : Isolats O75* forme cocci isolé à partir du lait de chamelle
6 : Isolats O61 forme cocci isolé à partir du lait de chamelle
7 : Isolats N72* forme cocci isolé à partir du lait de chamelle

b) Hydrolyse de l'arginine (ADH)

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

L'enzyme ADH, dont l'action est favorisée en milieu acide, forme des substances alcalines à partir des acides aminés et l'alcalinisation du milieu ce qui provoque le virage au violet (**Kheddid et al., 2006**).

Sur M16BCP on observe que 51,61% des isolats n'ont pas la capacité à hydrolyser l'arginine, car ne possèdent pas l'ADH (arginine déshydrogénase) ceci signifie que les bactéries lactiques utilisent le lactose en acidifiant le milieu, les colonies donnant ainsi une coloration jaunâtre (**Figure 10**). Et les autres isolats sont capables d'utiliser l'arginine et ré-alcalinisent le milieu, leurs colonies apparaissent blanchâtres.

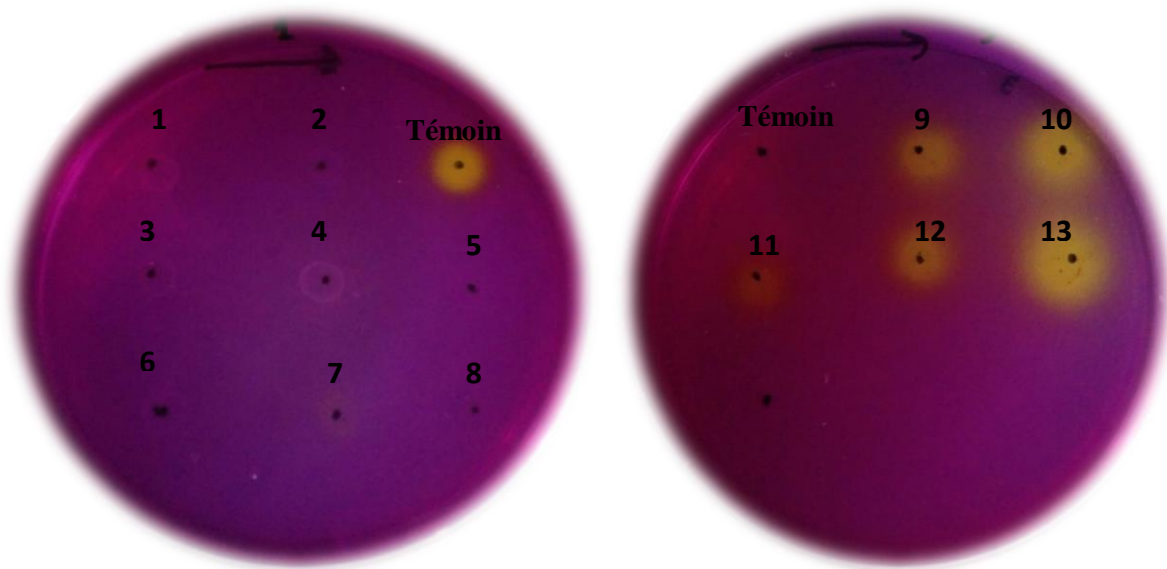


Figure 10 : Test de l'hydrolyse de l'arginine,

- 1 : Isolats AM3 forme bacille isolé à partir du lait de chamelle 8 : Isolats AM17 forme bacille isolé à partir du lait de chamelle
 2 : Isolats AM5 forme bacille isolé à partir du lait de chamelle 9 : Isolats V3 forme cocci isolé à partir du lait de chamelle
 3 : Isolats AM6 forme bacille isolé à partir du lait de chamelle 10 : Isolats N3 forme cocci isolé à partir du lait de chèvre
 4 : Isolats AM11 forme bacille isolé à partir du lait de chamelle 11 : Isolats N3* forme cocci isolé à partir du lait de chèvre
 5 : Isolats AM13 forme bacille isolé à partir du lait de chamelle 12 : Isolats N72* forme cocci isolé à partir du lait de chamelle
 6 : Isolats AM15 forme bacille isolé à partir du lait de chamelle 13 : Isolats O62* forme cocci isolé à partir du lait de chamelle
 7 : Isolats AM16 forme bacille isolé à partir du lait de chamelle

c) Utilisation de citrate

Le milieu KMK qui est utilisé pour savoir le pouvoir des bactéries de dégrader le citrate, ce dernier qui se trouve en faible concentration dans le lait mais il est constitué néanmoins une substance clé dans l'élaboration des produits laitiers fermentés (François, 1986 ; Sanchez *et al.*, 2005).

Les souches capables de fermenter le citrate permettant la réaction entre l'ion ferrique et le potassium ferricyanide de cette façon résultent la formation des colonies bleues, et ces les cas pour tous nos isolats (Figure 11).

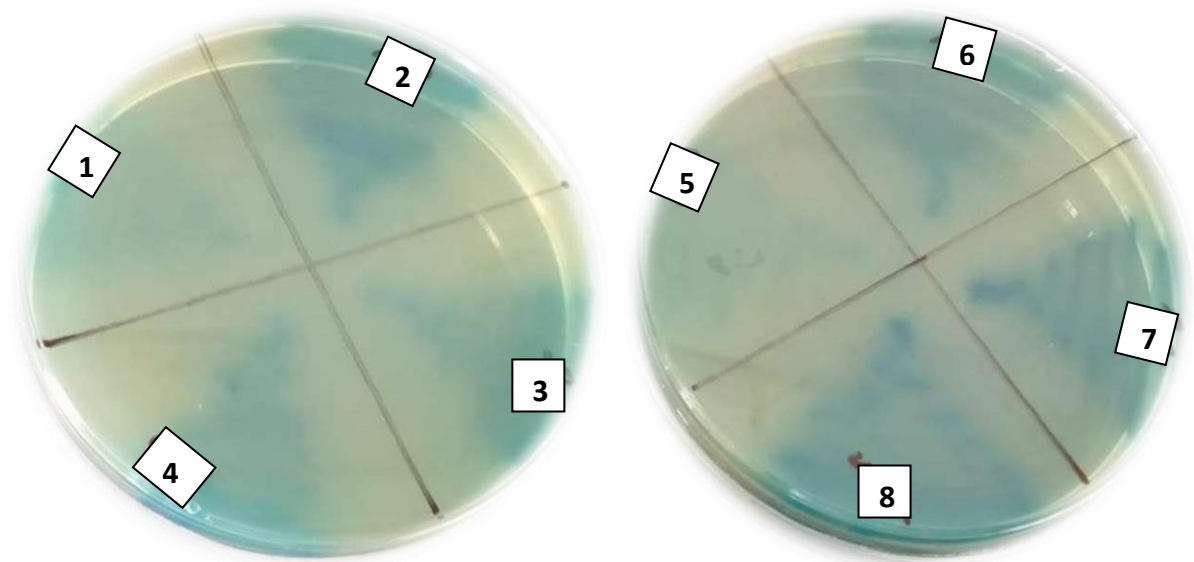


Figure 11 : Test utilisation de citrate en milieu KMK

- 1 : Isolats AM3 forme bacille isolé à partir du lait de chamelle 5 : Isolats AM10 forme cocci isolé à partir du lait de chamelle
2 : Isolats AM13 forme bacille isolé à partir du lait de chamelle 6 : Isolats AM17 forme bacille isolé à partir du lait de chamelle
3 : Isolats AM24 forme bacille isolé à partir du lait de chamelle 7 : Isolats V3 forme cocci isolé à partir du lait de chamelle
4 : Isolats AM25 forme bacille isolé à partir du lait de chamelle 8 : Isolats N3 forme cocci isolé à partir du lait de chèvre

d) Etude de profil fermentaire

On a établi leur profil fermentaire de sept sucres ont utilisant le milieu MRS BCP qui contient pourpre de bromocrésol qui est un indicateur de pH, leur virage au jaune révéla la fermentation des carbohydrates qui provoque une acidification du milieu (**Figure 12**).

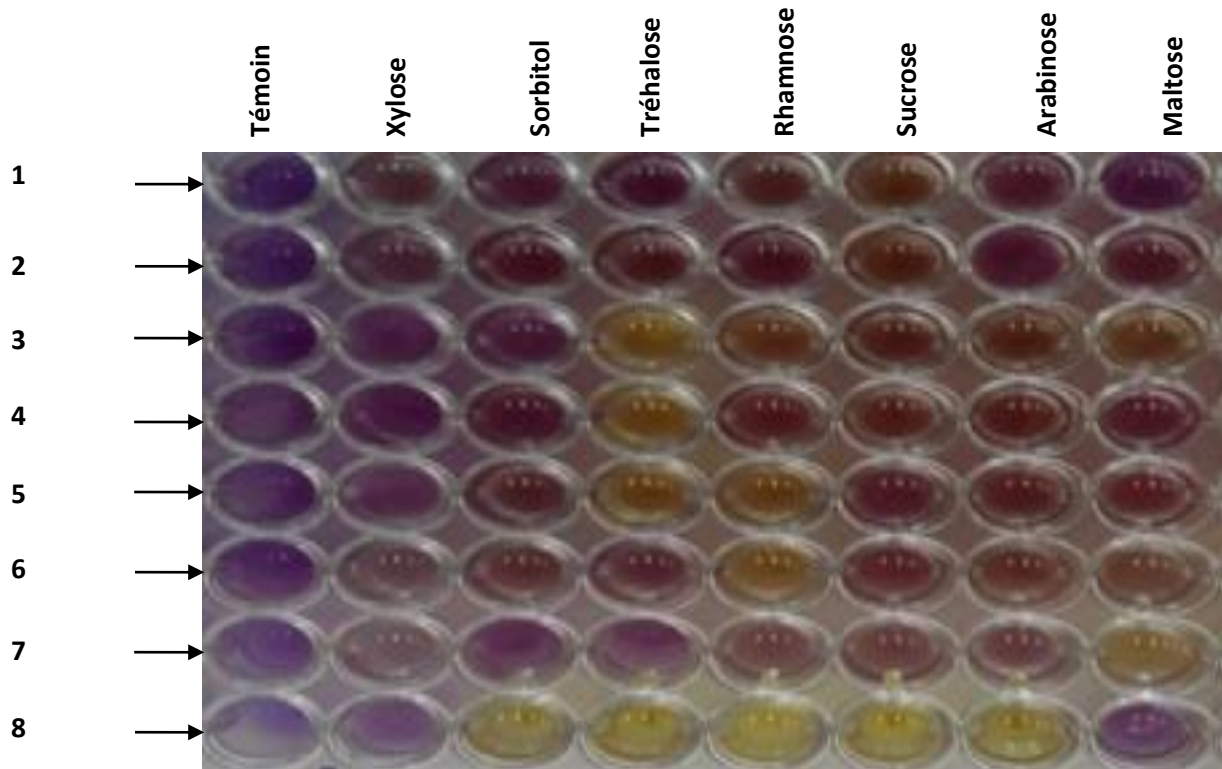


Figure 12 : Le profil fermentaires des isolats effectué sur microplaque

- 1 : Isolats AM4 forme cocci isolé à partir du lait de chamelle 5 : Isolats V3 forme cocci isolé à partir du lait de chamelle
 2 : Isolats AM6 forme bacille isolé à partir du lait de chamelle 6 : Isolats AM10 forme cocci isolé à partir du lait de chamelle
 3 : Isolats AM15 forme bacille isolé à partir du lait de chamelle 7 : Isolats AM12 forme cocci isolé à partir du lait de chamelle
 4 : Isolats AM17 forme bacille isolé à partir du lait de chamelle 8 : Isolats N3 forme cocci isolé à partir du lait de chèvre

Tableau 8 : Résultats des identifications phénotypiques des isolats

Souches	Caractères	Type fermentaire	Temperature				NaCl		ADH	Citrate	pH			Xylose	Sorbitol	Tréhalose	Rhamnose	Sucrose	Arabinose	Maltose
			15°C	30°C	45°C	63.5°C/30min	4%	6.5%			4.8	6.5	9.6							
AM1	Homo	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	
AM3	Homo	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+/-	+	+/-	+	-	-	
AM4	Hétéro	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+/-	+	-	-	
AM5	Homo	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+/-	+	+	+	
AM6	Homo	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+/-	+/-	+	+	+/-	
AM10	Hétéro	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+/-	+/-	-	+/-	+	+/-	+/-	
AM10*	Hétéro	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+/-	+/-	+/-	+	+	-	+	
AM11	Homo	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+/-	+	+	-	+	
AM12	Hétéro	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+/-	-	-	+/-	+/-	+/-	-	
AM13	Homo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+/-	+/-	+	-	-	
AM14	Hétéro	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+/-	+	+	+/-	+/-	
AM15	Homo	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+/-	+/-	+/-	+/-	
AM16	Homo	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+/-	+/-	+/-	-	+/-	-	
AM17	Homo	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+/-	+	+/-	+/-	+/-	-	
AM18	Homo	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+/-	-	
AM19	Homo	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	
AM20	Homo	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+/-	+	+	+	-	-	-	
AM21	Homo	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+/-	+/-	+	+	-	+/-	-	
AM22	Homo	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+/-	+	+	+	-	+/-	-	
AM23	Homo	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+/-	-	+	+	-	+/-	+/-	
AM24	Homo	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	
AM25	Homo	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	
AM27	Homo	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+/-	+	+	-	+	+/-	
AM29	Homo	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+/-	+/-	+	+	-	-	+/-	
V1	Hétéro	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	
V3	Hétéro	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+/-	+	+	+/-	+/-	+/-	
N3	Hétéro	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	
N3*	Hétéro	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	
N72*	Hétéro	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+/-	+/-	+	+	+	+	
O61	Hétéro	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+/-	+/-	+	+	+	
O72*	Hétéro	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+/-	

En se basant sur leurs caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques des 31 isolats lactiques ont été regroupés à 3 genres de bactéries lactiques : 61,29% de *Lactobacillus*, 22,58% de *Leuconostoc* et 16,13% de *Weissella* (**Figure 13**)

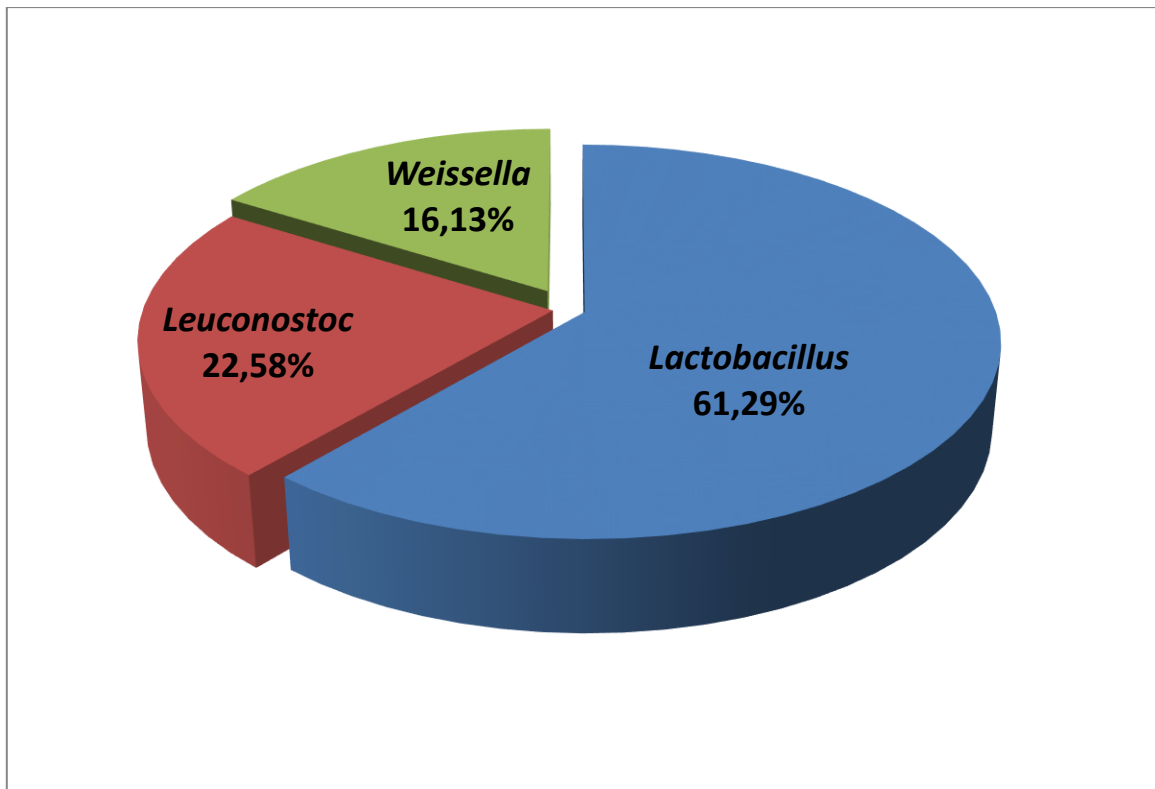


Figure 13: Distribution du pourcentage des isolats lactiques

1. 2. Identification géotypique

1. 2.1. Identification par ARNr 16S

L'avènement de la biologie moléculaire et le développement des techniques de manipulation de l'ADN, permettant d'extraire l'ADN ou l'ARN et de produire une empreinte génétique à partir d'un produit de PCR (**Randazzo et al., 2009**). Ces techniques donnent une image globale de structure génétique de la communauté bactérienne. Les gènes cibles les plus utilisés lors de l'analyse des flores microbiennes sont ceux de l'opéron ribosomal, particulièrement l'ARN 16S. Les gènes bactériens codants pour l'ARNr 16S contiennent 9 régions très stables V1-V9, dont la diversité de séquence diffère de manière importante selon l'espèce (**Baker et al., 2003**).

Afin de vérifier la qualité de l'ADN amplifié, nous avons fait migrer les amplifiâtes sur le gel d'agarose à 1,5%. La migration permet de distinguer une seule bande avec un poids moléculaire de 1500pb (**Figure 14**), ce qui signifie que l'extraction et l'amplification sont bien faites et qu'il s'agit bien des bactéries lactiques.

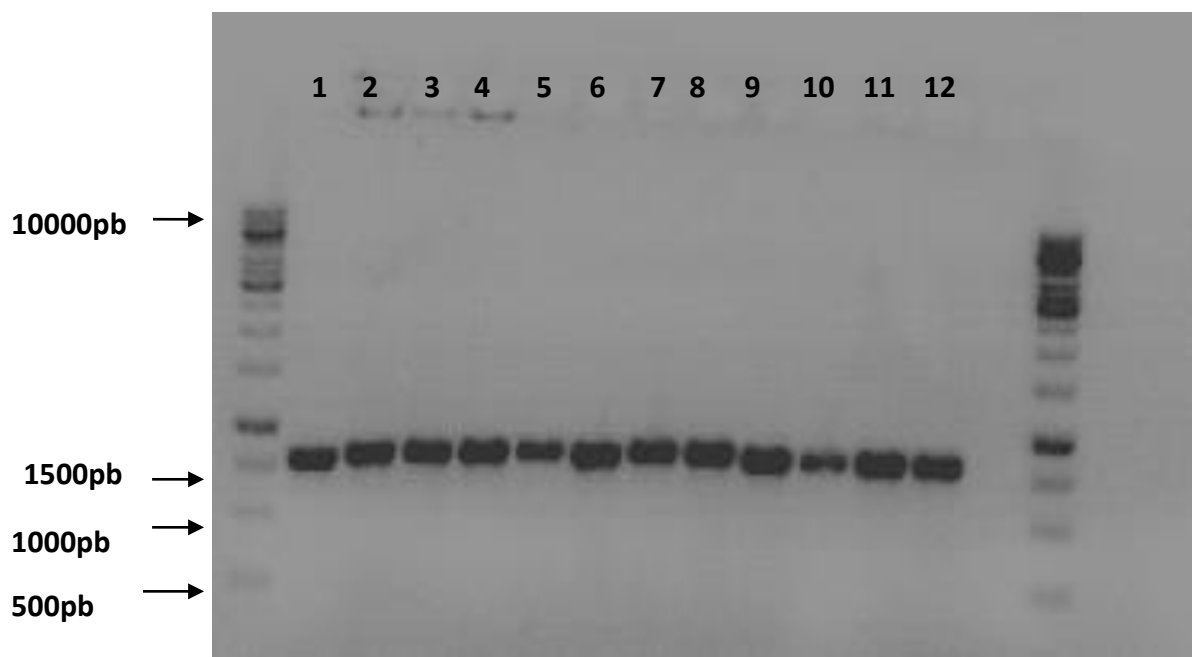


Figure 14: L'apparition des bandes électro phorétiques de 1500pb correspond au poids moléculaire de l'ADN des bactéries lactiques

- 1 : Isolats V3 forme cocci isolé à partir du lait de chamelle
- 2 : Isolats O61* forme cocci isolé à partir du lait de chamelle
- 3 : Isolats O72* forme cocci isolé à partir du lait de chamelle
- 4 : Isolats N3 forme cocci isolé à partir du lait de chèvre
- 5 : Isolats N3* forme cocci isolé à partir du lait de chèvre
- 6 : Isolats N72 forme cocci isolé à partir du lait de chamelle
- 7 : Isolats AM12forme cocci isolé à partir du lait de chamelle
- 8 : Isolats AM10 forme cocci isolé à partir du lait de chamelle

- 9 : Isolats AM10* forme cocci isolé à partir du lait de chamelle
- 10 : Isolats AM15 forme bacille isolé à partir du lait de chamelle
- 11 : Isolats AM18 forme bacille isolé à partir du lait de chamelle
- 12 : Isolats AM4 forme cocci isolé à partir du lait de chamelle

Les séquences d'ADN (**Figure 15, 16**) ont été réalisées par la méthode SANGER et puis analysées par le programme «BLAST» pour comparer le pourcentage d'identité avec d'autres séquences de souches référencées présentes dans la base de données NCBI (**Tableau 10**)

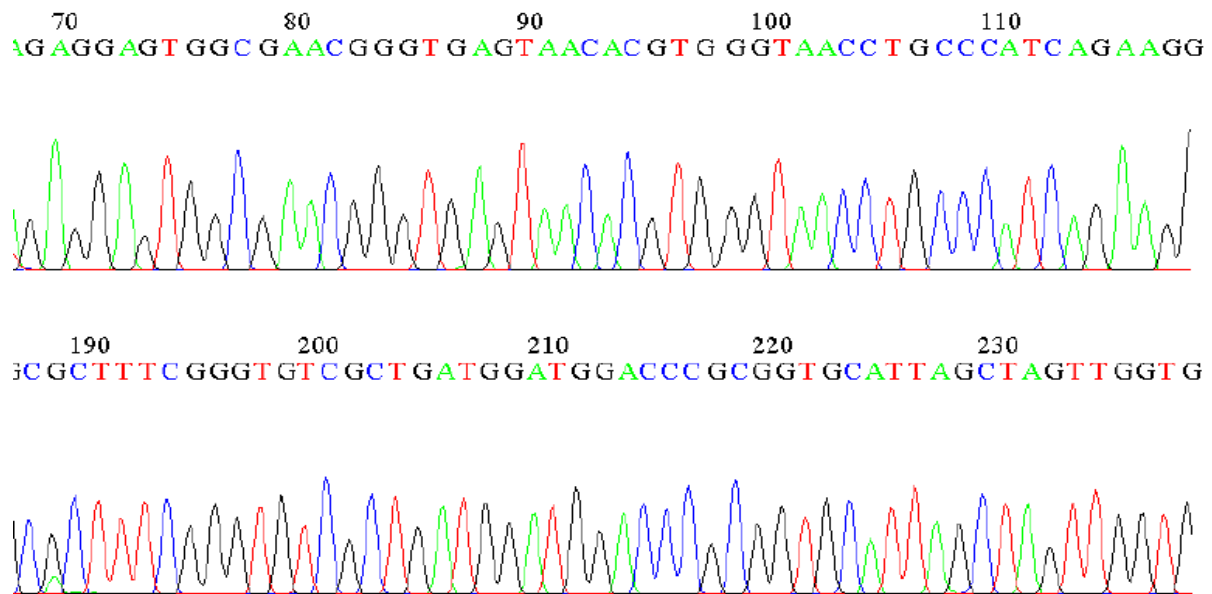


Figure 15 : Extrait du chromatogramme correspondant au spectre de la souche *Lactobacillus paracasei* AM13

```
TCGACGAGTTCTCTGTTGATGATCGGTGCTTGCACCAGAGATTCAACATGGAACGAGTGGCGGACGGGTGAG
TAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGAAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAA
GAACCGCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAG
TTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAAGTGGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACT
GAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAG
CAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTAACACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGT
AACTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
TAGGTGGCAAGCGTTATCCGATTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAAGTCTGATGT
```

Figure 16 : La séquence de souche *Lactobacillus paracasei* AM13 après la correction manuellement du chromatogramme

Tableau 9 : Identification des bactéries lactiques isolées par la technique de l'ARNr16s

Identification moléculaire		I.D %
AM1	<i>Lactobacillus casei</i>	100
AM3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100
AM4	<i>Weissella confuse</i>	100
AM5	<i>Lactobacillus pracasei</i>	100
AM6	<i>Lactobacillus pracasei</i>	100
AM10	<i>Weissella cibaria</i>	100
AM10*	<i>Weissella cibaria</i>	99
AM11	<i>Lactobacillus pracasei</i>	100
AM12	<i>Weissella cibaria</i>	100
AM13	<i>Lactobacillus pracasei</i>	100
AM14	<i>Weissella cibaria</i>	100
AM15	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100
AM16	<i>Lactobacillus pracasei</i>	100
AM17	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100
AM18	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99
AM19	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100
AM20	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100
AM21	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100
AM22	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100
AM23	<i>Lactobacillus pracasei</i>	100
AM24	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99
AM25	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100
AM27	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100
AM29	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100
V3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99
N3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99
N3*	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	100
N72	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	100
O61*	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	100
O72*	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	100

I.D : pourcentage d'identification

1. 2.2. Analyse par RAPD

Pour explorer la diversité des souches *Leuconostoc mesenteroides* (V3, O61*, O72*, N3, N3*, N72) et *Weissella cibaria* (AM12, AM10, AM10*) le dendrogramme (Figure 17) a été réalisée par RAPD-PCR avec trois amorces différentes D8635, D11344 et M13. L'utilisation de cette technique a permis à de nombreux auteurs de différencier plusieurs souches (Andrighetto *et al.*, 2001). Les souches présentant un coefficient de similarité égale ou supérieure à 90% peuvent être considérées comme extrêmement proches génétiquement. Les trois souches de *Leuconostoc mesenteroides* (V3, O61* et O72*) ont montré un coefficient de similarité plus élevé (94%) et les deux souches de *Leuconostoc mesenteroides* (N3 et N3*) regroupées à un niveau élevé de 98% être les mêmes souches. Au contraire, les deux souches de *Weissella cibaria* (AM10 et AM10*) ont montré une similitude de 86% et la souche *Weissella cibaria* AM12 a montré une faible similitude avec d'autres souches.

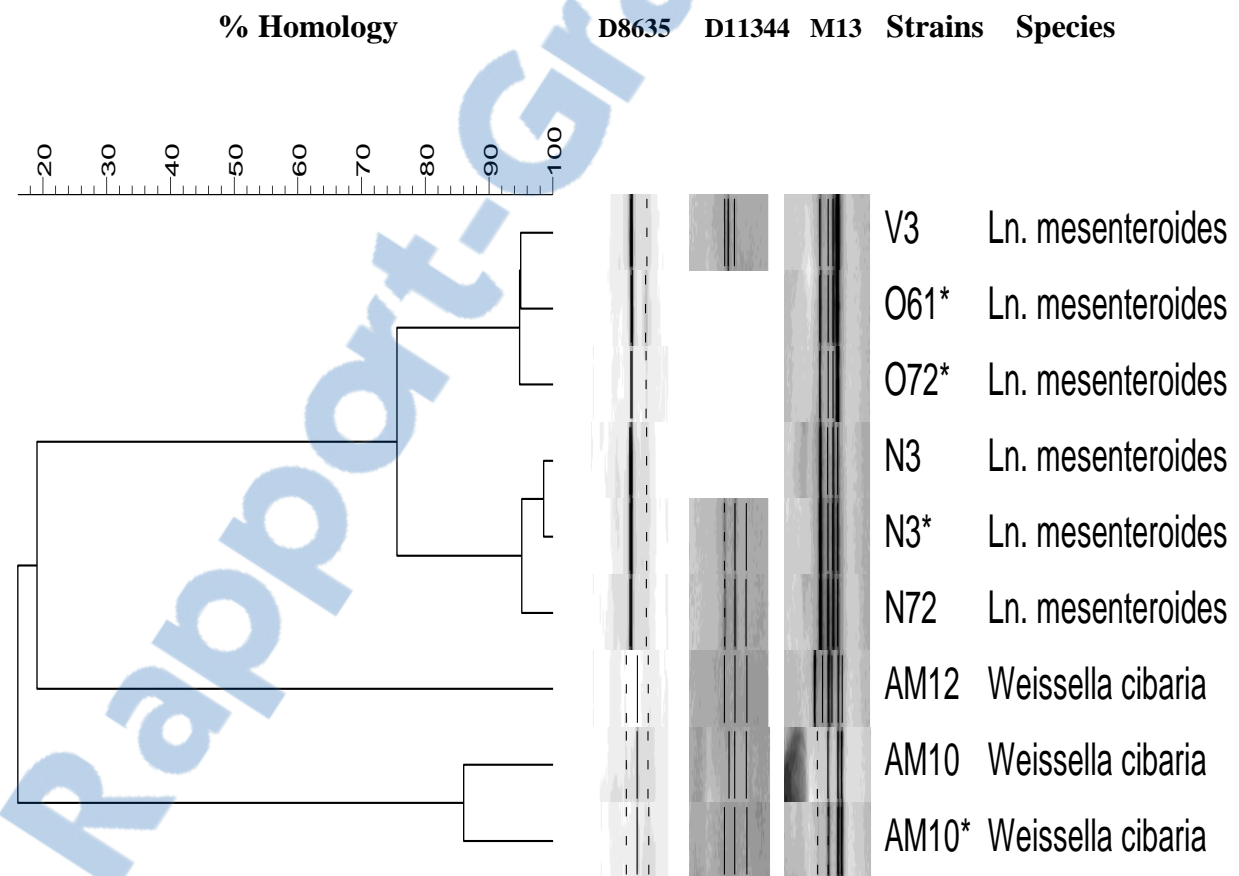


Figure 17 : Dendrogramme dérivé des profils RAPD-PCR combinés générés avec les amorces M13, D11344 et D8635

2. Fonctionnalités technologiques

2. 1. Activité antimicrobienne

Inhibition des bactéries pathogènes et/ou d'altérations des aliments est une préoccupation constante dans le traitement des produits alimentaires. La réduction des cas d'intoxication alimentaire provoquée par des germes nocifs peut être obtenue en exploitant les potentialités des bactéries lactiques capables de produire diverses substances à activité antimicrobienne. L'activité antimicrobienne des souches de LAB peut contribuer à améliorer la qualité des aliments fermentés et à prolonger leur durée de conservation (**Begonovic et al., 2014**)

La méthode de **fleming et al., 1975** permet de détecter la présence d'une interaction antagonisme entre nos souches lactiques et les *Listeria ivanovii* et *Listeria innocua*, par la présence d'une zone d'inhibition autour des colonies. Les résultats sont démontré dans (**Figure 18 et Tableau 10**).

La présence des zones d'inhibition en cas d'utilisation d'une culture lactique entière peut être due au métabolisme du lactose en acide lactique qui abaisse le pH et crée un environnement défavorable au développement des bactéries pathogènes (**Fleming et al., 1975 ; Barefoot et Klaenhammer, 1983 ; Tabak et al., 2007**), au peroxyde d'hydrogène (**Barefoot et Klaenhammer, 1984**) ou aux bactériocines (**Klaenhammer, 1993 ; Vinod Kumar et al., 2006**).

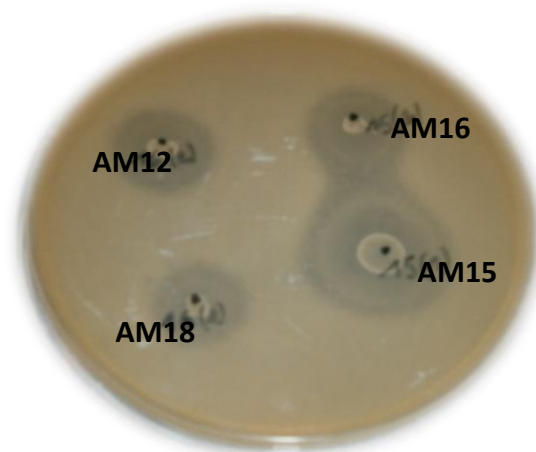


Figure 18 : L'activité antagoniste des souches (*Weissella cibaria* AM12, *Lactobacillus plantarum* AM15 et AM18, *Lactobacillus paracasei* AM16) par méthode **fleming et al., 1975** vis- à-vis *Listeria ivanovii*.

Tableau 10 : L'étude de l'activité antibactérienne des souches lactiques par la méthode directe

Souches		
Inhibitrices \ Indicatrice	<i>Listeria ivanovii</i>	<i>Listeria innocua</i>
AM1	+	-
AM3	+	+
AM4	+	+
AM5	-	+
AM6	+	+
AM10	+	+
AM10*	+	+
AM11	+	+
AM12	+	+
AM13	+	+
AM14	+	-
AM15	+	+
AM16	-	+
AM17	+	+
AM18	+	+
AM19	+	+
AM20	+	+
AM21	+	+
AM22	+	+
AM23	+	+
AM24	+	+
AM25	+	+
AM27	+	-
AM29	+	-
V1	+	+
V3	+	+
N3	+	+
N3*	+	+
N72	+	-
O61	+	+
O72*	+	-

+ : reaction positive, - : reaction negative

La capacité inhibitrice *in vitro* des bactéries lactiques vis-à-vis des germes pathogènes démontre une bonne propriété probiotique, comme lors qu'elle peut jouer un rôle dans la préservation de la qualité hygiénique des denrées alimentaires (Ammor *et al.*, 2006).

La mesure des zones d'inhibition par nos souches contre les bactéries indicatrices par la méthode des puits a été démontrée dans (Figure 19, 20, 21 et Tableau 11). Les résultats indiquent que nos souches ont inhibé la plupart des souches indicatrices mais la souche de *Pseudomonas fluorescens* présentait une inhibition la plus élevée (12 à 24 mm) pour toutes les souches alors que *Weissella cibaria* AM10 présentait la plus faible inhibition contre *Brouchotrix thermophaca* et *Salmonella enterica* serovar thyphimurium (6 mm). L'absence d'activité inhibitrice contre *Serratia marcescens* et *Clustridium tyrobutyricum* a été démontrée par toutes les souches. Les souches testées ont montré un large spectre antimicrobien, capable d'être actif contre les bactéries Gram-positives et Gram négative.

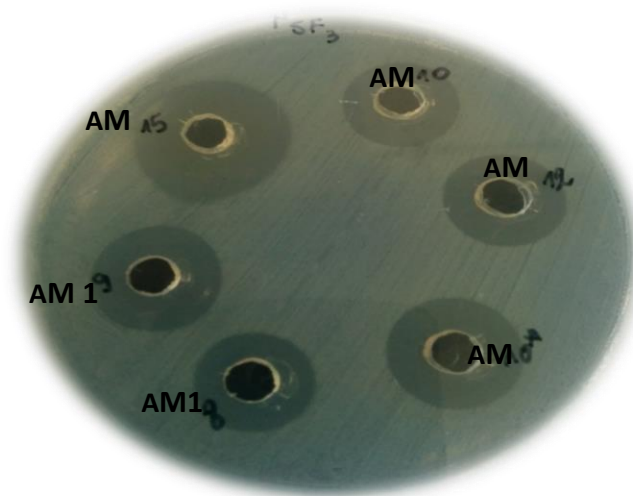


Figure 19 : Interaction bactérienne par la méthode indirect des souches de *Weissella cibaria* (AM10, AM12, AM10*) et *Lactobacillus plantarum* (AM15, AM18 et AM19) vis-à vis *Pseudomonas fluorescens*

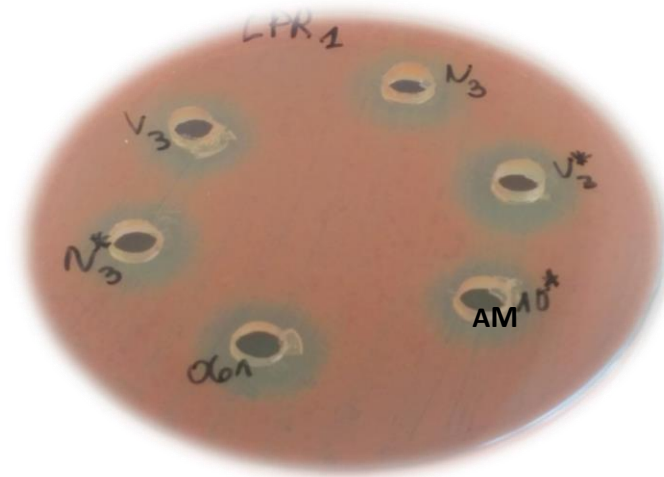


Figure 20 : Interaction bactérienne par la méthode indirect des souches de *Leuconostoc mesenteroides* (V3, V3*, N3*, N3 et O61) et *Weissella cibaria* (AM10*) vis-à vis *Chryseobacterium joostei*

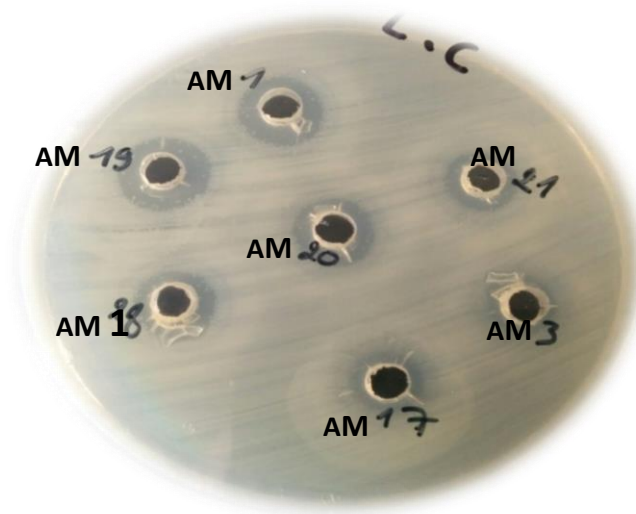


Figure 21 : Interaction bactérienne par la méthode indirecte des souches de *Weissella cibaria* (AM10), *Lactobacillus plantarum* (AM3, AM17, AM19, AM20 et AM18) vis-à vis *Listeria innocua*

Tableau 11 : L'étude de l'activité antibactérienne des souches lactiques par la méthode indirecte

Souches	AM1	AM3	AM4	AM5	AM6	AM10	AM10*	AM11	AM12	AM13	AM14	AM15	AM16	AM17	AM18	AM19	AM20	AM21	AM22	AM23	AM24	AM25	AM27	AM29	O72*	O61	N72	N3*	N3	V3	V1	
<i>E. Coli</i>	13	10	11	15	13	11	9	13	11	11	-	13	7	14	12	14	12	12	12	15	10	6	13	-	14	10	11	13	-	12	12	5
<i>S. aureus</i>	10	9	15	-	10	16	10	8	12	10	16	20	11	12	21	13	12	12	12	13	-	9	12	11	15	16	15	14	14	13	16	
<i>Listeria ivanovii</i>	15	18	14	12	13	15	15	12	11	15	12	21	13	21	11	16	20	19	20	9	8	12	14	17	10	16	11	12	13	14	16	
<i>Listeria innocua</i>	14	9	9	16	11	17	16	-	10	12	14	22	11	10	12	14	12	10	18	-	6	-	9	13	11	12	10	10	10	12	10	
<i>Enterobacter Cloacae (PS25)</i>	/	/	/	/	/	9	10	/	-	/	/	16	/	/	12	/	/	/	/	/	/	/	/	/	10	10	10	10	10	10	/	
<i>Chryseobacterium joostei</i>	/	/	/	/	/	13	11	/	14	/	/	20	/	/	19	/	/	/	/	/	/	/	/	/	14	14	16	12	12	12	/	
<i>Brouchotrix thermosphacta</i>	-	6	6	-	-	7	-	-	10	6	14	18	-	-	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	10	-	-	6	/		
<i>L. monocytogen</i>	/	/	/	/	/	14	9	/	11	/	/	25	/	/	14	/	/	/	/	/	/	/	/	/	10	-	12	17	11	-	/	
<i>Pseudomonas. aerogenosa</i>	/	/	/	/	/	15	13	/	14	/	/	17	/	/	12	/	/	/	/	/	/	/	/	/	12	-	14	13	13	12	/	
<i>Pseudomonas. fluorescens</i>	12	-	15	12	14	18	17	13	17	13	17	24	-	24	22	-	18	12	12	16	13	12	12	12	16	17	19	17	17	18	/	
<i>Serratia marcescens</i>	/	/	/	/	/	-	-	/	-	/	/	-	/	/	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-	-	-	-	-	-	/	
<i>Salmonella enterica serovar thyphimurium</i>	/	/	/	/	/	10	12	/	6	/	/	17	/	/	16	/	/	/	/	/	/	/	/	/	13	12	13	13	11	13	/	
<i>Klebsella sp.</i>	/	-	10	-	13	13	13	-	15	12	12	16	-	12	10	-	-	10	13	-	-	-	-	-	-	11	9	12	12	13	/	

2. 1.1. Détermination de la nature de substance inhibitrice

2. 1.1.1. Inhibition due à la production d'acides organiques ou de peroxyde d'hydrogène

Les résultats après élimination de l'effet des acides organiques du surnageant des souches indiquées que 36,49% des souches perte de l'activité inhibitrice nous laissent supposer que l'inhibiteur majeur pour ces souches est les acides organiques alors que 64,51% des souches ont inhibé les souches indicatrices, confirmé l'existence d'autres substances antibactériennes telles que le peroxyde d'hydrogène, et les bactériocines (**Tableau 12**)

L'intervention du peroxyde d'hydrogène dans les phénomènes d'inhibition par les bactéries lactiques a été établie. Lorsqu'il est libéré à des concentrations suffisantes, il peut provoquer l'inhibition de certains contaminants (**Bourgeois et Larpent, 1996**).

2. 1.1.2. Inhibition due à la production de substance de la nature protéique

La bactériocine est une substance d'une nature protéique qui joue un rôle important dans le domaine alimentaire en prolongeant la durée de conservation et en empêchant la croissance de bactéries pathogènes (**Nes, 2011**).

Les résultats de traitement du surnageant des nos souches par protéinase K vis-à-vis de *Pseudomonas fluorescens*, ont révélé une sensibilité à cette protéase par une disparition de la zone d'inhibition qui indique la nature protéique de substance (**Figure 22**)

L'inactivation de l'agent inhibiteur par les enzymes protéolytiques est observée par de nombreux chercheurs qui ont démontré qu'il s'agit d'une bactériocines qui ont été dégradées par ces enzymes (**Klaenhammer, 1993, Floriano et al., 1998, Deraz et al., 2005, Kumar et al., 2010**).

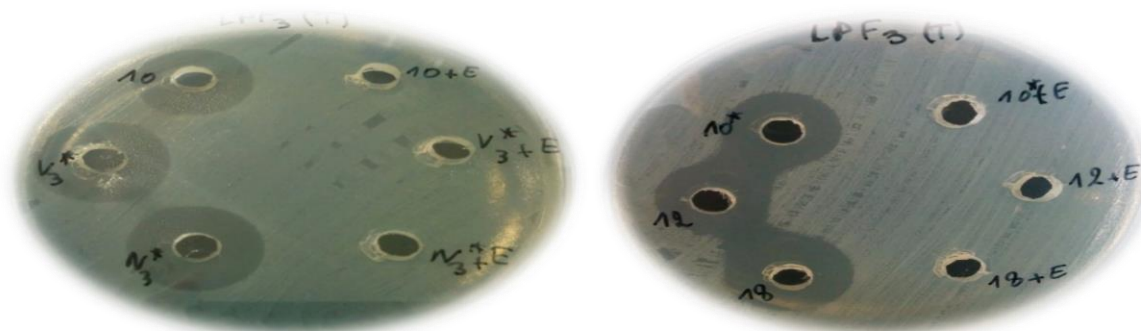


Figure 22 : Interaction bactérienne par la méthode indirecte des souches de *Weissella cibaria* AM10, AM10* et AM12), de *Leuconostoc mesenteroides* (V3 et N3*) et de *Lactobacillus plantarum* (AM18), traité et non traité par protéinase K vis-à vis de *Pseudomonas fluorescens*

Tableau 12 : L'étude de l'activité antibactérienne des souches lactiques cultivées en MRS tamponnée à pH 7

Souches	AM1	AM3	AM4	AM5	AM6	AM10	AM10*	AM11	AM12	AM13	AM14	AM15	AM16	AM17	AM18	AM19	AM20	AM21	AM22	AM23	AM24	AM25	AM27	AM29	O72*	O61	N72	N3*	N3	V3	V1
<i>E. Coli</i>	-	-	9	-	11	10	7	-	10	9	/	12	-	13	11	10	12	10	14	-	-	-	/	-	8	8	11	/	11	11	5
<i>S. aureus</i>	-	-	13	/	8	14	6	-	9	8	10	18	-	10	19	10	10	10	11	/	9	-	-	-	13	12	13	11	12	10	16
<i>Listeria ivanovii</i>	-	-	11	-	12	14	12	-	11	14	10	17	-	16	9	14	15	14	17	-	8	-	-	-	10	12	9	12	12	13	16
<i>Listeria innocua</i>	-	-	7	-	9	15	14	/	9	12	10	19	-	9	10	11	9	9	13	/	6	/	-	-	9	9	9	10	9	12	10
<i>Enterobacter Cloacae (PS25)</i>	/	/	/	/	/	9	8	/	/	/	/	13	/	/	11	/	/	/	/	/	/	/	/	/	8	10	9	9	10	10	/
<i>Chryseobacterium joostei (LPR1)</i>	/	/	/	/	/	12	10	/	12	/	/	16	/	/	15	/	/	/	/	/	/	/	/	/	9	11	12	11	12	11	/
<i>Brouchotrix thermosphacta</i>	/	-	6	/	6	6	/	/	8	-	-	15	/	/	13	/	/	/	/	/	/	/	/	/	6	8	/	/	/	6	/
<i>L. monocytogenes</i>	/	/	/	/	/	12	6	/	7	/	/	15	/	/	13	/	/	/	/	/	/	/	/	/	8	/	11	13	10	/	/
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	/	/	/	/	/	14	11	/	11	/	/	14	/	/	10	/	/	/	/	/	/	/	/	/	10	/	12	11	12	12	/
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	/	14	-	12	17	15	-	16	12	11	19	/	18	19	/	12	9	15	-	8	-	-	-	12	16	17	15	15	16	/
<i>Salmonella enterica serovar thyphimurium</i>	/	/	/	/	/	6	6	/	-	/	/	15	/	/	14	/	/	/	/	/	/	/	/	/	11	9	11	10	10	10	/
<i>Klebsella sp.</i>	/	/	9	/	12	11	12	/	11	10	9	14	/	11	9	/	/	-	12	/	/	/	/	/	/	9	6	10	10	12	/

2. 1. 2. Caractéristiques physico-chimiques de la substance protéique

✓ *Effet de la température*

La stabilité de la température est importante si les bactériocines doivent être utilisées comme conservateur alimentaire, car de nombreuses procédures de préparation des aliments impliquent une étape de pasteurisation ou de stérilisation.

L'effet de différentes températures sur l'activité des nos souches est présenté dans le **Tableau 13**. En ce qui concerne l'effet de la température sur la stabilité, la bactériocine des nos souches était thermostable au traitement thermique vis-à-vis de *Listeria ivanovii* à 60°C, 80°C et 100°C pendant 30 min, par contre l'activité de la bactériocine après chauffage à 121°C pendant 15 min était thermostable pour les souches *Lactobacillus plantarum* (AM15, AM19, AM21, AM22), *Lactobacillus praeacasei* (AM13), *Weissella cibaria* (AM10, AM10*, AM12) et *Leuconostoc mesenteroides* (N72), et complètement disparu par les souches *Lactobacillus plantarum* (AM17, AM18, AM20, AM24), *Lactobacillus praeacasei* (AM6), *Weissella cibaria* (AM14), *Weissella confusa* (AM4) et *Leuconostoc mesenteroides* (V1, V3, N3, N3*)

Saad et al., 2015 ont rapporté des résultats similaires avec notre découverte de perte d'activité de substances antibactériennes produites par *Lactobacillus acidophilus* après traitement thermique à 121° C pendant 15 min. En ce qui concerne la stabilité de la température, la bactériocine de nos souches présentait une forte stabilité à la chaleur, ce qui signifie qu'elle pourrait être placée dans le groupe de bactériocines de faible poids moléculaire stable à la chaleur.

Tableau 13: Effet de la température sur l'activité de la bactériocines des souches vis-à-vis *Listeria ivanovii*

Souches	Diameter de la zone d'inhibition en mm			
	60°C	80°C	100°C	121°C
AM4	11	11	11	-
AM6	12	12	12	-
AM10	14	14	14	14
AM10*	12	12	12	12
AM12	11	11	11	11
AM13	14	14	14	14
AM14	10	10	10	-
AM15	17	17	17	17
AM17	16	16	16	-
AM18	9	9	9	-
AM19	14	14	14	14
AM20	15	15	15	-
AM21	14	14	14	14
AM22	17	17	17	17
AM24	8	8	8	-
V1	16	16	-	-
V3	13	13	13	-
N3	12	12	12	-
N3*	12	12	12	-
N72	9	9	9	9

✓ *Sensibilité au pH*

La sensibilité de la bactériocine à différentes valeurs de pH a été examinée et elle était stable à pH (2, 4 et 8). Alors que son activité a légèrement diminué en augmentant la valeur du pH jusqu'à 10 (**Tableau 14**). Cette bactériocine était stable sur une large gamme de pH, qui est une caractéristique commune à de nombreuses bactériocines, comme rapporté par (**Ogunbanwo *et al.*, 2003; Corsetti *et al.*, 2004; Rattanachaikunsopon et Phumkhachorn, 2006 et Todorov et Dicks, 2006**). La tolérance la large gamme de pH indique qu'une telle bactériocine peut être utile dans les aliments acides et non acides

Tableau 14 : Effet du pH sur l'activité de la bactériocines des souches

Souches	Diameter de la zone d'inhibition en mm				
	pH7 (Témoin)	pH2	pH4	pH8	pH10
AM4	11	11	11	11	8
AM6	12	12	12	12	10
AM10	14	14	14	14	-
AM10*	12	12	12	12	-
AM12	11	11	11	11	9
AM13	14	14	14	14	11
AM14	10	-	10	10	-
AM15	17	17	17	17	13
AM17	16	16	16	16	13
AM18	9	9	9	9	-
AM19	14	-	14	14	-
AM20	15	-	-	15	-
AM21	14	-	14	14	-
AM22	17	16	16	17	12
AM24	8	-	8	8	-
V1	16	-	15	14	-
V3	13	13	13	13	10
N3	12	12	12	12	10
N3*	12	12	12	9	10
N72	9	-	9	9	-

2. 1.3. La cinétique de croissance de *Listeria ivanovii* et *Pseudomonas fluorescens* en cultures pures et mixtes

La détermination de la nature protéique des substances antimicrobiennes permet de sélectionner des souches les plus performants tels que *Leuconostoc mesenteroides* (V1, V3 et N3), *Weissella confusa* (AM4), *Weissella cibaria* (AM10 et AM12), *Lactobacillus paracasei* (AM6 et AM13) et *Lactobacillus plantarum* (AM15, AM17 et AM22).

La croissance en culture pure en temps 0 de nos souches lactiques sont varié entre 6,23- 6,93 log UFC/ml, de *Pseudomonas fluorescens* était 6,83 log UFC/ml et de *Listeria ivanovii* de 6,22 log UFC/ml (**Figure 23**). Après incubation jusqu'à 24 h on remarque une augmentation de croître de nos souches lactiques entre 7,95- 9,65 log UFC/ml, de *Pseudomonas fluorescens* de 8,89 log UFC/ml et *Listeria ivanovii* de 8,26 log UFC/ml.

Les résultats en culture mixte ont montré une diminution de la croissance des souches de *Pseudomonas fluorescens* et *Listeria ivanovii* due à une inhibition par nos souches après 24 h par rapport la culture pure (**Figure 24, 25, 26 et 27**). Cette inhibition est combinée par la production d'acidité et /ou la production des substances antimicrobiennes des résultats similaires a été observée par (**Ammor, 2006 et Guessas, 2006**).

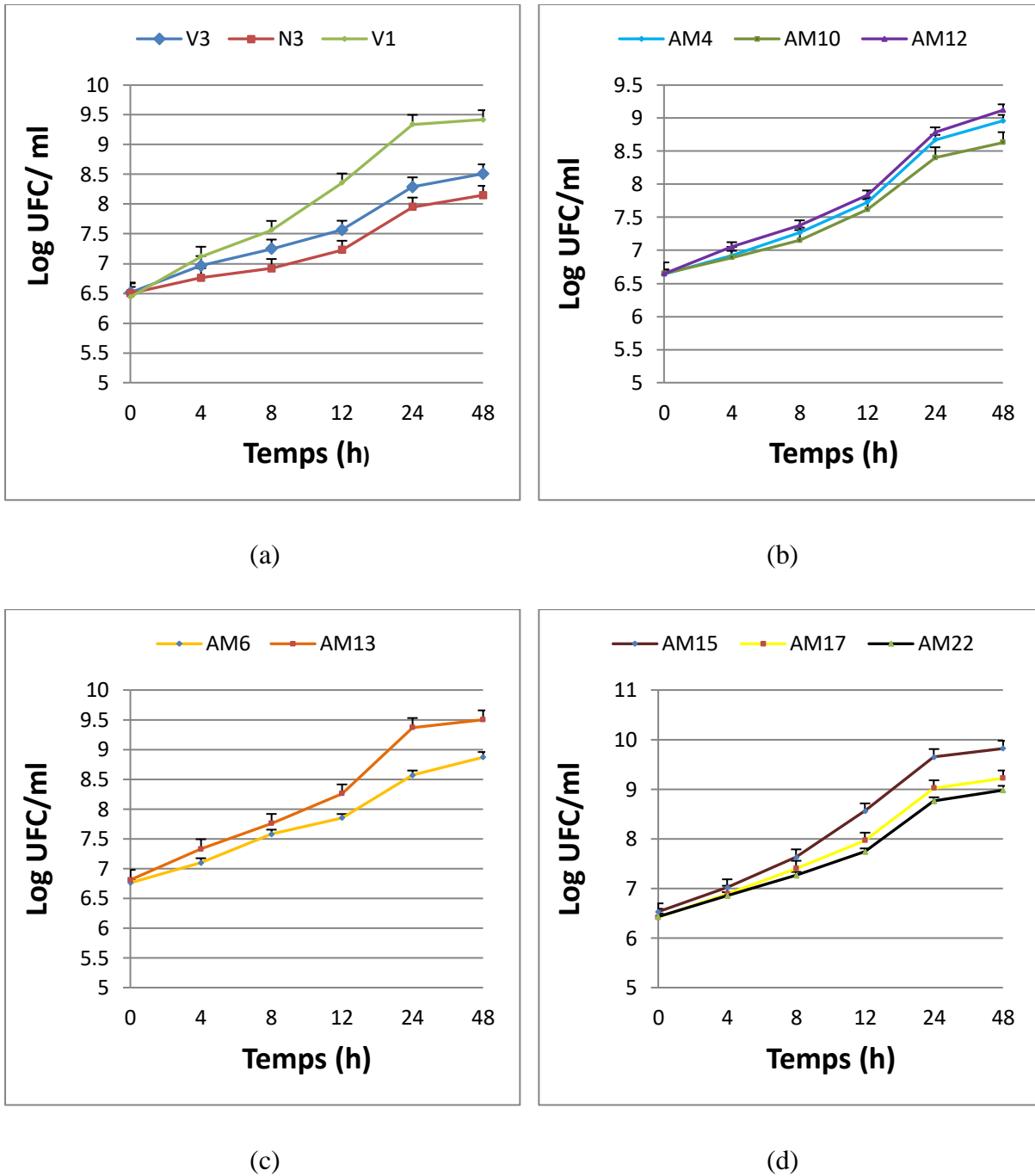


Figure 23 : Cinétique de croissance en culture pure chez (a) : *Leuconostoc mesenteroides* (V1, V3 et N3), (b) : *Weissella cibaria* (AM10 et AM12) et *Weissella confusa* (AM4), (c) : *Lactobacillus paracasei* (AM6 et AM13), (d) : *Lb. plantarum* (AM15, AM17 et AM22)

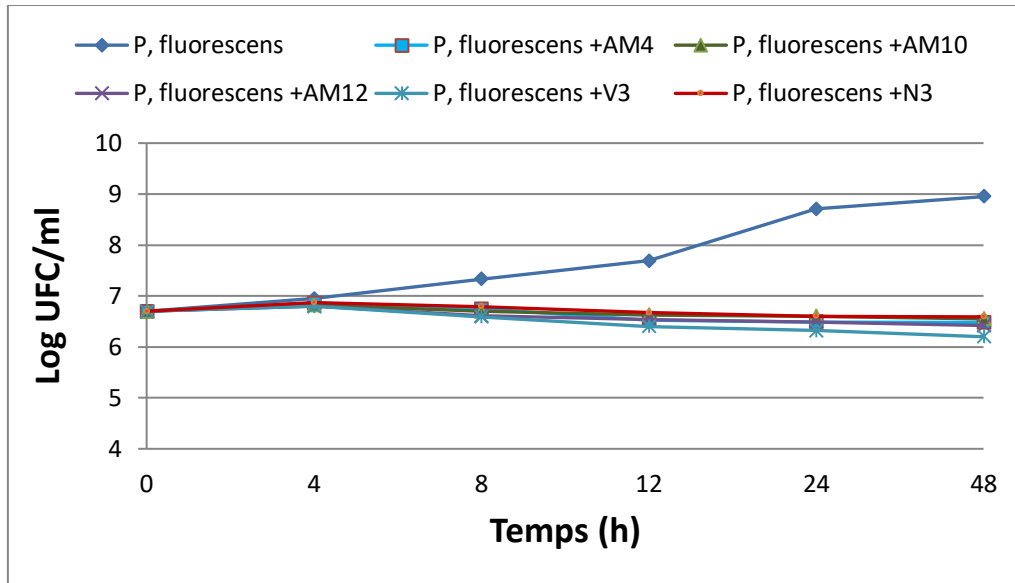


Figure 24 : Cinétique de croissance de souche *Pseudomonas fluorescens* en culture pure et culture mixte avec *Weissella confusa* (AM4), *Weissella cibaria* (AM10 et AM12) et *Leuconostoc mesenteroides* (V3 et N3) dans lait écrémé à 30°C.

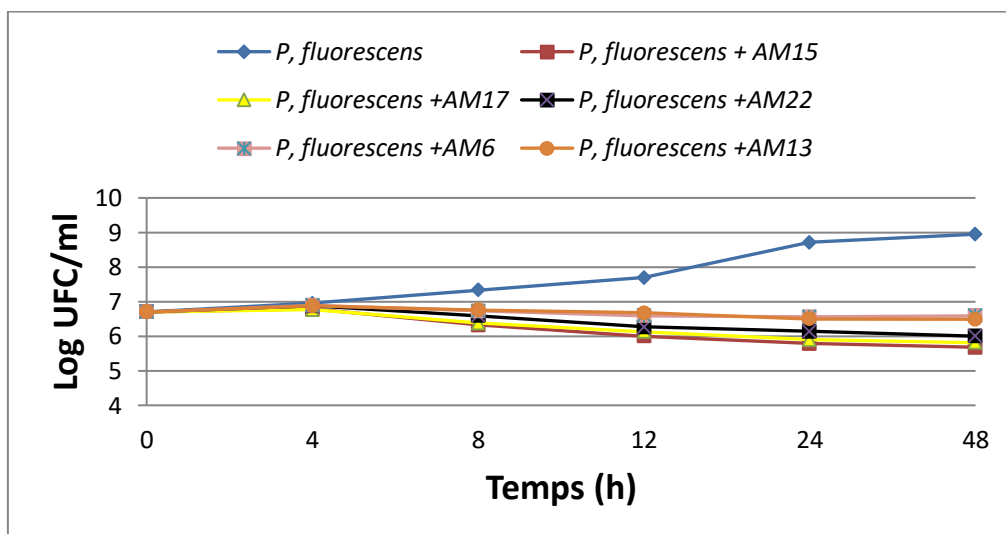


Figure 25 : Cinétique de croissance de souche *Pseudomonas fluorescens* en culture pure et culture mixte avec *Lactobacillus plantarum* (AM15, AM17 et AM22) et *Lactobacillus paracasei* (AM6 et AM13) dans lait écrémé à 30°C

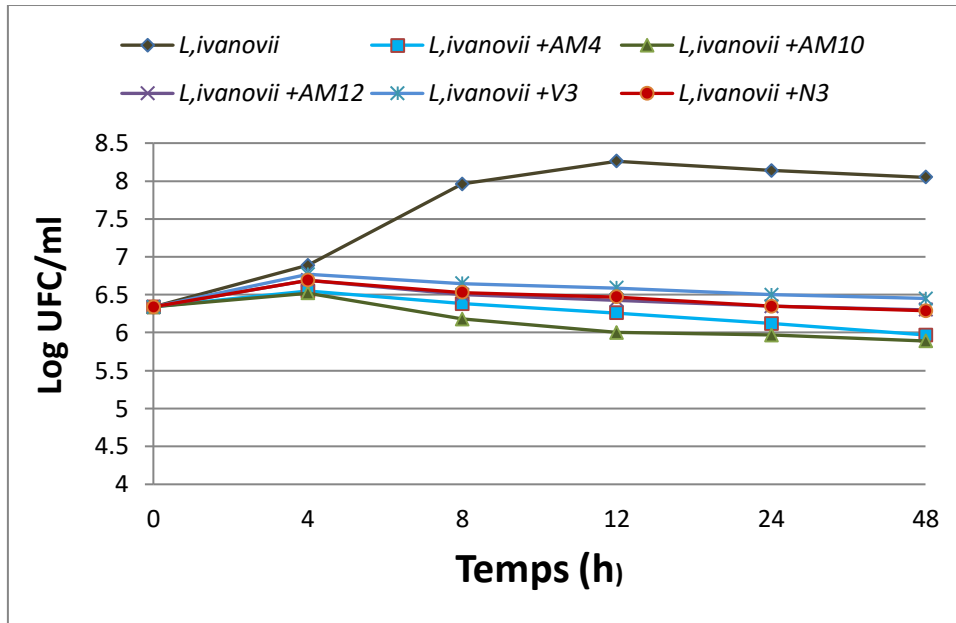


Figure 26 : Cinétique de croissance de souche *Listeria ivanovii* en culture pure et culture mixte avec *Weissella confusa* (AM4), *Weissella cibaria* (AM10 et AM12) et *Leuconostoc mesenteroides* (V3 et N3) dans lait écrémé à 30°C

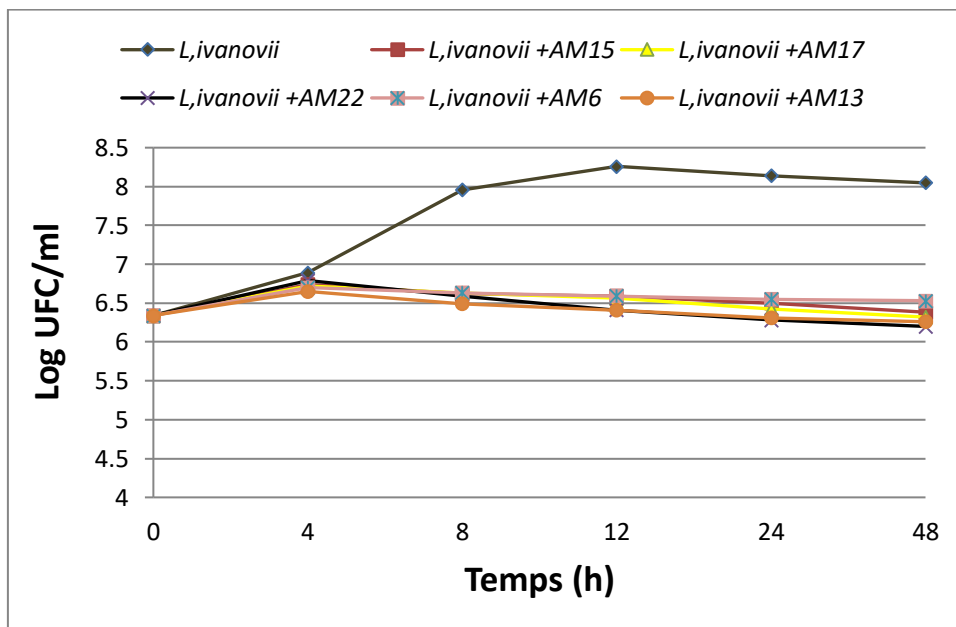


Figure 27 : Cinétique de croissance de souche *Listeria ivanovii* en culture pure et culture mixte avec *Lactobacillus plantarum* (AM15, AM17 et AM22) et *Lactobacillus paracasei* (AM6 et AM13) dans lait écrémé à 30°C.

2. 2. Pouvoir acidifiant

Le pouvoir acidifiant est basé sur la conversion des hydrates de carbone en acide lactique. Cette conversion est l'une des étapes les plus importantes pour l'industrie alimentaire. La fermentation du lait est une transformation des produits laitiers par une fermentation essentiellement lactique conduisant à l'acidification et à la gélification du lait (**Béal & Sodini, 2012**). La croissance des bactéries lactiques est caractérisée par la formation de composés acides tels que l'acide lactique, qui s'accumulent dans leur environnement pendant la fermentation. La production de l'acide lactique a été surveillée en fonction du temps en utilisant les cultures pures des souches *Leuconostoc mesenteroides* (V1, V3 et N3), *Weissella confusa* (AM4), *Weissella cibaria* (AM10 et AM12), *Lactobacillus paracasei* (AM6 et AM13) et *Lactobacillus plantarum* (AM15, AM17 et AM22). Les résultats de la variation du pH et l'acidité des souches testées sont démontrés dans (**Figure 28 et 29**).

La variation du pH et de l'acidité des nos souches a révélé que les souches *Leuconostoc mesenteroides* (V1), *Lactobacillus plantarum* (AM15, AM17 et AM22) et *Lactobacillus paracasei* (AM6 et AM13) ont montré une forte activité acidifiante de 71°D avec pH 4.5, 73°D avec pH 4.5, 63°D avec pH 5, 58°D avec pH 5.2, 66°D avec pH 4.8 et 78°D avec pH 4.2 respectivement pendant 48h. Alors que les souches *Leuconostoc mesenteroides* (V3 et N3) et *Weissella confusa* (AM4) et *Weissella cibaria* (AM4, AM10 et AM12) montre une faible acidification, ces souches ne peuvent pas être considérées comme des souches acidifiantes, elles peuvent donc être utilisées pour la production des saveurs et pour les opérations de post-acidification. Par conséquent, les différences des propriétés acidifiantes dépendent de la spécificité de chaque souche et des espèces, comme il a été rapporté dans plusieurs études (**Xanthopoulos et al., 2001 ; Badis et al., 2004**).

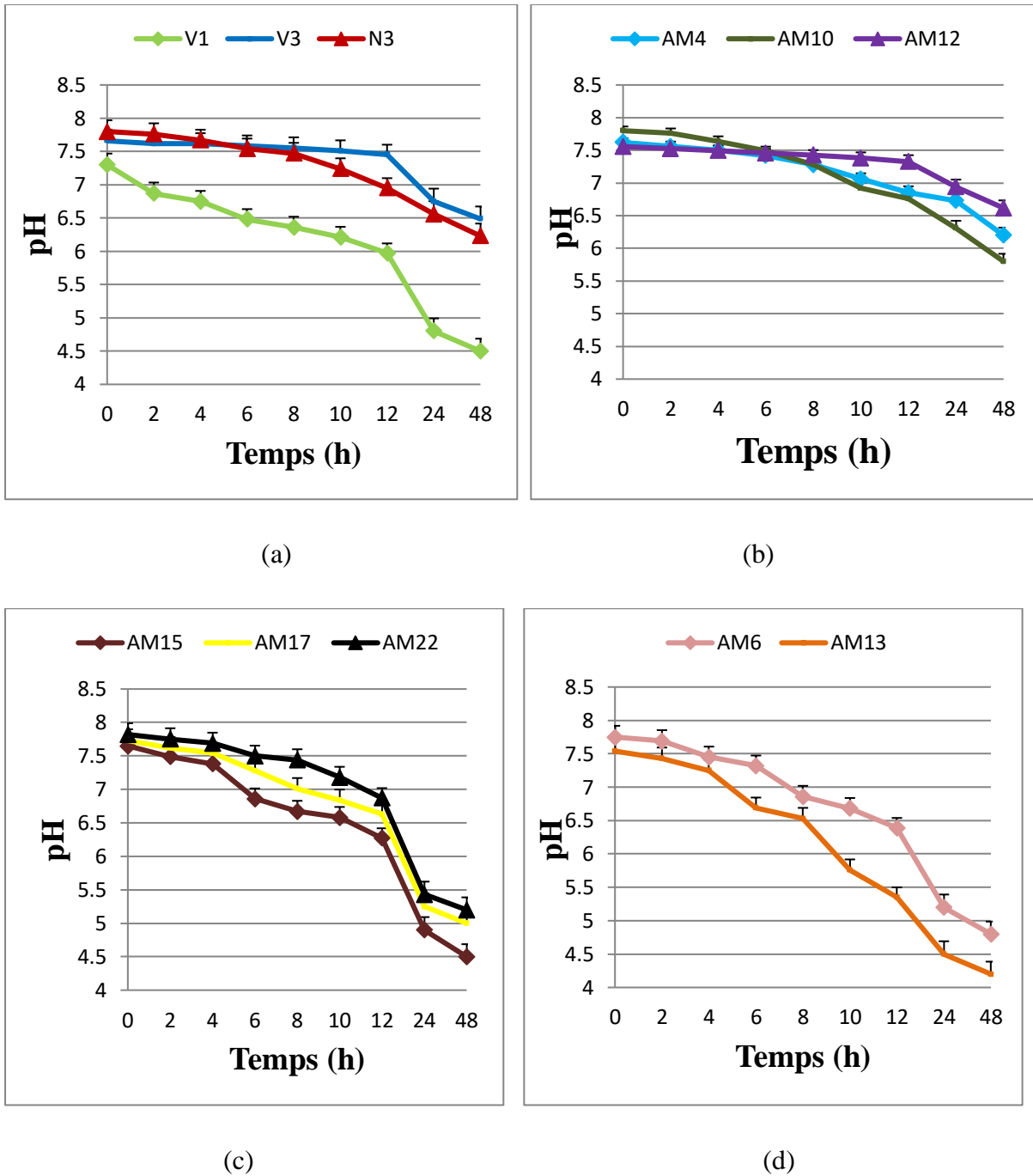


Figure 28: Evolution du pH chez (a) : *Leuconostoc mesenteroides* (V1, V3 et N3), (b) : *Weissella cibaria* (AM10 et AM12) et *Weissella confusa* (AM4), (c) : *Lactobacillus plantarum* (AM15, AM17 et AM22), (d) : *Lb. paracasei* (AM6 et AM13)

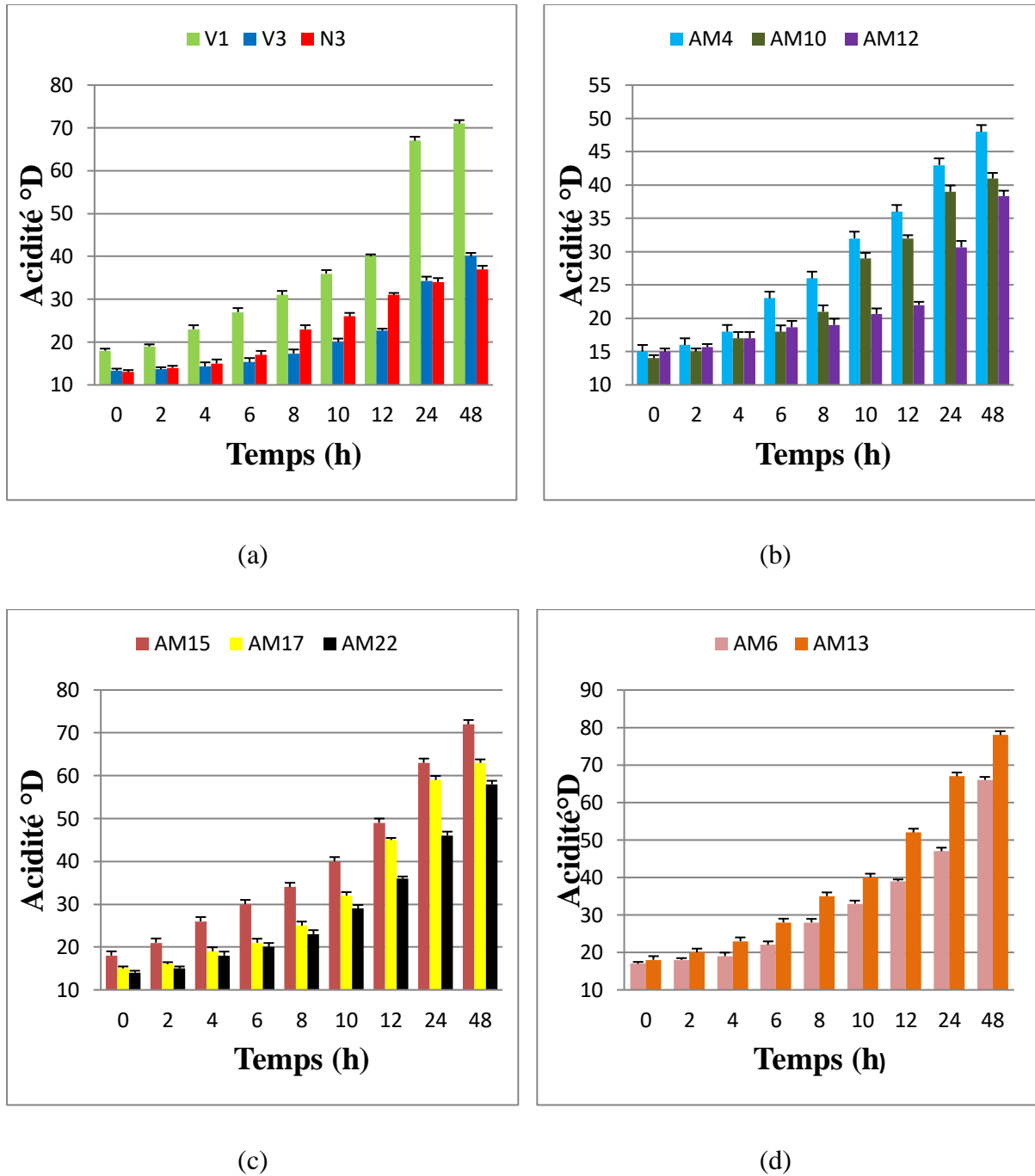


Figure 29: Evolution de l'acidité Dornic chez (a) : *Leuconostoc mesenteroides* (V1, V3 et N3), (b) : *Weissella cibaria* (AM10 et AM12) et *Weissella confusa* (AM4), (c) : *Lactobacillus plantarum* (AM15, AM17 et AM22), (d) : *Lb. paracasei* (AM6 et AM13)

2.3. Pouvoir protéolytique

L'activité protéolytique est importante pour la caractérisation technologique des bactéries lactiques car elle leur donne la capacité de croître efficacement dans le lait et également pour l'amélioration de la qualité organoleptique du produit final. L'activité protéolytique des nos souches a été traduite par la présence d'un halo clair entourant la tache sur de la gélose PCA additionnée de 2% de lait écrémé indiquant la capacité d'hydrolyse de la caséine. Les résultats obtenus lors de la réalisation de ce test sont illustré dans le (Tableau 15 et Figure 30). Il apparait que les souches *Lactobacillus plantarum* (AM15 et AM17), *Lb. paracasei* (AM6, et AM13), *Weissella cibaria* AM10 et AM12) et *Leuconostoc mesenteroides* (V3 et N3) sont fortement protéolytiques comparativement aux autres souches. Une absence total de l'activité pour les souches *Lactobacillus plantarum* (AM22) et *Leuconostoc mesenteroides* (V1).

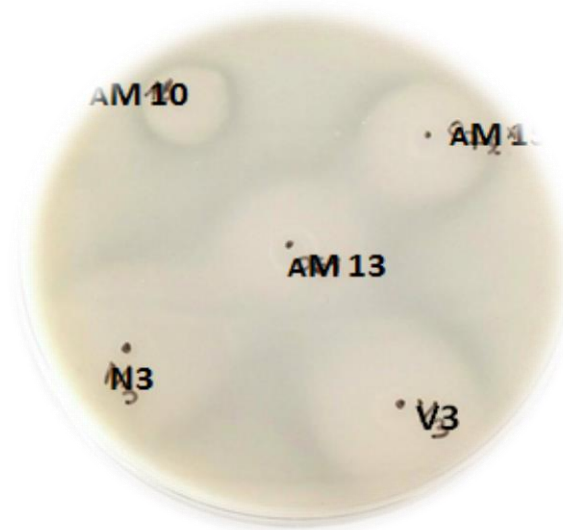


Figure 30 : L'activité protéolytique des souches *Weissella cibaria* AM10, *Lactobacillus paracasei* AM13, *Lactobacillus plantarum* AM15 et *Leuconostoc mesenteroides* N3 et V3

2. 4. Pouvoir lipolytique

Les résultats de l'activité lipolytique des nos souches sont reportés dans le **Tableau 15**. Il on remarque une absence de l'activité lipolytique pour toutes les souches. Ces résultats sont en accord avec (Stackebrandt *et al.*, 2002), qui ont montré que la lipolyse est relativement faible dans les ferments lactiques, et selon Morandi *et al.*, 2013, qui a montré l'absence d'activité lipolytique chez *Leuconostoc mesenteroides*.

2. 5. Pouvoir texturant

2. 5.1. Production et Quantification d'exo polysaccharides (EPS)

Les EPS produites par les bactéries lactiques sont devenues des composés intéressants en raison de leurs applications économiques potentielles dans l'industrie alimentaire en tant qu'additifs alimentaires naturels et sûrs pour améliorer la douceur, les propriétés rhéologiques, la texture, la sensation en bouche et la stabilité des produits alimentaires finaux (**Ruiz-Rodriguez et al. , 2017**). Les résultats de la production d'EPS (**Figure 31**) montrent que les souches *W. confusa* AM4, *W.cibaria* (AM10 et AM12), *Leuconostoc mesenteroides* (V3, V1 et N3) et *Lactobacillus plantarum* (AM17) étaient positives pour la production d'exopolysaccharides par contre les souches *Lactobacillus plantarum* (AM15, AM17 et AM22) et *Lactobacillus paracasei* (AM6 et AM13) ne produisent pas l'exopolysaccharides. Les LAB appartenant au genre *Leuconostoc* et *Weissella* sont connus pour produire des EPS (**Maina et al., 2008**)

Les résultats de la quantification des EPS produits par les souches V3, N3, AM4, AM12, AM17 et AM10 étaient respectivement l'équivalent de 100 mg/l, 99 mg/l, 150 mg/l, 180 mg/l, 30 mg/l et 200 mg/l. La quantité de EPS rapportée par (**Chelagat Muigei et al., 2013**) pour *Leuconostoc mesenteroides* et *Weissella* a été produite à 193,55 mg / L et 244,5 mg / L qui a affirmé nos résultats.

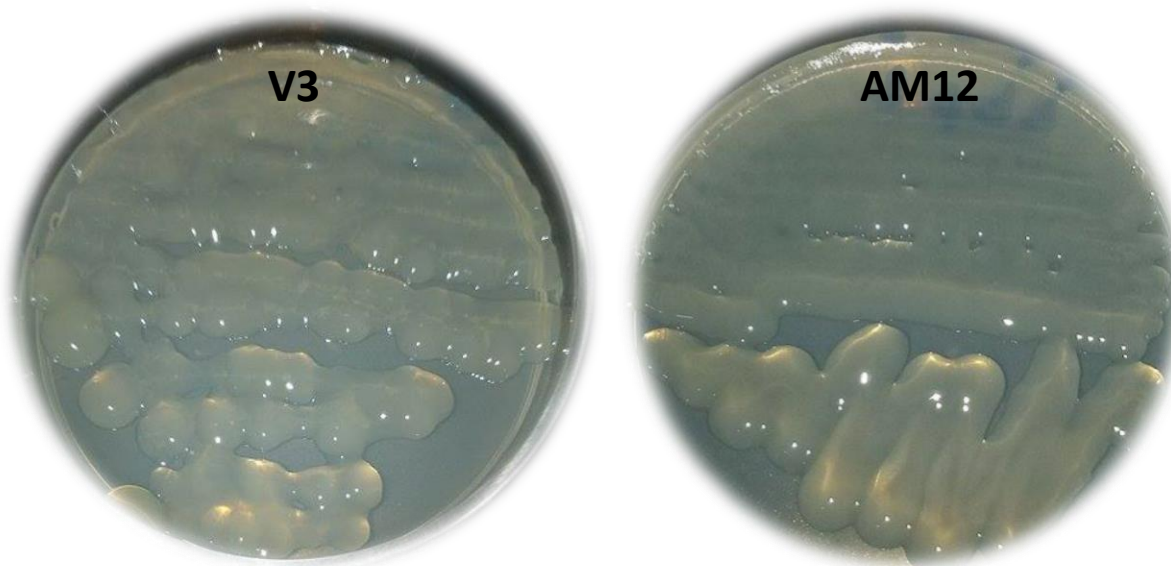


Figure 31 : Aspect des souches *Leuconostoc mesenteroides* V3 et *Weissella cibaria* AM12 productrices d'exopolysaccharides sur milieu hypersaccharosé

2. 6. Pouvoir aromatisant

Les bactéries lactiques sont capables de produire de nombreux composés aromatiques à partir de différents substrats qui participent aux qualités organoleptiques des produits fermentés (Cholet, 2006). La plupart des composés aromatiques sont issus du métabolisme du citrate : l'acétoïne et le diacétyl sont les plus importants (François *et al.*, 2007). Le métabolisme du citrate et du lactose entraîne la production de diacétyl, d'acétoïne et de CO₂, participant aux qualités aromatiques et texturales des produits (Raynaud *et al.*, 2003). Les résultats apparaissent que les souches *Lactobacillus plantarum* (AM17), *Lactobacillus paracasei* (AM6 et AM13), *Weissella cibaria* (AM12) et *Leuconostoc mesenteroides* (N3, V3) ont la capacité de produire des arômes (acétoïne) qui a été traduit par la présence d'un anneau rouge en surface de tube (Figure 32). Une absence la capacité à produire des arômes pour les souches *Lactobacillus plantarum* (AM15 et AM22), *Weissella confusa* (AM4), *W. cibaria* (AM10) et *Leuconostoc mesenteroides* (V1).

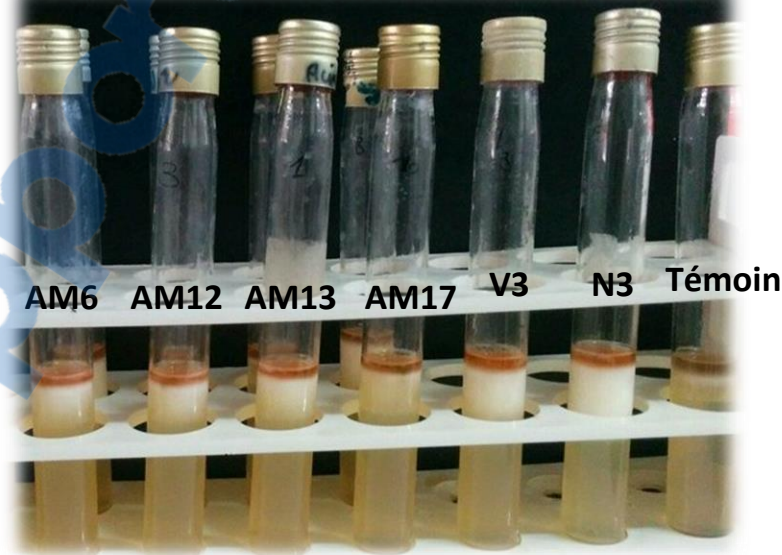


Figure 32 : La production d'acétoïne des souches de *Lactobacillus paracasei* AM6 et AM13, de *Weissella cibaria* AM12, de *Lactobacillus plantarum* AM17 et de *Leuconostoc mesenteroides* V3 et N3.

Tableau 15 : Quelque caractère technologique des isolats

	Production des EPS	Activité lipolytique	Activité protéolytique (mm)	Production de l'arome
AM4	+	-	11	-
AM6	-	-	15	+
AM10	+	-	13	
AM12	+	-	14	+
AM13	-	-	17	+
AM15	-	-	20	-
AM17	+	-	13	+
AM22	-	-	-	-
V1	+	-	-	-
V3	+	-	31	+
N3	+	-	28	+

3. Critères de performance

3. 1. Activité hémolytique

L'étude de l'activité hémolytique a été étudiée sur la gélose Columbia au sang. Ce milieu est utilisé pour la détection et la détermination des caractéristiques hémolytiques d'une souche bactérienne donnée. Les zones d'hémolyse se manifestent comme suit : β -hémolyse (zones claires autour des colonies), α -hémolyse (zone avec reflets verdâtres)

La détermination de l'activité hémolytique est l'une des exigences de sûreté des souches probiotiques. Les microorganismes probiotiques doivent être dénués de toutes formes de pathogénicité (FAO/OMS, 2002).

Aucune zone d'hémolyse de type alpha ou bêta n'a été observée autour des colonies des nos souches cultivées sur gélose Columbia au sang humain indiquant n'a pas été capable d'hydrolyser le sang humain. Ces résultats sont accordés par (**Benmechernene et al., 2013**)

3. 2. Résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques est considérée comme une condition préalable à la sélection d'une souche probiotique (**FAO / OMS, 2002**). La susceptibilité et la résistance de LAB à divers antibiotiques varient selon les espèces (**Mathur et Singh, 2005, Danielsen et Wind, 2003**). Le profil de résistance ou la sensibilité des souches pour 12 type d'antibiotiques est démonté dans (**Figure 33** et au **Tableau 16**). Les souches AM4, AM13, AM12, AM15, V1 et V3 étaient résistantes à la Fosfomycine, à l'Oxacilline et à la Kanamycine avec sensibilité au chloramphénicol, à la clindamycine, à la doxycycline et à l'ampicilline.

Tableau 16 : Résultats de test sensibilité des antibiotiques

Antibiotique	Symbole	AM4	AM6	AM10	AM12	AM13	AM15	AM17	AM22	V1	V3	N3
Amoxilline /Acide clavulanique	AUG	I	S	S	S	S	I	S	S	I	I	I
Clindamycine	CD	S	S	R	S	S	R	I	R	I	S	S
Tobramycine	TOB	I	R	R	I	I	I	R	I	R	I	I
Amikacine	AK	S	S	R	I	I	R	S	S	R	S	S
Tetracycline	TE	S	S	S	I	I	I	S	S	I	S	S
Doxycycline	DO	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
Chloramphenicol	C	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
Oxacicline	OX	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R
Rifampicine	RA	S	S	I	I	R	I	R	R	I	S	S
Fosfomycine	FF	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ampiciline	AMP	S	S	I	S	I	I	S	S	R	S	S
Kanamycine	K	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R

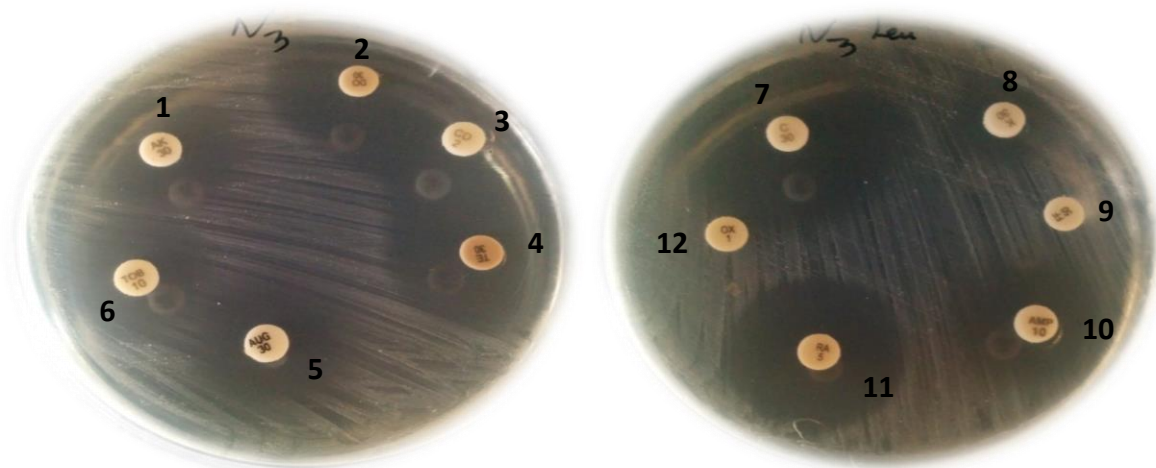


Figure 33 : Test antibiotiques de souche *Leuconostoc mesenteroides* N3.

- | | |
|------------------------------------|---------------------|
| 1 : Amikacine | 7 : Chloramphenicol |
| 2 : Doxycycline | 8 : Kanamycine |
| 3 : Clindamycine | 9 : Fosfomycine |
| 4 : Tetracycline. | 10 : Ampiciline |
| 5 : Amoxilline/ Acide clavulanique | 11 : Rifampicine |
| 6 : Tobramycine | 12 : Oxaciclín |

4. Profil probiotiques

4. 1. Tolérance à l'acidité

La tolérance à l'acide des bactéries est importante non seulement pour les stases gastro-résistantes, mais aussi pour leur utilisation en tant que compléments alimentaires et permet aux souches de survivre plus longtemps dans les aliments riches en acide sans réduction plus importante chez les humains (**Prasad et al., 1998**). Bien que le pH de l'estomac puisse augmenter jusqu'à 6,0 ou plus haut après une prise de nourriture, généralement cette valeur est comprise entre 2,5 à 3,5 (**Huang et Adams, 2004**). L'étude de l'exposition prolongée de nos souches aux conditions acides similaires à celles de l'estomac a été réalisée par exposer à différents pH (2, 3 et 4) pendant 3 h. Les résultats obtenus sont illustrés dans le (**Tableau 17**). Les résultats de la résistance au pH indique que les souches de *Leuconostoc mesenteroides* (N3, V1 et V3), *Weissella confusa* (AM4) et *Weissella cibaria* (AM10) n'était pas viable à pH 2 mais survie à pH3 et pH 4 après 3h d'exposition, tandis que *Lactobacillus paracasei* (AM6 et AM13), *Weissella cibaria* (AM12) et *Lactobacillus plantarum* (AM15, AM17 et AM22) ont une viabilité à pH 2, 3 et 4. Ces résultats étaient en corrélation avec des données antérieures qui rapportaient l'absence de viabilité bactérienne à un pH de 2,0 (**Huang et Adams, 2004; Klingberg et al., 2005; Paramithiotis et al., 2006**). **Benmechernene et al., 2013** qui ont rapporté que la souche *Leuconostoc mesenteroides* Z8 n'était pas viable à pH 2 mais viable à pH 3 et 4.

Tableau 17: effet du pH acide sur la viabilité des souches

	pH2		pH3		pH4	
	0 h	3 h	0 h	3h	0 h	3 h
AM4	7,68±0,02	0	8,15±0,04	7,98±0,02	8,22±0,1	8,07±0,06
AM6	8,23	6,2	8,33	8,31	8,39	8,42
AM10	8,5	0	8,65	8,71	8,68	8,84
AM12	8,40±0,04	5,36	9,03±0,05	9,12±0,03	9,08±0,04	9,15±0,07
AM13	9,12±0,07	6	9,52±0,02	9,19±0,05	9,27±0,04	9,05±0,02
AM15	7,89±0,3	5,27	7,92±0,03	8,04±0,04	7,86±0,02	7,95±0,03
AM17	8,34	6,48	8,42	8,54	8,65	8,69
AM22	8,76	5,86	8,96	8,92	9,07	8,95
V1	5,13	0	7,45	7,67	7,14	7,77
V3	8,25±0,2	0	8,51±0,02	8,32±0,1	8,43±0,03	8,09±0,05
N3	6,32	0	6,81	7,2	6,84	7,26

Tous les résultats sont exprimés en log UFC/ml.

4. 2. Résistance et hydrolase du sel biliaire

La résistance aux sels biliaries est l'un des critères importants pour la sélection des souches probiotiques, car l'intestin grêle et le côlon sont les premières niches de colonisation de l'organisme hôte par les souches probiotiques (Aynur Ahmadova *et al.*, 2013). Les résultats obtenus sont démontrés dans le **Tableau 18**.

L'exposition des cultures de nos souches à différentes concentrations de sel biliaire a modérément affecté la viabilité des souches. De même, il est mentionné qu'aucune souche n'hydrolyse le sel biliaire. Ces résultats sont similaires ceux obtenus par d'autres auteurs (Housseini *et al.*, 2009 ; Benmechernene *et al.*, 2013 ; Elavarasi *et al.*, 2014).

Tableau 18: Effet des différentes concentrations des sels biliaries sur les souches

	0.5%		1%		2%	
	0 h	4 h	0 h	4 h	0 h	4 h
AM4	8,23±0,06	7,95±0,2	8,30±0,02	8,02±0,03	8,15±0,1	7,59±0,07
AM6	7,65	7,53	7,6	7,69	7,62	7,71
AM10	8,33	7,89	8,25	8,12	8,29	7,64
AM12	9,13±0,08	8,06±0,04	9,43±0,03	7,86±0,03	9,09±0,02	7,05±0,06
AM13	7,77±0,03	7,85±0,08	7,73±0,06	7,89±0,08	7,67±0,02	7,73±0,3
AM15	8,85±0,02	8,78±0,05	8,64±0,2	8,05±0,04	8,68±0,2	7,89±0,05
AM17	7,76	7,74	7,59	7,53	7,47	7,38
AM22	6,34	6,46	6,25	6,12	6,18	6,07
V1	7,75	7,23	7,80	7,25	7,79	7,09
V3	8,44±0,05	8,26±0,2	8,42±0,7	8,36±0,02	8,52±0,06	8,20±0,09
N3	6,58	6,36	6,43	6,33	6,42	6,14

Tous les résultats sont exprimés en log UFC/ml.

4. 3. Résistance à la pepsine

La digestion protéique commence dans l'estomac. La pepsine est libérée par les cellules principales de l'estomac sous la forme d'un précurseur : le pepsinogène Il est activé en pepsine sous l'action de l'acide chlorhydrique et son pH optimal d'activité est compris entre 1 et 2.

La survie des souches dans la présence de 3 mg / ml de pepsine à pH 2 et 3 a été évaluée (**Tableau 19**). L'exposition de la pepsine à pH2 n'a eu aucun effet observable et aucune viabilité après 3h d'incubation mais l'exposition de la pepsine à pH3 révélé une viabilité pour toutes les souches testées. Donc nos résultats indiquent une résistance à la pepsine à pH3. Ces résultats sont similaires avec (**Benmechernene et al., 2013**). Ces résultats indiquent que les souches résistent aux effets de la pepsine pendant le transit gastrique.

Tableau 19: Effet de la pepsine à différents pH sur la viabilité des souches

	Pepsine (pH2)		Pepsine (pH3)	
	0 h	3 h	0 h	3 h
AM4	7,56±0,04	0	7,63±0,03	7,55±0,02
AM6	8,28	0	8,46	8,32
AM10	6,74	0	6,83	6,65
AM12	8,98±0,05	0	8,82±0,1	8,88±0,09
AM13	8,14±0,02	0	8,28±0,05	8,35±0,02
AM15	8,38±0,03	0	8,45±0,2	8,21±0,05
AM17	9,15	0	9,24	8,95
AM22	6,59	0	6,67	6,52
V1	8,10	0	8,13	7,88
V3	9,15±0,02	0	8,98±0,04	8,87±0,03
N3	7,03	0	7,34	7,09

Tous les résultats sont exprimés en log UFC/ml.

4. 4. Hydrophobicité

L'hydrophobicité de la paroi cellulaire est une propriété physico-chimique qui facilite le premier contact entre les microorganismes et les cellules hôtes. Ainsi, elle semble être un facteur aidant à l'adhérence, mais elle ne contribue pas à une bonne adhésion (**Roos et Jonsson, 2002 ; Guglielmottia et al., 2007**).

Ce test permet d'évaluer l'hydrophobicité de la surface cellulaire de nos souches vis-à-vis du xylène qui peut refléter le potentiel de colonisation des ferments aux mucus intestinale. La répartition des cellules entre la phase aqueuse et le xylène résulte de l'interaction hydrophobe entre les microorganismes et les hydrocarbures.

Les pourcentages obtenus de l'adhérence de nos souches au xylène indiquent l'hydrophobicité de leur surface. Les résultats de ce test sont démontré dans (**Figure 34**).

Ces résultats montrent que les souches mises au test présentent une bonne hydrophobicité, cela témoigne une bonne sélectivité des surfaces membranaires. La valeur la plus faible est enregistrée avec la souche *Leuconostoc mesenteroides* N3 (49.19%) et la plus élevée est la souche *Leuconostoc mesenteroides* V3 (85.49%) et la souche *Lactobacillus plantarum* AM15 (85.02%). Ces résultats qui étaient significativement plus élevés que pour les autres bactéries probiotiques telles que *L. mesenteroides* NRRL B1149 (42,9%) (**Shukla et al., 2014**) *Lactococcus acidophilus* (38,1%), *Lactococcus casei* (24,1%), *Lactococcus lactis* (31,3%) (**Zago et al., 2011**).

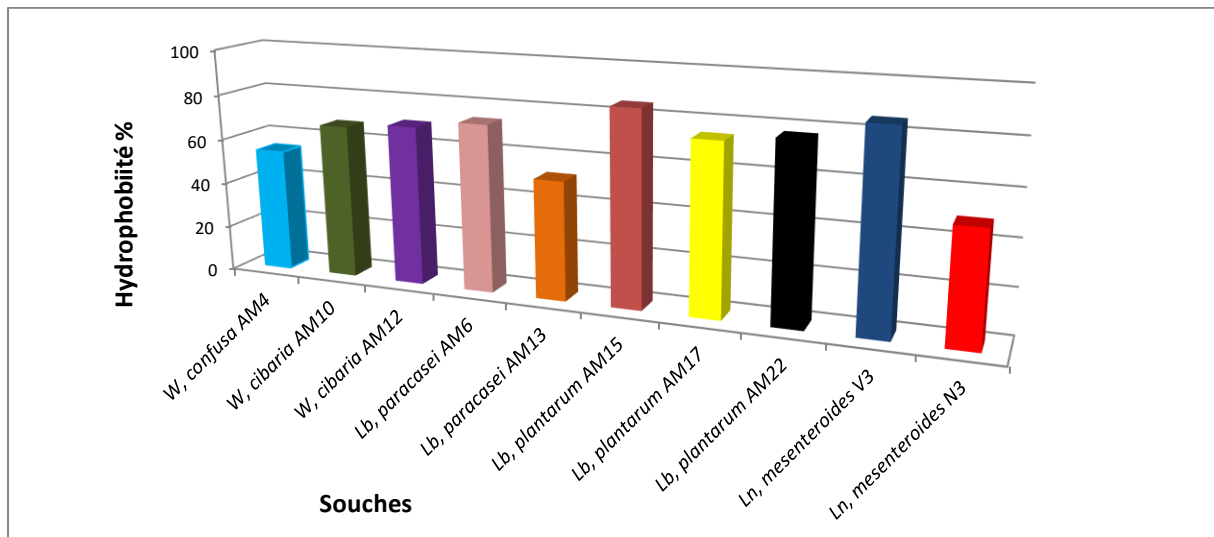


Figure 34: Pourcentage des hydrophobicité des souches

4. 5. Auto-agrégation

Potentiel d'auto-agrégation des cellules joue un rôle important dans l'adhésion aux cellules intestinales (Dunne *et al.*, 2001), et dans la prévention de la colonisation par des agents pathogènes (Boris *et al.*, 1998). L'auto-agrégation est la capacité des bactéries à interagir de manière non spécifique, condition préalable à la colonisation et à la persistance du tractus gastro-intestinal (Del Re *et al.*, 2000).

Les résultats des tests d'auto-agrégation sont présentés dans la (Figure 35). L'auto-agrégation la plus forte a été observée chez *Lactobacillus plantarum* AM17, dont le pourcentage d'auto-agrégation atteint 76.36% après incubation de 3h, suivis de *Lactobacillus plantarum* AM15 (67.5%) et *Weissella cibaria* AM12 (59.16%). Nos résultats sont accordés avec Del Re *et al.*, 2000 qui rapportés, que les probiotiques devraient avoir un potentiel d'auto-agrégation supérieure à 40%. Kassaa *et al.*, 2014, qui rapporté des valeurs d'auto-agrégation de 30 à 76% de différentes souches de *Lactobacillus*.

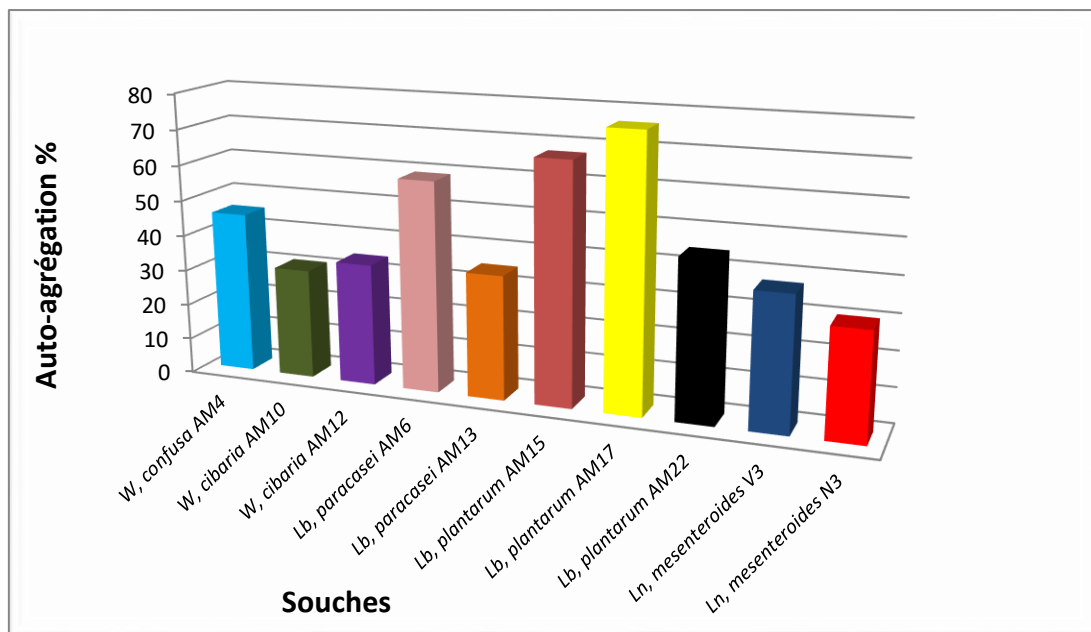


Figure 35 : Pourcentage des auto-agrégations des souches

5. Evaluation de l'activité antioxydante par DPPH

Le DPPH est un radical libre stable avec une absorbance maximale à 517 nm dans l'éthanol. Lorsque le DPPH rencontre une substance donneuse de protons telle qu'un antioxydant, le radical est récupéré et l'absorbance est réduite (Yang *et al.*, 2008).

Les inhibitions les plus fortes le radical DPPH (Figure 36) ont été trouvés pour le *Lactobacillus paracasei* AM13 (69,94%) suivis par *Leuconostoc mesenteroides* V3 (66,47%) et les moins 32,91% avec *Lactobacillus plantarum* AM15.

Des résultats similaires ont été rapportés par Osuntoki *et al.*, 2010 que le LAB isolé à partir d'aliments fermentés africains à récupérer entre 6,3 et 33,7% d'activité d'inhibition du DPPH, et Maryam *et al.*, 2012 ont signalé que *L. plantarum* isolé à partir d'échantillons de fruits présentait la plus forte activité d'inhibition du DPPH (50,8%).

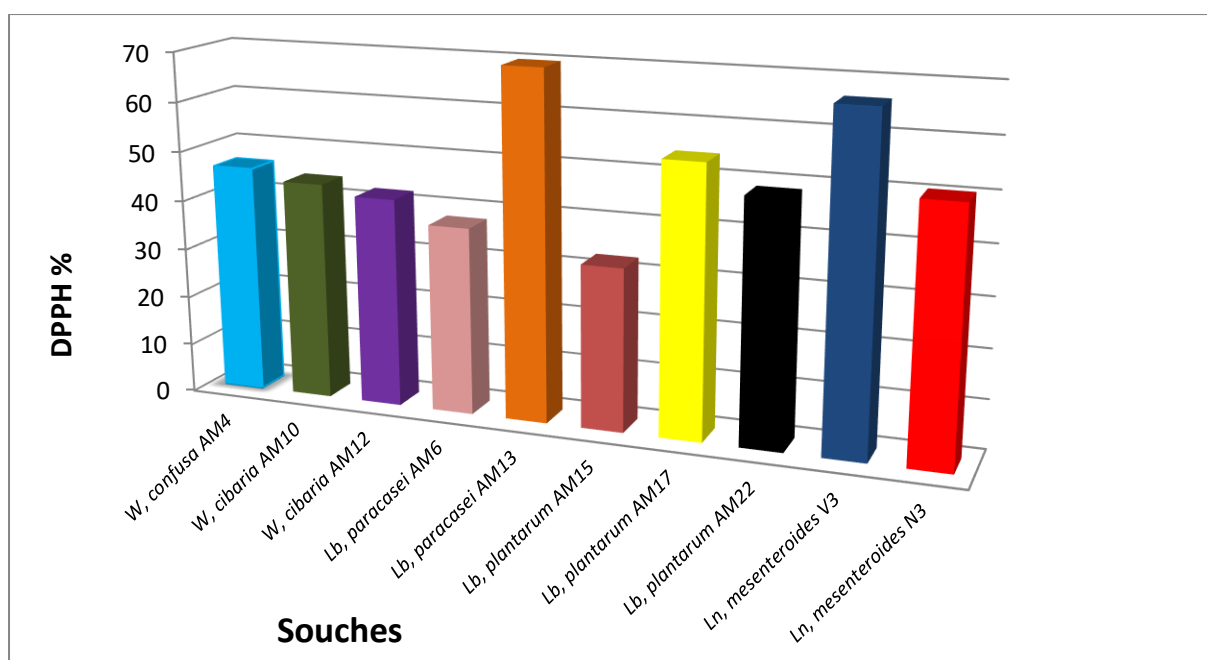


Figure 36 : Pourcentage des inhibitions le DPPH radical des souches

6. Activité anti-formation du biofilm

L'inhibition de la formation de biofilms par les agents pathogènes est une cible attrayante pour une intervention thérapeutique (Bjarnsholt *et al.*, 2013) qui a reçu une attention significative ces dernières années, conduisant à la découverte d'inhibiteurs de biofilms pour la plupart des pathogènes bactériens couramment rencontrés (Melander et Melander, 2015; Rabin *et al.*, 2015).

L'activité antibiofilm des surnageants des nos souche contre *E.coli*, *Listeria ivanovii*, *Pseudomonas fluorescens* et *klebsiella* sp sont représentés dans (Figure 37)

L'étude a révélé une activité anti-adhésion plus élevée contre *Pseudomonas fluorescens* (62,7–80,32%), suivie de *Listeria ivanovii* (42,02-76,28%), *E.coli* (44,6-65,9) et de *klebsiella* sp (19,08 -74,2%).

Sadri *et al.*, 2016 ont rapporté une modérée en potentiel anti-biofilm de *L. casei* et *L.acidophilus*, qui inhibait 46,7 et 25,3% respectivement de l'adhésion de souche *E. coli*, qui étaient moins que l'activité antibiofilm des nos souches. La différence pourrait être associée aux différentes caractéristiques des bactéries lactiques et des agents pathogènes (Zamani *et al.*, 2018)

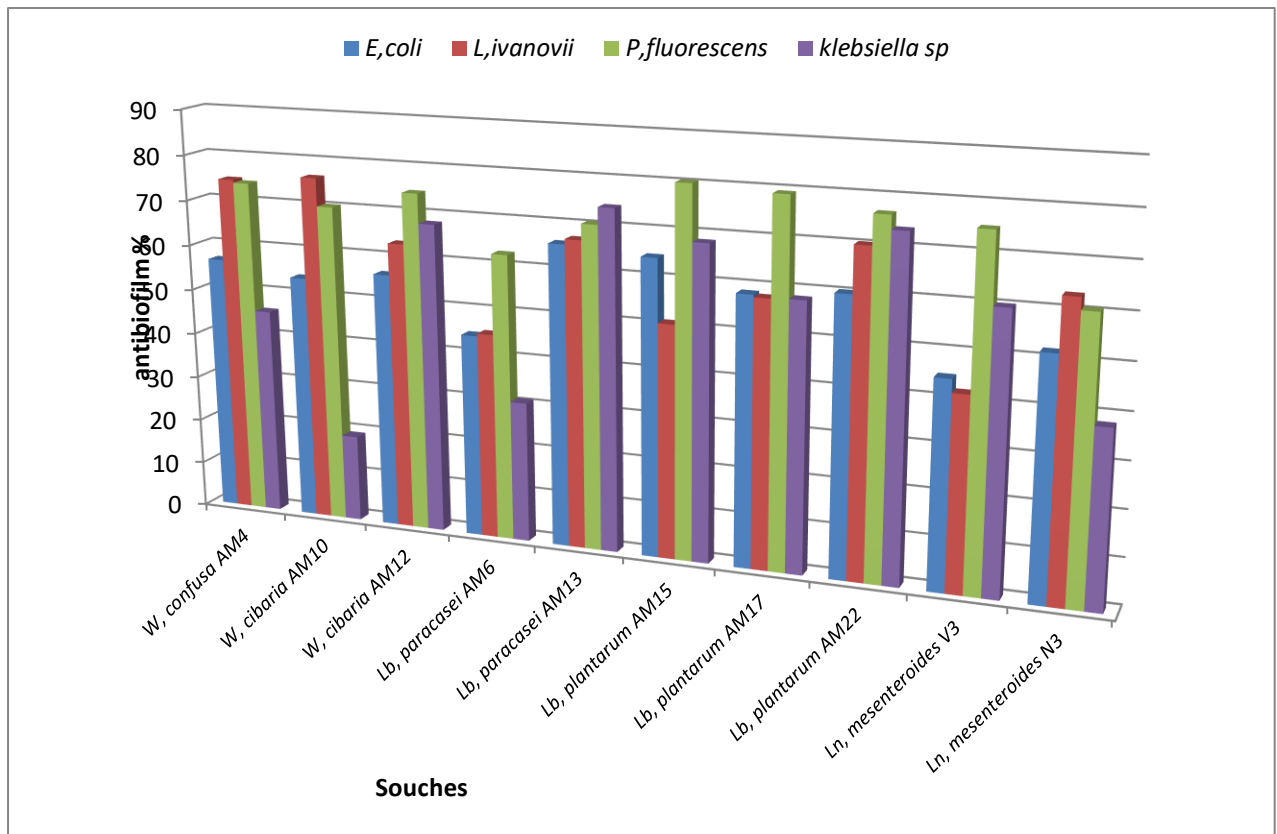


Figure 37 : Effet des surnageant des souches lactiques sur l'adhésion de *E. coli*, *Listeria ivanovii*, *Pseudomonas fluorescens* et *Klebsiella sp.*

Conclusion

Dans cette étude, les 31 souches isolés ayant une activité antimicrobienne ont été identifiées par caractérisations phénotypiques et séquençage du gène ADNr 16S comme *Leuconostoc mesenteroides* (V1, V3, V3*, N3, N3*, N72*, O61 et O72*), *Weissella cibaria* (AM10, AM10*, AM12 et AM14), *Weissella confusa*, (AM4), *Lactobacillus plantarum* (AM3, AM15, AM17, AM18, AM19, AM20, AM21, AM22 et AM24), *Lactobacillus casei* (AM1) et *Lactobacillus paracasei* (AM5, AM6, AM11, AM13, AM16, AM23 et AM25) à cette effet l'étude de leur activité antibactérienne a montré un profil d'inhibition intéressant pour toutes les souches contre les bactéries pathogènes et/ou d'altération testées. L'agent inhibiteur de 20 souches a été déterminé comme substance de nature protéique (bactériocine).

La cinétique de croissance *Pseudomonas fluorescens* et *Listeria ivanovii* en présence et en absence des nos souches a montré que la biomasse bactérienne a diminué progressivement après l'ajout des nos souches.

Les tests technologiques des 11 souches les plus performants qui produisant de bactériocine ont été montrés que toutes les souches de *Lactobacillus* et la souche *Leuconostoc mesenteroides* V1 sont satisfaisants pour une utilisation industrielle : possède une activité protéolytique et un bon pouvoir acidifiant.

Leur aspect sécuritaire des onze souches sélectionnées était non hémolytique et leur résistance aux antibiotiques était résistante à la Fosfomycine, à l'Oxacilline et à la Kanamycine.

L'étude de profil probiotique suggère que les souches pourraient être exploitées comme probiotique en raison de ses propriétés d'agrégation et de son caractère hydrophobicité et de sa la tolérance à diverses barrières biologiques telles que les acides (pH 3 et 4), les sels biliaires (05%, 1% et 2%) et pepsine 3mg / ml à pH 3 a confirmé sa capacité à survivre dans des conditions extrêmes du tube digestif.

Les activités d'inhibition du DPPH mesurées sur les souches ont varié avec des souches entre (32.91-69.94%).

La présente étude a démontré *in vitro* l'effet antibiofilm du surnageant des souches contre les quatre souches pathogènes. L'adhésion des bactéries pathogènes à leurs cellules hôtes étant un facteur de virulence important dans la pathogénicité, le surnageant des souches pourrait être proposée pour contrôler les infections causées par *Pseudomonas fluorescens*, *E.coli*, *Listeria ivanovii* et *Klebsiella* sp.

Pour conclure, notre travail nous a permis de sélectionner trois meilleures souches de *Lactobacillus plantarum* (AM15 et AM17) et *Leuconostoc mesenteroides* (V3) pourraient être considérées comme des candidats conditionnels pour une application ultérieure dans les aliments fonctionnels (probiotiques) et principalement dans la prévention et approches thérapeutiques.

En perspective, des études approfondies doivent compléter ce travail tel que :

- Expression, purification et caractérisation des bactériocines produites.
- Evaluation *in vivo* du profil probiotiques et effet antioxydant.

Références bibliographiques

A

Ahmadova, A., Todorov, S.D., Choiset, Y., Rabesona, H., Zadi, T.M., uliyev, A., Gombossy de MeloFranco, B.D., Chobert, J.M & Haertlé, T. (2013). Evaluation of antimicrobial activity, probiotic properties and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese. *Food Control*, 30(2), 631 - 641

Ahmadova, A., Todorov, S. D., Choiset, Y., et al. (2013). Evaluation of antimicrobial activity, probiotic properties and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese. *Food Control*, 30(2), 631–641

Akbas, M. Y. (2015). Bacterial biofilms and their new control strategies in food industry. PP 383-394.

Allison, K.R., Brynildsen, M.P., Collins, J.J. (2011). Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides. *Nature*, 473, 216-220.

Amatayakul, T., Halmos, A. L., Sherkat, F., & Shah, N. P. (2006). Physical characteristics of yogurts made using exopolysaccharide-producing starter cultures and varying casein to whey protein ratios. *International Dairy Journal*, 16, 40–51

Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E & Chevallier, 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 the antibacterial compound. *Food Control*, 17, 454-461.

Andrighetto, C., Zampese, L & Lombardi, A. (2001). RAPD PCR characterization of lactobacilli isolated from artisanal meat plants and traditional fermented sausages of Veneto region (Italy). *Letters in Applied Microbiology*, 33, 26–30.

B

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 and Technology*, 23, 30-37.

Badis, A., Guetarni, D., Moussa, B., Henni, D.E., Tornadijo, E & Kihal, M. (2004). Caractéristiques des bactéries d'acide lactique cultivable, isolés à partir de lait cru de chèvre

algérienne et l'évaluation de leurs propriétés technologiques. *Food Microbiology*, 21 (3), 343-349.

Baker, G.C., Smith, J.J., Cowan, D.A. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods*, 55, 541-555.

Barefoot, S.F & Klaenhammer, T.R. (1983). Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 45, 1808- 1815.

Barefoot, S.F & Klaenhammer, T.R. (1984). Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 26, 328–334.

Béal C., Marin, M., Fontaine, E., Fonseca, F et Obert, J.P. (2008). Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. In : Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). *Technique & Documentation*, Lavoisier. Paris. 661-765.

Béal, C & Sodini, I. (2012). Fabrication des yaourts et des laits fermentés, Techniques de l'Ingénieur f 6315, Paris France, 16 p.

Beganović, J., Kos, B., Leboš Pavunc, A., Uroić, K., Jokić, M., Šušković, J. (2014). Traditionally produced sauerkraut as source of autochthonous functional starter cultures. *Microbiological Research*, 169, 623–632.

Behlau I., Gilmore M.S. (2008). Microbial biofilms in ophthalmology and infectious disease. *Arch. Ophthalmol.* 126:1572–1581.

Belma, A. S. L. I. M., & Gulcin, A. L. P. (2009). The effect of immobilization on some probiotic properties of *Streptococcus thermophilus* strains. *Annals of Microbiology*, 59, 127-132.

Beloin, C., Houry, A., Froment, M., Ghigo, J.M., Henry, N. (2008). A short-time scale colloidal system reveals early bacterial adhesion dynamics. *Plos Biology*, 6:7, pp 1549-1558.

Benmechernene, Z., Chentouf, H.F., Bellil, Y., Ghazi, F., Quintela-Baluja, M., Calomata, P & Barros-Velázquez, J. (2013). Technological Aptitude and Applications of

Leuconostoc mesenteroides Bioactive Strains Isolated from Algerian Raw Camel Milk. *BioMed Research International*, 14.

Bjarnsholt, T., Ciofu, O., Molin, S., Givskov, M., and Hoiby, N. (2013). Applying insights from biofilm biology to drug development—can a new approach be developed? *Nature Reviews Drug Discovery*, 12, 791–808.

Boles, B.R., Horswill, A.R. (2008). Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog*, 4 : e1000052.

Boris, S., Suárez, J.E., Vázquez, F., Barbés, C. (1998). Adherence of human vaginal lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens. *Infection and Immunity*, 66, 1985-1989.

Bos, R., Mei, H. C., & Busscher, H. J. (1999). Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions—its mechanisms and methods for study. *FEMS microbiology reviews*, 23(2), 179-230.

Bougle C., Lcroyer R. (2003). Les cathéters vinaux centraux imprégnés de substances anti-infectieuses:Aspects techniques et études cliniques. *Journal de pharmacie clinique* ; 22(3):159-167

Bourgeois, C.M & Larpent, J.P. (1996). Microbiologie alimentaire : Aliments fermentes et fermentations alimentaires. Tome 2, pp. 523.

Brandt, M.J. (2014). Starter cultures for cereal based foods. *Food Microbiology*, 37, 41–43.

Breukink, E., Wiedemann, I., van Kraaij, C., Kuipers, O.P., Sahl, H.G., de Kruijff, B. (1999). Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science*, 286, 2361-2364.

Buddhiman T, Jyoti PT, Ulrich S, Charles MAPF, Michael G, Wilhelm HH. 2008. Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from ethnic fermented bamboo tender shoots of North East India. *International Journal of Food Microbiology*, 121(1), 35-40.

Bulgasem, B. Y., Hassan, Z., Abdalsadig, N. K. A., Yousoff, W. M. W., Musa, E. M. T. and Lani, M. N. (2015). Anti-adhesion activity of lactic acid bacteria supernatant against human pathogenic *Candida* species biofilm. *Health Science Journal*, 9, 1-9.

Burin Des Roziers M .P. C. (2002). Les biofilm. Thèse de doctorat : Ecole national Vétérinaire d'Alford.92P.

C

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

Campbell-Platt, G., & Cook, P.E. (Eds.) (1995). Fermented meats. New York: Chapman and Hall.

Caplice, E., Fitzgerald, G. F. (1999). Food fermentation: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 131-149.

Champagne, C. (1998). La production des ferments dans l'industrie laitière. Ed. *Agriculture et Agroalimentaire*, Canada, pp : 32-145.

Chelagat, M.S., Shitandi, A., Muliro, P., Rose Bitonga, O. (2013). Production of Exopolysaccharides in the Kenyan Fermented Milk, *Mursik*. *International Journal of Science and Research*, 2319-7064

Chen, H., and Hoover, D. G. (2006). Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2, 82–100.

Choi, H. J., Cheigh, C. I., Kim, S. B., Lee, J. C., Lee, D. W., Choi, S. W., et al. . (2002). *Weissella kimchisp.* a novel lactic acid bacterium from kimchi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 507–511.

Cholet, O. (2006). Etude de l'écosystème fromager par une approche biochimique et moléculaire. Institut National Agronomique Paris-Grignon. Ecole Doctorale ABIÉS. UMR de Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires INRA, INA.16.

Cintas, L.M., Casaus, L.S., Håverstein, L.S., Hernandez, P.E & Nes, I.F. (1997) Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel Sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 4321–4330

Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., Chikindas, M.L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71, 1-20.

Clutterbuck A. L., Woods E. J., Knottenbelt D. C., Clegg P. D., Cochrane C. A., Percival S. L. (2007). Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Veterinary microbiology*, 121(1), 1-17.

Cogan, T.M & Jordan, K.N. (1994). Metabolism of *Leuconostoc* bacteria. *Journal of Dairy Science*, 77, 2704-2717

Cogan, T.M. and Hill, C. (1993) Cheese Starter Cultures. In Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. 1. ed. Fox, P.F. pp.193-255. London: Chapman & Hall.

Collins, E. B & Aramaki, K. (1980). Production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science*, 63, 353 – 357.

Collins, M.D., Samelis, J., Metaxopoulos, J., Wallbanks, S. (1993) Taxonomic studies on some *Leuconostoc*-like organisms from fermented sausages - description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *Journal of applied bacteriology*, 75, 595–603

Corsetti, A., Lavermicocca, P., Morea, M., Baruzzi, F., Tosti, N. & Gobbetti, M. (2001). Phenotypic and molecular identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from wheat (species *Triticum durum* and *Triticum aestivum*) sourdoughs of Southern Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 64, 95–104.

Corsetti, A., Settanni, L., VanSinderen, D. (2004). Characterizations of bacteriocin like inhibitory (BLIS) from sourdough lactic acid bacteria and evaluation of their in vitro and in situ activity. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 521-534.

Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R, Lappin-Scott H.M. (1995) .Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* ; 49:711-745.

Costerton J. W., Stewart P. S., Greenberg E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318-1322.

Corthésy, B., Gaskins, H.R & A. Mercenier, A. (2007). Cross talk between probiotic bacteria and the host immune system. *Journal of Nutrition*, 137(3), 781– 790

Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P. (2005). Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 777-788.

D

Danielsen, M & Wind, A. (2003). Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology*, 82, 1–11.

David L., Jean M.G (2012). Infection associées aux biofilms. *médecine/science* ; 28:727- 739.

David, M. I., Eric Weinert, J., Kim, C.S. C, McGinn, J.M., Miller, S.M ., Cheyanne, K & DuPonte, M.W. (2013). Natural Farming: Lactic Acid Bacteria. *Sustainable Agriculture for food. Nature Reviews Microbiology*, 3, 777-788.

Davies, D. (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov*, 2, 114-122.

Davies, D.G., Marques, C.N. (2009). A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. *J Bacteriol*, 191, 1393-1403.

De Vuyst, L. & Leroy, F. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13, 194-199.

De Vuyst, L. & Vandamme, E.J. (1994). Nisin, a Antibiotic Produced by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*: Properties, Biosynthesis, Fermentation and Applications. In: *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications. Blackie Academic and Professional*, London, England, pp: 151-221

Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, P. (2006): Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension, *International Dairy Journal*, 16 (9).

Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M., Palenzona, D. (2000). Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Lett Applied Microbiology*, 31, 438-442.

Dellaglio, F., de Roissart, H., Torriani, S., Curk, M. C. and Janssens, D. (1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In *Bactéries Lactiques*, pp. 25-116. Edited by H. de Roissart & F. M. Luquet. Paris: Lavoisier.

Delves-Broughton, J., 1990. Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technology*, 44, 110-117.

Deraz, S.F., Karlsson, E. N., Hedström, M., Andersson, M.M et Mattiasson, B. (2005). Purification and characterization of acidocin D20079, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079. Elsevier. *Journal of Biotechnology*, 117, 343-354.

Diep, D.B., Nes, I.F. (2002). Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram-positive bacteria. *Current Drug Targets*, 3, 107-122.

Donkor, O.N., Henriksson, A., Vasiljevic, T & Shaha, N.P. (2007). Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and in vitro angiotensin converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. *INRA, EDP Sciences*, 86, 21-38.

Donlan R. M. (2002). Biofilms: Microbial life on surface. *Emerging Infectious Disease journal*. 8 (9): 881-890

Dortu, C., Thonart, P. (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêt pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Society and Environment*, 13, 143-154.

Drider, D., Fimland, G., Hechard, Y., McMullen, L.M., Prevost, H. (2006). The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70, 564-582.

Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G.C., Shanahan, F., Collins, J.K. (2001). *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 386-392.

E

EFSA. (2007). Introduction of a qualified presumption of safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. Opinion of the Scientific Committee. EFSA J 587:1-16.

Elavarasi, V., Pugazhendhi, A., Poornima Priyadharsani, T. K., Valsala, H & Thamaraiselvi, K. (2014). Screening and Characterization of *Weissella cibaria* Isolated from Food Source for Probiotic Properties. *International Journal of Computer Applications*, 29-32

Ennahar, S., Aoude-Wemer, D., Sorokine, O., Van Dorsselaer, A., Bringel, F., Hubert, J.C & Hasselmann, C. (1996). Production of pediocin AcH by *Lactobacillus plantarum* WHE 92 isolated from cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 4381-4387.

Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K., Ishizaki, A. (2000). Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 85-106.

Escamilla, G., Cradock, A. and Kawachi, I. (2000) Women and smoking in Hollywood movies: a content analysis. *American Journal of Public Health*, 90, 412-414

Espinasse F., Page B., Cottard-Bouille B. (2010). Risques infectieux associés aux dispositifs médicaux invasifs. *Revue francophone des laboratoires*, (426), 51-63.

F

Facklam, R., Elliott, J. A. (1995). Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, grampositive cocci, excluding the streptococci and enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 8, 479-495.

FAO/WHO. (2002) Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, FAO/WHO, London, Canada.

Fessard, A & Remize, F. (2017). Why Are *Weissella* spp. Not Used as Commercial Starter Cultures for Food Fermentation. *Fermentation*, 3, 38

Fey, P.D. (2010). Modality of bacterial growth presents unique targets: how do we treat biofilm-mediated infections?. *Curr Opin Microbiol*, 13, 610-615.

Filloux A., Vallet I. (2003). Biofilm:mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *M/S : médecine sciences* ; 19(1):77-83.

Fimland, G., Johnsen, L., Dalhus, B., Nissen-Meyer, J. (2005). Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure, and mode of action. *Journal of Peptide Science*, 11, 688-696.

Fleming, H. P., Etchells, J. L., Costilow, R. N. (1975). Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber brines. *Journal of Applied Microbiology*, 30: 1040-1042.

Flemming, H.C., Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*, 8, 623-633.

Floriano, B., Ruiz-Barba, J. L. et Jiminez-Diaz, R. (1998). Purification and genetic characterization of enterocin I from *enterococcus faecium* 6T1a, a novel antilisterial plasmid-encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of bacteriocins. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 4883-4890.

Foulquié Moreno, M. R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., & De Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 24.

Francois, Z. N., El Hoda, N., Florence F.A., Paul, M.F., Felicite, T.M. And El Soda, M. (2007). Biochemical Properties of Some Thermophilic Lactic Acid bacteria Strains from Traditional Fermented Milk Relevant to Their technological performance as Starter Culture. *Biotechnolog*, 6(1), 14-21

Fuller, R. (1991). Probiotics in human medicine. *Gut* 32(4), 439-442.

G

Gabrielsen, C., Brede, D.A., Hernandez, P.E., Nes, I.F., Diep, D.B. (2012). The maltose ABC transporter in *Lactococcus lactis* facilitates high-level sensitivity to the circular bacteriocin garvicin ML. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56, 2908-2915.

Gabrielsen, C., Brede, D.A., Nes, I.F., Diep, D.B. (2014). Circular bacteriocins: biosynthesis and mode of action. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(22), 6854-6862.

Galvez, A., Abriouel, H., Lopez, R.L., Ben Omar, N. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 120, 51-70.

Garneau, S., Martin, NI., Vederas, JC. (2002). Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie*, 84, 577–592.

Garvie, E.I. (1986a) *Leuconostoc*. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG (eds.) Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 2. Williams & Wilkins, London, pp 1071–1075

Ghadimi, D., Folstr-Holst, R., deVrese, M., Winkler, P., Heller, K.J., Schrezenmeirer, J. (2008). Effects of probiotic bacteria and their genomic DNA on TH1/TH2 cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of healthy and allergic subjects. *Immunobiology*, 213 (8), 677-692

Goetz, C., Dufour, S., Archambault, M., Malouin, F., & Jacques, M.(2016). Importance et contrôle de biofilms formés par les staphylocoques lors d'infections intra-mammaires chez la vache laitière : *une revue bibliographique*. PP 215-229.

Grangette, C., Nutten, S., Palumbo, E., Morath, S., Hermann, C., Dewulf, J., Pot, B., Hartung, T., Hols, P & Mercenier, A. (2005) Enhanced antiinflammatory capacity of a *Lactobacillus plantarum* mutant synthesizing modified teichoic acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 102, 10321–10326.

Guessas, B. (2006). Les potentialités métaboliques des bactéries lactiques isolés du lait cru de chèvre dans le biocontrôle de *Staphylococcus aureus*. Thèse de Doctorat en microbiologie appliquée. Université d'Oran Es-Senia.

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., Kihal, M. (2004). Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goats' milk. *African Journal of Biotechnology*, 3, 339-342.

Guglielmotta, D.M., Golowczycb, M., Jorge, A., Reinheimera, L. (2007). Probiotic potential of *Lactobacillus delbrueckii* strains and their phage resistant mutants, *International Dairy Journal*, 17, 916–925.

Guinane, C.M.; Cotter, P. D.; Hill, C & Ross, R. P. (2005), Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. *Journal of Applied Microbiology*, 8, 1316-1323.

Guiraud, J.P. (2003). Microbiologie alimentaire. Dunod éditeur. Paris : 651 P.

H

Haller, D., Colbus, H., Gänzle, M.G., Scherenbacher, P., Bode, C & Hammes, W.P. (2001). Metabolic and functional properties of lactic acid bacteria in the gastrointestinal ecosystem: a comparative in vitro study between bacteria of intestinal and fermented food origin. *Systematic and Applied Microbiology*, 24, 218-226.

Hariri, A., Ouis, N., Sahnouni, F and Bouhadi, D. (2009). Mise en oeuvre de la fermentation de certains ferments lactiques dans des milieux a base des extraits de caroube. *Revue Microbiologie Industrielle Sanitaire Environnementale*, 5, 37-55.

Harrigan, W.F., McCance, M.E. (1976). Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology, Academic Press, New York

Hassaïne, O. (2013). Caractéristiques d'intérêts technologiques de souches de bactéries lactiques isolées de lait camelin du sud Algérie. Thèse de doctorat. Université d'Oran, 180p.

Helander, M.G., Landauer, T.K., Prabhu, P.V. (1997). Handbook of Human. Computer Interaction, 2nd Edition. Elsevier Science, Amsterdam.

Hentzer, M., Givskov, M. (2003). Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *J Clin Invest*, 112, 1300-1307.

Hogg, T. (2005). Essential microbiology. John Wiley & Sons, Ltd. 188-190.

Høier, E., Janzen, T., Henriksen, C.M., Rattray, F., Brockmann, E. and Johansen, E. (1999). The production, application and action of lactic cheese starter cultures. In: *The Technology of Cheesemaking* (Law, B., ed). Academic Press, Sheffield, UK, pp. 99-131.

Holzappel, W.H. (1997). Use of starter cultures in fermentation on a household scale. *Food Control*, 8(5-6), 241-258.

Holzappel, W.H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U & Huis In't Veld, J.H. (1998). Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 41, 85-101.

Houry, A., Briandet, R., Aymerich, S., and Gohar, M. (2010) Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation. *Microbiology* 156: 1009–1018.

Hosseini, S.V., arindol, S., Bohme1, K., Fernandez, C., Calo-Mata, P., Barros – Vellazquez, J. (2009). "Molecular and proviotic characterization of bacteriocin producing *Enterococcus faecium* strains isolated from non fermented animal food". *Journal of Applied Microbiology*, 107, 1392-1403.

Hsu, S.T., Breukink, E., Tischenko, E., Lutters, M.A., de Kruijff, B., Kaptein, R., Bonvin, A.M., van Nuland, N.A. (2004). The nisin-lipid II complex reveals a pyrophosphate cage that provides a blueprint for novel antibiotics. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11, 963-967

Huang, Y., Adams, M.C. (2004). In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 91, 253–260.

Hui, Y.H. (1992). Yoghurt manufacturing. *Encyclopedia of food science and Technology*, 4, 2905-2907.

Hutkins, R.W. (2006). Microbiology and Technology of Fermented Foods. IFT Press, Blackwell Publishing, Oxford;473

I

Ingrassia, I., Leplingard, A & Darfeuille-Michaud, A. (2005). *Lactobacillus casei* sDN-114 001 inhibits the ability of adherent-invasive Escherichia coli isolated from Crohn's disease patients to adhere to and to invade intestinal epithelial cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 2880–2887.

Ito A, Sato Y, Kudo S, Sato S, Nakajima H, Takahiro T (2003). The screening of hydrogen peroxide-producing lactic acid bacteria and their application to inactivating psychrotrophic food-borne pathogens. *Current Microbiology*, 47, 231–236.

Iwatani, S., Zendo, T., Sonomoto, K. (2011). Class IId or linear and non-pediocinlike bacteriocins. In: D. Drider & S. Rebuffat (Eds.). Prokaryotic antimicrobial peptides: from genes to applications. (pp. 237-253). London: Springer.

Iyer, R., Tomar, S.K., Uma Maheswari, T., Singh, R. (2010). *Streptococcus thermophilus* strains: multifunctional lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 20, 133-141.

Izquierdo, E., Marchioni, E., Aoude-Werner, D., Hasselmann, C. and Ennahar, S. (2009). Smearing of soft cheese with *Enterococcus faecium* WHE 81, a multi-bacteriocin producer, against *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*, 26, 16–20.

J

Jabes, D., Brunati, C., Candiani, G., Riva, S., Romano, G., Donadio, S. (2011). Efficacy of the new lantibiotic NAI-107 in experimental infections induced by MDR Gram positive pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(4), 1671-1676.

Jacobsen S.M., Stickler D.J., Mobley M.L. et shitoliff M.E. (2008). Complicated Catheter associated urinary tract infectious due to *Echerichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clin Microbiol Rev* .21, 26-59

Jankovic, I., Sybesma, W., Phothirath, P., Ananta, E & Mercenier, A. (2010). Application of probiotics in food products-challenges and new approaches. *Current Opinion in Biotechnology*, 21, 175–181.

Jarvis, B., Jeffcoat, J & Cheeseman, G. C. (1968). Molecular weight distribution of nisin. *Biochemical Biophysiology Acta*, 168, 153-155

Jay, J. M. (1982). Antimicrobial properties of diacetyl. *Applied and Environmental Microbiology*, 44, 525-532

Jay, J.M., Loessner, M.J & Golden, D.A. (2005). Modern Food Microbiology 7th edition. Springer Science, USA, p. 512

Jin, Y.L., Ai, H.L., Cheng, J., Wu, M.Y. (2009). First description of a novel *Weissella* species as an opportunistic pathogen for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in China. *Veterinary Microbiology*, 136(3-4), 314-320

Johnsen, L., Fimland, G., Nissen-Meyer, J. (2005). The C-terminal domain of pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) is involved in specific recognition of the C-terminal part of cognate immunity proteins and in determining the antimicrobial spectrum. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 9243-9250.

K

Kaiser, A.L & Montville, T.J. (1996). Purification of the bacteriocin bavaricin MN and characterization of its mode of action against *Listeria monocytogenes* Scott A cells and lipid vesicles. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 4529–4535

Kaplan J. B. (2010), Biofilm Dispersal: Mechanisms, Clinical Implications, and Potential Therapeutic Uses, *Journal of Dental Research*, 89 (3): 205-215.

Karam, N.F., Dellali, A et Karam, Z.H. (2012). Activité lipolytique chez les bactéries lactiques. *Rencontre recherche ruminant*, 19.

Kassaa, I.A., HAMze, M., Hober, D., Chihib, N.E., Drider, D et al. (2014) Identification of vaginal lactobacilli with potential probiotic properties isolated from women in north Lebanon. *Microbial Ecology*, 67, 722-734.

Kawai, Y., Kemperman, R., Kok, J & Saito, T. (2004). The circular bacteriocins gassericin A and circularin A. *Current Protein & Peptide Science*, 5, 393-398.

Kempler, G.M., McKay, L.L. (1980). Improved medium for detection of citrate-fermenting *Streptococcus lactis* subsp *diacetylactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 39, 956-927

Khedid, K., Faid, M., Mokhtari, A., Soulaymani, A & Zinedine, A. (2006). Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. *Microbiology Research*, 10, 10-16.

Kim, J.S., Heo, P., Yang, T.J et al. (2011). Selective killing of bacterial persisters by a single chemical compound without affecting normal antibiotic-sensitive cells. *Antimicrob Agents Chemother*, 55, 5380-5383.

Klaenhammer, T.R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12, 39-85.

Klingberg, T., L. Axelsson, K. Naterstad, D. Elsser and B.B. Budde, 2005. Identification of potential probiotic starter cultures for Scandinavian-type fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 105, 419-431.

Klinman, D.M., Yi, A.K., Beaucage, S.L., Conover, J., Krieg, A.M. (1996). CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(7), 2879- 2883.

Kolodkin-Gal, I., Romero, D., Cao, S et al. (2010). D-amino acids trigger biofilm disassembly. *Science*, 328, 627-629.

König, S., Simianer, H & Willam, A. (2009). Economic evaluation of genomic breeding programs. *Journal of Dairy Science*, 92, 382–391.

Koort, J., Coenye, T., Santos, E. M., Molinero, C., Jaime, I., Rovira, J., et al. . (2006). Diversity of *Weissella viridescens* strains associated with “Morcilla de Burgos.” *Internationale. Journal Food Microbiology*, 109, 164–168.

Korea, C.G., Ghigo, J.M., Beloin, C. (2011). The sweet connection: solving the riddle of multiple sugar-binding fimbrial adhesins in Escherichia coli. Multiple E. coli fimbriae form a versatile arsenal of sugar-binding lectins potentially involved in surface-colonisation and tissue tropism. *Bioessays*, 33, 300-311.

Kos, B., Suskovic, J., Vukovic, S., SImpraga, M., Frece, J & Motasic, S. (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain Lactobacillus acidophilus M92. *Journal of applied microbiology*, 94, 981-987.

Kumar, M., Ghosh, N et Srivastava. (2010). Production and characterization of a bacteriocin produced by Enterococcus faecium LR/6. *The Internet Journal of Microbiology*, 8

Kumar, M., Mohania, D., Poddar, D., Behare, P.V., Nagpal, R., Kumar, A & Aggarwal, P.K. (2009b). A probiotic fermented milk prepared by mixed culture combination reduces pathogen shedding and alleviates disease signs in rats challenged with pathogens. *International Journal Probiotics and Prebiotics*, 4, 211–218.

L

Labioui, H., Elmoualdi, L., El Yachioui, M & Ouhssine, M. (2005). Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bulletin de la Société de pharmacie de Bordeaux*, 144, 237-250.

- Lagrafeuille, R., Miquel, S., Balestrino Damien, Delarbre- Vareille Marjolaine, Chain, F., Langella, P., and Forestier, C. (2016).** Opposing Effect of *Lactobacillus* on in vitro *Klebsiella pneumoniae* in biofilm and in an in vivo intestinal colonization model. *Beneficial Microbes*, pp 1-14
- Lai, A. C., Tran, S. & Simmonds, R. S. (2002).** Functional characterization of domains found within a lytic enzyme produced by *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *FEMS Microbiology Letters*, 215, 133–138.
- Landini, P., Antoniani, D., Burgess, J.G., Nijland, R. (2010).** Molecular mechanisms of compound affecting bacterial biofilm formation and dispersal. *Appl Microbiol Biotechnol*, 86, 813-823
- Larpent, J.P. (1997).** Microbiologie des viandes. In: Larpent. Microbiologie alimentaire, Technique de laboratoire. Lavoisier. Paris, 860-870
- Lasa I., Penades J.R. (2006).** A family of surface proteins involved in biofilm formation. *Res. Microbiol.* 157:99–107.
- Lebeer, S., Claes, I.J.J., Vanderleyden, J. (2012).** Anti-inflammatory potential of probiotics: lipoteichoic acid makes a difference. *Trends in Microbiology*, 20(1), 5-10.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J. & De Keersmaecker, S. C. (2010).** Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 171–184.
- Lee, J.S., Lee, K. C., Ahn, J.S., Mheen, T.I., Pyun, Y.R. & Park, Y.H. (2002).** *Weissella koreensis* sp. nov., isolated from kimchi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 1257–1261.
- Lemon, K.P., Earl, A.M., Vlamakis, H.C., aguilar, C., Kolter, R. (2008).** Biofilm development with an emphasis on *Bacillus subtilis*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 322, pp 1-16
- Leroy, F., De Vuyst, L. (2004).** Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 67–78.

Leveau, J. V., Bouix, M et Deroissart, H. (1991). Techniques d'analyses et de contrôle dans les industries agro-alimentaires: le contrôle micro biologique, *2eme édition, Techniquet & documentation, Lavoisier, Paris*, pp. 125-183.

Lewis, K. (2007). Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat Rev Microbiol*, 5, 48-56.

Li, M., Yoneyama, F., Toshimitsu, N., Zendo, T., Nakayama, J., Sonomoto, K. (2013). Lethal hydroxyl radical accumulation by a lactococcal bacteriocin, lacticin Q. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57, 3897-3902.

Liasi, S.A., Azmi, T.I., Hassan, M.D., Shuhaimi, M., Rosfarizan, M & Ariff, A.B. (2009). Antimicrobial activity and anti-biotic sensitivity of three isolates of lactic acid bacteria from fermented fish product. *Malaysian Journal of Microbiology*, 5, 33-37.

Lilly, D.M., Stillwell, R.H. (1965). Probiotics growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147, 747-8.

Lindgren, S.W & Dobrogosz, W.J. (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentation. *FEMS Microbiology Reviews*, 87, 149-164

Loessner, M., Guenther, S., Steffan, S., Scherer, S. (2003): A pediocin-producing *Lactobacillus plantarum* strain inhibits *Listeria monocytogenes* in a multispecies cheese surface microbial ripening consortium, *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 1854-1857.

M

Magnusson, J. (2003). Antifungal activity of lactic acid bacteria. PhD thesis, Agraria 397, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.

Maina, N. H., Tenkanen, M., Maaheimo, H., Juvonen, R., Virkki, L. (2008). NMR spectroscopic analysis of exopolysaccharides produced by *Leuconostoc citreum* and *Weissella confusa*. *Carbohydr. Research*, 343, 1446-1455.

Maryam, A.S.A., Zaiton, H., Mohamed Muftah, A., et al. (2012). Antioxidant activity of lactic acid bacteria fermented skim milk as determined by DPPH and ferrous chelating activity. *African Journal of. Microbiology Research*, 34, 6358-6364.

Mathur, S & Singh, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria - a review, *International Journal of Food Microbiology*, 105, 281-295.

Mäyrä-Mäkinen, A & Bigret, M. (2004). Industrial use and production of lactic acid bacteria. In : Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 73-102.

Mc Cabe, K.M., Zhang, Y.H., Khan, G., Mason, E.O & Mc Cable, E.R.B. (1995). Amplification of bacterial DNA using highly conserved sequences : Automated analysis and potential for molecular triage of sepsis. *Pediatrice*, 95, 165-169

Melander, R. J., and Melander, C. (2015). Innovative strategies for combating biofilm-based infections. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 831, 69–91.

Miquel, S., Lagrèfeuille, R., Souweine, B., and Forestier, C. (2016). Anti-biofilm Activity as a Health Issue. *Front Microbiol*, 7, 592.

Monnet, V., Latrille, E., Béal, C & Corrieu, G. (2008). Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 512-592.

Morandi, S., Brasca, M & Lodi, R. (2011). Technological, phenotypic and genotypic characterisation of wild lactic acid bacteria involved in the production of Bitto PDO Italian cheese. *Dairy Science and Technology*, 91, 341-359

Morandi, S., Cremonesi, P., Silveti, T & Brasca, M. (2013). Technological characterisation, antibiotic susceptibility and antimicrobial activity of wild-type *Leuconostoc* strains isolated from north Italian traditional cheeses. *Journal of Dairy Research*, 80, 457-466

Mozzi, F., Rollan, G., Savoy de Giori, G., Font de Valdez, G. (2001). Effect of galactose and glucose on the exopolysaccharide production and the activities of biosynthetic enzymes in *Lactobacillus casei* CRL 87. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 160-167

Mulders, J.W. M., Boerrigter, J., Rollema, H. S., Sezen, R. J. & De Vos, W. M. (1991). Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. *European Journal of Biochemistry*, 201, 581-584.

N

Nes, I.F. (2011). History, current knowledge, and future directions on bacteriocin research in lactic acid bacteria. In *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From genes to applications*, Drider D, Rebuffat S (eds). Springer: New York; 3-12.

Nieto-Arribas, P., Sesena, S., Poveda, J.M., Palop, L & Cabezas, L. (2010). Genotypic and technological characterization of *Leuconostoc* isolates to be used as adjunct starters in Manchego cheese manufacture. *Food Microbiology*, 27, 85-93

Nordqvist, C. (2004). Lactic acid bacteria - their uses in food. Medical News Today. Retrieved from [http:// www.medicalnewstoday.com/releases/14023.php](http://www.medicalnewstoday.com/releases/14023.php)

O

O'Toole, G.A. (2004). Microbiology: Jekyll or hide?. *Nature*, 432, 680-681.

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

Ogunbanwo, S.T., Sanni, A., Onilude, A.A. (2003). Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. *African Journal of Biotechnology*, 2 (8), 219-227.

Oman, T.J., van der Donk, W.A. (2009). Follow the leader: the use of leader peptides to guide natural product biosynthesis. *Nature Chemical Biology*, 6, 9-18.

Oppegard, C., Rogne, P., Emanuelsen, L., Kristiansen, P.E., Fimland, G., Nissen- Meyer, J. (2007). The two-peptide class II bacteriocins: structure, production, and mode of action. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13, 210-219.

Osuntoki, A., Korie, I. (2010). Antioxidant Activity of Whey from Milk Fermented with *Lactobacillus* Species Isolated from Nigerian Fermented Foods. *Food Technology and Biotechnology*, 48(4), 505-511.

Ouwehand, A.C., Salminen, S. (2002). Isolauri E., Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82, 279-289

Ouwehand, A.C., Vesterlund, S. (2004): 11 Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: Salminen S, Ouwehand A, von Wright A (eds.), *Lactic Acid Bacteria: Microbial and Functional Aspects*, 3rd ed. Marcel Dekker, New York. 375–395.

P

Parada, J. L., Caron, C. R., Medeiros, A. B. P., & Socol, C. R. (2007). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Purification, Properties and use as Biopreservatives. *Brazilian Archive of Biology and Technology*, 50(3), 521-542.

Paramithiotis, S., Gioulatos, S., Tsakalidou, E., Kalantzopoulos, G. (2006) *Process Biochemistry*, 41, 2429-2433.

Patterson, C.A (2008). Probiotiques : bienfaits au-delà des fonctions nutritionnelles de base. AAFC. 1-4.

Perez, R.H., Zendo, T., Sonomoto, K. (2014). Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microbial Cell Factories*, 13, (Suppl1): S3.

Petrova, M.I., Imholz, N.C.E., Verhoeven, T.L.A., Balzarini, J., Van Damme, E.J.M., Schols, D., Vanderleyden, J., and Lebeer, S. (2016b). Lectin-Like Molecules of *Lactobacillus rhamnosus* GG Inhibit Pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella* Biofilm Formation. *PLoS ONE*, 11, e0161337.

Petrova, M.I., Lievens, E., Verhoeven, T.L.A., Macklaim, J.M., Gloor, G., Schols, D., Vanderleyden, J., Reid, G., and Lebeer, S. (2016a). The lectin-like protein 1 in *Lactobacillus rhamnosus* GR -1 mediates tissue-specific adherence to vaginal epithelium and inhibits urogenital pathogens. *Sci Rep*, 6, 37437.

Prasad, J., Gill, H., Smart, J & Gopal, P.K. (1998). Selection and Characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotic. *International Dairy Journal*, 8, 993-1002.

R

Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., and Sintim, H. O. (2015). Agents that inhibit bacterial biofilm formation. *Future Medicinal Chemistry*, 7, 647–671.

- Randazzo, C. L., Caggia, C., Neviani, E. (2009).** Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. *Journal of Microbiological Methods*, 78, 1–9
- Rattanachaikunsopon, P., Phumkhachorn, P. (2006).** Isolation and preliminary characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* N014 isolated from Nham, traditional Thai fermented pork. *Journal of Food Protection*, 69(8), 1937–1943.
- Raynaud, S., Perrin, R., Cocaign-Bousquet, M., Loubière, P. (2003).** Metabolic and transcriptomic adaptation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* in response to auto acidification and temperature downshift in skim milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 8016- 8023.
- Rendueles, O., and Ghigo, J.-M. (2015).** Mechanisms of Competition in Biofilm Communities. *Microbiol Spectr* 3.
- Richard, C., Canon, R., Naghmouchi, K., Bertrand, D., Prévost, H., Drider, D. (2006).** Evidence on correlation between number of disulfide bridge and toxicity of class IIa bacteriocins. *Food Microbiology*, 23(2), 175–183.
- Riley, M.A., Wertz, J.E. (2002).** Bacteriocins: evolution, ecology, and applications. *Annual Review of Microbiology*, 56, 117-137
- Roos, S & Jonsson, H. (2002).** A high-molecular-mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components. *Microbiology* (Reading, United Kingdom), 148, 433-442.
- Ross, R. P, Morgan, S & Hill, C. (2002).** Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, 79, 3–16.
- Roudj, S., Belkheir, K., Zadi-Karam, H., Karam, N.E. (2009).** Protéolyse et autolyse chez deux lactobacilles isolés de lait camelin du Sud Ouest Algérien. *European Journal of Scientific Research*, 34 (2), 218-227.
- Rouissat, L., Bensoltane, A. (2006).** Physico-chemical, microbiological and biotechnological studies of lactic acid bacteria isolated from ewe’s milk of Algerian tow breeds (Ouled Djellal and El Hamra). *Egyptian journal of applied science*, 21(2b), 567-582.

Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J. and Zoon, P. (2002) An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 12, 163–171.

Ruhr, E & Sahl, H.G. (1985). Mode of action of the peptide antibiotic nisin and influence on the membrane potential of whole cells and on cytoplasmic and artificial membrane vesicles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 27, 841–5

Ruiz-Rodríguez, L., Bleckwedel, J., Eugenia Ortiz, M., Pescuma, M & Mozzi., F. (2017). Chapitre 11 : Lactic Acid Bacteria. *Industrial Biotechnology: Microorganisms*, First Edition. Edited by Christoph Wittmann and James C. Liao, 395-451

S

Sadri, M., Arab Soleimani, N., Forghanifard, M.M. (2016). The study of Ant imicrobial and Anti-adhesive effect of Probiot icLactobacilli on Uropathogenic Escherichia coli (UPEC). *Biol J Micoorgan*, 5, 159-70.

Sahl, H. G., Kordel, M & Benz, R. (1987). Voltage-dependent depolarization of bacterial membranes and artificial lipid bilayers by the peptide antibiotic nisin. *Archives of Microbiology*, 149,120–4.

Saidi, N. (1997). Caractérisation des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre des régions arides d’algérie. Thèse de Magister.Université d’oran.

Sánchez, B., Champomier-Vergès, M. C., Anglade, P., Baraige, F., De Los Reyes-Gavilán, C. G., Margolles, A. and Zagorec, M. (2005). Proteomic analysis of global changes in protein expression during bile salt exposure of Bifidobacterium longum NCIMB 8809. *Journal of Bacteriology*, 187(16), 5799-5808.

Sanders, M.E., Akkermans, L.M.A., Haller, D., Hammerman, C., Heimbach, J., Hörmannspurger, G., Huys, G., Levy, D.D., Lutgendorff, F., Mack, D. (2010). Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes*, 1(3), 164-185.

Schlegel, H.G. (1999) Geschichte der Mikrobiologie. Acta Historica Leopoldina, Halle

Schleifer, K. H., Kilpper-Balz, R. (1984). Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus*

faecalis comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *International journal of systematic bacteriology*, 34, 31–34

Sharpe, V.D., Fan, L., Hansen, L.T., Doucette, C., Waddington, M.L & Fillmore, S. (2013). Antimicrobial activity of bacteriocin-like substance producing lactic acid bacteria isolated from commercial vegetable produce. *Journal of Antimicrobials*, 257-268.

Shukla, R., Iliev, I., Goyal, A. (2014). *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1149 as probiotic and its dextran with anticancer properties. *Journal BioScience and Biotechnology*, 3, 79-87.

Singh, P.K., Parsek, M.R., Greenberg, E.P., Welsh, M.J. (2002). A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature*, 417, 552-555.

Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermudez-Humaran, L. G., Gratadoux, J. J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J. P. & other authors (2008). *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 16731–16736.

Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G.M., Grimont, P.A., Kampfer, P., Maiden, M.C., Nesme, X., Rossello-Mora, R., Swings, J., Truper, H.G., Vauterin, L., Ward, A.C. & Whitman, W.B (2002). Report of the Ad Hoc Committee for the Re-Evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 1043-1047.

Stevens, K.A., Sheldon, B.W., Klapes, N.A., Klaenhammer, T.R. (1991). Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 3613-3615.

Stiles, M. E. & Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36, 1-29.

Stiles, M. E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70, 331–345.

Ström, K. (2005). Fungal Inhibitory Lactic Acid Bacteria. Characterization and Application of *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala

T

Tabak, S., Medouakh, L., Adda, M., Chekroun, A., Krantar, K & Bensoltane, A. (2007). Interaction between *Helicobacter pylori* responsible for diseases gastro-duodenal and Bifidobacteria. *Egyptian journal of applied science*, 22, 72-83.

Tagg, J.R & McGiven, A.R. (1971). Assay system for bacteriocins. *Journal of Applied Microbiology*, 21, 943-948.

Tenke P., Kovacs B., Jackel M. et Nagy E. (2006).The role of biofilm infection in urology. *World J Urol* 24,13-20.

Tharrington, G & Sorrells, K.M. (1992). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by milk culture filtrates form *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. *Journal of Food Protection*. 55, 542–544.

Thiyagarajan, P., Thirumalaisamy, R., Thangasamy, S., Chinnappan, S., Sengottaiyan, A., Palanisamy, S., Priya, G & Nisha, J.C. (2017). OPTIMIZATION OF DEXTRAN PRODUCTION FROM CABBAGE WASTE USING *Leuconostoc mesenteroides*. *International Journal of Advances in Interdisciplinary Research*, 4, 24-31

Thomas, D. (1973). Agar medium for differentiation of *Streptococcus cremoris* from the other bacteria. *New Zealand journal of dairy technology*, 8, 70-71.

Thompson, J.K., Collins, M.A & Mercer, W.D. (1994) Characterisation of a proteinaceous antimicrobial produced by *Lactobacillus helveticus* CNRZ 450. *Journal of Applied Bacteriology*, 80, 338– 348.

Todorov, S.D. et Dicks, L.M.T. (2006). Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria Comparison of the bacteriocins. Elsevier. *Process Biochemistry*, 41, 11-19

Todorov, S.D., Dicks, L.M.T. (2005). Optimization of bacteriocin ST311LD production by *Enterococcus faecium* ST311LD, isolated from spoiled black olives. *Journal of Microbiology*, 43(4), 370-4.

Trias, R., Badosa, E., Montesinos, E., Baneras, L. (2008). Bioprotective *Leuconostoc* strains against *Listeria monocytogenes* in fresh fruits and vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, 127, 91-98.

V

Van Belkum, M.J., Martin-Visscher, L.A., Vederas, J.C. (2011). Structure and genetics of circular bacteriocins. *Trends Microbiology*, 19, 411-418.

Van Belkum, M.J., Worobo, R.W., Stiles, M.E. (1997). Double-glycine-type leader peptides direct secretion of bacteriocins by ABC transporters: colicin V secretion in *Lactococcus lactis*. *Molecular Microbiology*, 23, 1293-1301.

Van der Meer, J.R., Rollema, H.S., Siezen, R.J., Beerthuyzen, M.M., Kuipers, O.P., de Vos, W.M. (1994). Influence of amino acid substitutions in the nisin leader peptide on biosynthesis and secretion of nisin by *Lactococcus lactis*. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 3555-3562

Van Houdt R., Michiels C. W. (2005). Role of bacterial cell surface structures in Escherichia coli biofilm formation. *Research in microbiology*, 156(5), 626-633. Van Houdt R., Michiels C. W. (2005). Role of bacterial cell surface structures in Escherichia coli biofilm formation. *Research in microbiology*, 156(5), 626-633.

Vinod Kumar, J., Somesh, S & Neerja, S. (2006). Production, purification, stability and efficacy of bacteriocin from isolated of Natural Lactic acid fermentation of vegetables. *Food technology and Biotechnology*, 44 (3), 435- 439.

Vuillemard, J.C. (1986). Microbiologie des aliments. Evolution de l'activité protéolytique des bactéries lactiques. *Tec et Doc*, Lavoisier. Paris. 3, 1-65.

Vuotto, C., Longo, F., and Donelli, G. (2014). Probiotics to counteract biofilm-associated infections: promising and conflicting data. *Int J Oral Sci*, 6, 189–194.

W

Wang, M., Gao, Z., Zhang, Y., Pan, L. (2016). Lactic acid bacteria as mucosal delivery vehicles: a realistic therapeutic option. *Journal of Applied Microbiology Biotechnology*, 100, 5691–5701

Wiedemann, I., Breukink, E., van Kraaij, C., Kuipers, O.P., Bierbaum, G., de Kruijff, B., Sahl, H.G. (2001). Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 1772-1779

Wood, B.J.B. (Ed.) (1985). Microbiology of Fermented Foods. New York: Elsevier.

Wu, M.H., Pan, T.M., Wu, Y.J., Chang, S.J., Chang, M.S., Hu, C.Y. (2010). Exopolysaccharide activities from probiotic bifidobacterium: Immunomodulatory effects (on J774A. macrophages) and antimicrobial properties. *International Journal of Food Microbiology*, 1-7.

X

Xanthopoulos, X., Petridis, D., Tzanetakis, N. (2001). Characterization and Classification of Streptococcus Thermophilus and Lactobacillus Delbrueckii Subsp. Bulgaricus Strains Isolated from Traditional Greek Yogurts, *Journal of food science*, 1365-2621.

Y

Yang, J.X., Guo, J., Yuan, J.F. (2008). *In vitro* antioxidant properties of rutin. *LWT- Food Science Technology*, 41,1060-1066.

Yateem, A., Balba, M.T., Al-Surrayai, T., Al-Mutairi, B & Al-Daher, R. (2008). Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potential from camel milk. *International Journal of Dairy Science*, 3, 194-199.

Yildiz, F. (2010). Development and Manufacture of Yogurt and Other Functional Dairy Products. Taylor and Francis Group, United State.

Yoneyama, F., Imura, Y., Ichimasa, S., Fujita, K., Zendo, T., Nakayama, J., Matsuzaki, K., Sonomoto, K. (2009a). Lacticin Q, a lactococcal bacteriocin, causes high-level membrane permeability in the absence of specific receptors. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 538-541.

Yoneyama, F., Imura, Y., Ohno, K., Zendo, T., Nakayama, J., Matsuzaki, K., Sonomoto, K. (2009b). Peptide-lipid huge toroidal pore, a new antimicrobial mechanism mediated by a lactococcal bacteriocin, lacticin Q. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, 3211-3217.

Z

Zago, M., Fornasari, M. E., Carminati, D., Burns, P., Suarez, V., Vinderola, G., Reinheimer, J & Giraffa, G. (2011). Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiology*, 28, 1033- 1040.

Zamani, H., Rahbar, S., Garakoui, S.R., Sahebi, A.A., Jafari, H. (2017). Antibiofilm potential of *Lactobacillus plantarum* spp. cell free supernatant (CFS) against multidrug resistant bacterial pathogens, *Pharmaceutical and Biomedical Research*, 3(2), 39-44

Zhang, S., Mustapha, A. (1999). Reduction of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 numbers on vacuum-packaged fresh beef treated with nisin or nisin combined with EDTA. *Journal of Food Protection*, 62, 1123-1127.

Zourari, A., Roger, S., Chabanet, C., Desmazeaud, M.J. (1991). Caractérisation de bactéries lactiques thermophiles isolées de yaourts artisanaux grecs. 1. Souches de *Streptococcus salivarius* subsp thermophilus. *Lait* 71, 445-461

Annexe

Annexe 1

Composition des milieux de culture

Milieu MRS (de Man-Rogosa et Sharp, 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 6.8

Autoclavage 120°C/ 20 minutes

Milieu MSE (Mayeux, Sandine et Elikier, 1962)

Tryptone 20g

Gélatine 2.5g

Extrait de levure 5g

Sachharose 100g

Glucose 5g

Citrate de sodium 1g

Azide de sodium 0.075g

Agar/agar 15g

Eau distillée 1000ml

pH 6.8

Autoclavage à 120°C/20 minutes

Milieu M16 BCP (Thomas, 1973)

Peptone 10g

Extrait de viande 5g

Extrait de levure 2.5g

Lactose 2g

Acide ascorbique 0.5g L-

arginine .4g

Pourpre de bromocrésol 0.05g

Agar-agar 15g

Eau distillée 1000ml

pH 6.8

Autoclavage à 120°C pendant 20 min

Milieu Bouillon nutritif (BN)

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

Milieu BHI (Brain Heart Infusion)

Infusion cœur-cerveau (matières solides) 8 g

Digestion peptique de tissu animal 5g

Digestion pancréatique de caséine 16g

Chlorure de sodium 5g

Glucose 2g

Phosphate d'hydrogène disodique 2,5g

pH 7,4

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

Milieu KMK (Kempler Mc Kay, 1980) Extrait de

levure 3 g

Biopolytone 2.5 g

Glucose 5 g

Agar .15 g

Eau distillée 1000ml

pH 6.6

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

Au moment de l'emploi on ajoute :

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

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

Ces solutions sont stérilisés par filtration sur filtres millipores 0.22 µm et ils sont conservés à l'obscurité à 4°C.

Milieu Mueller-Hinton (Mueller et Hinton, 1941)

Infusion de viande de bœuf 300cm³

Peptone de caséine 17.5 g

Amidon de maïs 1.5 g

Agar-agar 17 g

pH 7.4

Autoclavage à 120°C pendant 20 min

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.

Milieu MRS-BCP sans extrait de viande

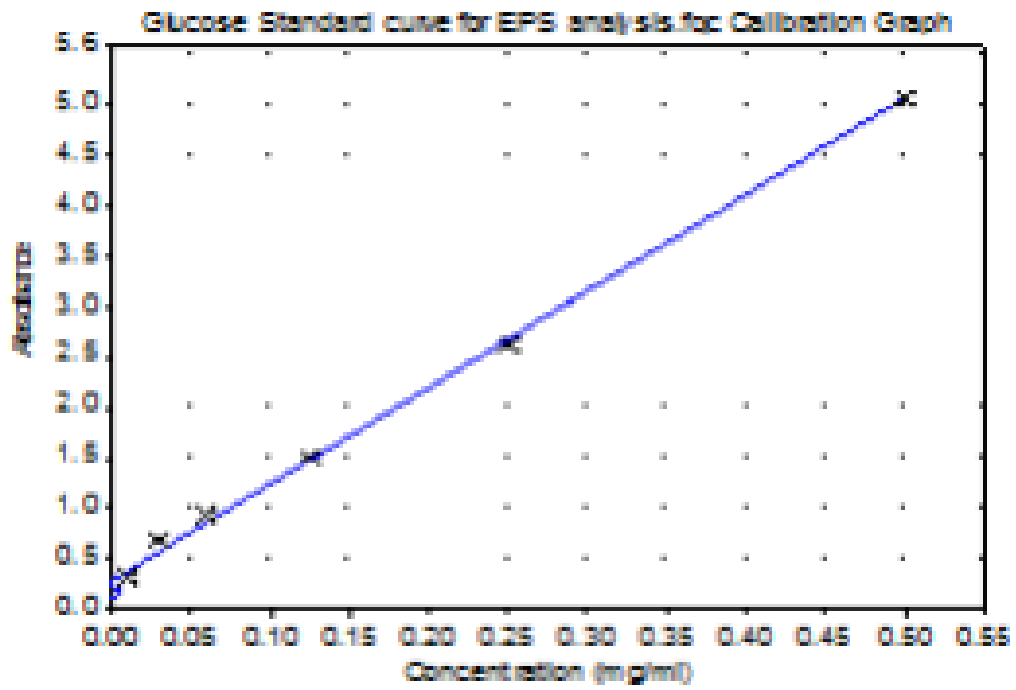
MRS bouillon sans extrait de viande 1000 ml

Pourpre de Bromocrésol 0.025 mg

pH 7

Autoclavage 120°C pendant 20 min

Annexe 2

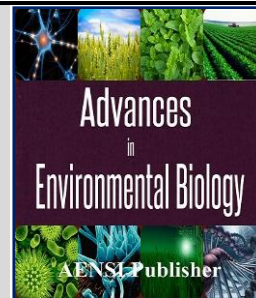


Courbe étalonnage de glucose

Annexe 3

Tableau : Caractéristiques des bactéries lactiques (Axelsson, 2004)

caractéristiques	Bacilles				Coques							
	<i>Carnobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Vagococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Oenococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Tetragenococcus</i>	<i>Weissella</i>
Formation des tétrades	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Production de gaz	-	±	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Croissance à 10°C	+	±	+	+	+	+	+	±	-	-	+	+
Croissance à 45°C	-	±	-	+	-	-	-	±	±	-	-	-
Croissance à 6.5% NaCl	ND	±	+	+	-	-	±	±	-	-	+	±
Croissance à 18% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Croissance à pH 4,4	ND	±	-	+	±	±	±	+	-	-	-	±
Croissance à pH 9,6	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
Acide lactique	L	D,L,DL	L	L	L	L	D	L,DL	L	L	L	D,DL



Evaluation of technological properties of *Leuconostoc mesenteroides* (V1) strain isolated from Algerian goat's milk

Amel Benyoucef, Nabila Hansal, Mohammed Amine El hadj Said, Hassan Bentabet, Mebrouk Kihal and Zineb Benmechrene

Laboratory of Applied Microbiology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Oran1 Ahmed Ben Bella University, B.P. 16, Es-Senia, 31100 Oran, Algeria

Address For Correspondence:

Zineb Benmechrene, Laboratory of Applied Microbiology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Oran1 Ahmed Ben Bella University, B.P. 16, Es-Senia, 31100 Oran, Algeria

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY). <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Received 18 September 2016; Accepted 1 January 2017; Available online 16 January 2017

ABSTRACT

This study was to evaluate probiotic characteristics by in vitro tests of *Leuconostoc mesenteroides* strain (V1) isolated from Algerian goat's milk collected from El Bayadh which is located in the west of Algeria. This strain V1 were identified by phenotypic and biochemical methods, were tested for their antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii* and was evaluated for certain properties relevant to probiotic including : acid pH, bile salts, pepsin resistance, hemolytic activity and antibiotics sensitivity. The results revealed the strain V1 showed antagonistic activity against *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua* and *Listeria ivanovii*, due to a production of proteinous nature substances. The strain were resistant to pH 3 and 4, bile salts at 0.5%, 1% and 2% and pepsin at pH 3. Was γ -hemolytic and was susceptible to four antibiotics : Chloramphenicol, pristinamycin, Clindamycin and Licomycin. *Leuconostoc mesenteroides* strain V1 showed desirable properties as potential probiotic strains, which can be considered the strain V1 as suitable probiotic candidate.

KEYWORDS: *In vitro*, goat's milk, probiotic, *Leuconostoc*

INTRODUCTION

Goat's milk has a compositional most identical to that of cow's milk. It provides the same type of protein (80% casein, 19% soluble proteins and 1% enzyme), vitamins and minerals. In contrast, the composition of their fat is different, a particularity that makes the milk of goat more digestible [1].

It contains four times more oligosaccharides than cow's milk (about 23 mg / 100g against 6mg / 100g). These sugars act as prebiotics and promote the development and the growth of the probiotic flora which eliminate the pathogenic bacterial flora.

Goat milk is alive as any milk, even if it comes from a milking done in normal conditions of cleanliness and hygiene it contains many germs which its rapid development is ensured by the temperature at the exit of the udder (35 ° C) as well as its richness in water and carbohydrates [2].

Currently dairy industries are indeed very concerned by the use of lactic acid bacteria as process agents they have essential roles to acidify the milk and the curdled, to participate in the formation of taste (proteolysis, flavor production) texture and the opening of dairy products (cheese, butter, yogurt, fermented milk) and reducing alterations micro flora and pathogenic flora.

Among the lactic acid bacteria used in the dairy industries, we may mention the genus *Leuconostoc* isolated from goat milk for several reasons such as the ability to metabolize more carboxylic acids fumarate, gluconate, malate, pyruvate and oxoglutarate [3] and their production of dextran, a product used as an additive food as gelling by increasing the viscosity and as a stabilizer through strengthening the rigidity of the casein network "fermented milks, creams, dessert made of milk and flavored milk" [4-8]. As the citrate metabolism and the sugars by *Leuconostoc* involved in aromatization of fermented dairies. In addition; the production of acid acetic, diacetyl and CO₂ inhibits the growth of pathogenic bacteria in food [9].

Lactic acid bacteria have also been used in probiotic food, as they produce bacteriocins that inhibit harmful bacteria [10]. However, the probiotics have not been shown to inhibit harmful or spoilage fungi, necessitating the use of PCR and ELISA methods for identification of fungal contaminants [11]. Probiotics have recently been investigated in regards to health effects besides preventing harmful bacterial growth in the gut. Probiotics have been shown to stimulate the immune system through activating immune cells [12]. These bacteria have also been shown to lower total cholesterol levels and LDL cholesterol levels in diabetes patients [13] as well as lower bile acid levels [14].

The antimicrobial effect due to bacteriocins produced by *Leuconostoc* sp. was observed for the first time in the 90's [15]. Later, different bacteriocins were producing from *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 class II dsuch as Mesenterocin52A and Mesenterocin52B [16] also Mésentérocin Y105* and Mésentérocin B105* from *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* Y105 Class IIa [17], the determination of the peptide sequences of these bacteriocins shows that they exhibit antimicrobial activity against pathogenic bacteria including in particular *Listeria* sp. [18].

MATERIAL AND METHODS

1. Bacterial strains and culture conditions:

Leuconostoc mesenteroides (V1) strain were isolated from raw goat milk (milk is collected aseptically goat race Arbia, her wool is colored "black and gray" and 11 months age), from the west of Algeria (El kheiter is a town in the wilaya of El Bayadh, which is located 370 km southeast of Oran, 520 km southwest of Algiers and 500 km northeast of Bechar).

The indicator strains of "*Staphylococcus aureus* ATCC 43300 were collected from Oran hospital and the following strains: *Listeria ivanovii* ATCC 19119 and *Listeria innocua* ATCC 33090 were collected from CECT Spain. They were stored as frozen stocks at -20 ° C. Before use, the indicator strains were transplanted into the brain heart infusion broth (BHI) at 37 ° C.

2. Isolation of *Leuconostoc* strain:

Isolation of *Leuconostoc* was carried out on MRS solid medium at pH 6.8, supplemented with vancomycin (30µg / ml) [19], were incubated at 30 ° C for 48h. Among the isolated colonies, only those Gram-positive and Catalase-negative were retained [20].

3. Identification of strain:

Identification of *Leuconostoc* strain was carried out according to [21]; Based on the following criteria: CO₂ production, arginine hydrolysis on M16BCP medium, growth at different temperatures (4°C, 15°C, 37°C, and 45°C), growth at different pH (4.8 and 6.5), and growth at different NaCl concentrations (3% and 6.5%). Dextran production on MSE medium [22], citric acid degradation on Kempler and McKay solid medium, esculin hydrolysis and production of acetoin on Clark and Lubs medium [23,24]. Carbohydrate fermentation was tested on MRS supplemented with bromocresol purple as a pH indicator using the following sugars to differentiate the subspecies of *Leuconostoc*: Arabinose, Glucose, galactose, lactose, fructose, sucrose, sorbitol, mannitol, maltose Rhamnose, Raffinose, xylose [25, 26].

2.4. Technological characteristics of strain:

2.4.1. Antimicrobial activity:

The search for possible production inhibiting substance against the strain *Leuconostoc mesenteroides* indicator bacteria (*Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Listeria ivanovii* ATCC 19119) was carried out by the direct method according to [27]. An 18h culture strain was spotted onto the surface of MRS agar and incubated at 37 ° C for 24 hours. After incubation, the indicator bacteria was striated in superposition of 8ml Mueller-Hinton semisolid medium then incubated for 24h to 37°C. The inhibition was considered positive when the width of the inhibition halos was clear ≥ 0.5 cm.

2.4.2. Detection of protein nature antimicrobial substance:

The detection was performed by an indirect method. From 18h culture of *Leuconostoc mesenteroides* strain, 1ml was centrifuged at 8000 rpm for 10 minutes. Then 100 µl of the supernatant was incubated on wells formed

on solid MRS medium that were seeded by indicator strains, and incubated at 37 ° C for 24h. The colonies surrounded by a clear zone with a diameter greater than 2 mm are considered positive. Several factors were eliminated to confirm the proteinaceous nature of the inhibitory substance, such as lactic acid using a buffered medium and the elimination of the effect of hydrogen peroxide by using indicator strains with catalase enzyme such as *S. aureus*, *Listeria innocua*, and *L. ivanovii*, and were treated with proteolytic enzyme pepsin to a final concentration of 1 mg/ ml.

To identify the proteinaceous nature of the inhibitory substance, heat treatments of the supernatant at different temperatures (60°C, 80°C, and 100°C), different pH (1 or 9) and effect of the solvent organic (1 % Tween 80, 1 % Urée) were carried out.

2. 4.3. Acidity and Growth Kinetics in Pure and Mixed Cultures:

To study the growth kinetics of *L. mesenteroides* (V1) in pure and mixed cultures with the alterations and / or pathogens strains (*Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Listeria innocua* ATCC 33090 and *Listeria ivanovii* ATCC 19119). Strain V1 was selected and inoculated by streaking on solid MRS medium and incubated at 30°C for 18 h. After incubation, a colony was inoculated into MRS liquid and was incubated at 30°C for 18 hours. Then, 100 µL of the 18 h culture was inoculated into 10 ml of skimmed milk containing 0.3% yeast extract and was incubated at 30°C for 18h [28]

The bacterial population measurement with the indicator strains in pure and mixed cultures was performed by counting in the selective medium for each strain. (MRSV for *Leuconostoc* at 30 °C; BHI for both strains of *Listeria* at 37° C and Baird Parker for *Staphylococcus aureus* at 37° C.

Strain V1 was most efficient the strain in the production of antimicrobial substances, and the four indicator strains (*Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Listeria innocua* ATCC 33090 and *Listeria ivanovii* ATCC 19119), were routinely sub cultured in 10 ml of skim milk with 0.3% yeast extract.

The four strains were inoculated separately into 100 ml of skim milk for monitoring pure cultures, and the mixed culture was prepared by mixing a culture of the indicator strains with the strain V1. The cultures were divided into tubes, and incubated at 30°C for 24 h. Every three hours, the samples were aseptically removed from the tubes to determine the pH, titratable acidity, and the growth rate [29].

2.4.4. Probiotic effect of *Leuconostoc* strain:

2.4.4.1. The pH tolerance:

Bacterial cells grown in MRS broth at 30 °C overnight were harvested by centrifugation and were washed twice with phosphate buffer saline (PBS) of pH 7 and resuspended in PBS of pH 2, 3 and 4. The viable counts were enumerated on MRS agar after incubation at 30 °C for 0 and 3h.

2.4.4.2. Test of resistance and Hydrolysis bile salt:

Bacterial cultures were grown at 30 °C overnight and the bacterial cells were harvested by centrifugation, washed twice with PBS of pH 8 before being resuspended in PBS (pH8) solution containing 0.3% bile salts. The viable counts were enumerated on MRS agar after incubation at 30 °C for 0 and 4h.

The hydrolysis bile salt test is based on the determination of bile hydrolase enzyme that catalyzes the hydrolysis of bile salt. On Petri dishes containing modified MRS prepared with 0.5% bile salt, 0.1 ml the culture of *Leuconostoc* strain was inoculated on the surface and incubated at 30 °C for 48h.

2.4.4.3. Pepsin resistance:

Bacterial cells grown in MRS broth at 37 °C overnight were recovered by centrifugation, were washed with sterile PBS (pH 8) and resuspended in PBS of pH 2 and 3 supplemented with 3 mg / ml of pepsin respectively. Strain resistance was determined by counting the MRS agar initial viable cells after 3 hours of incubation at 37°C.

2.4.4.4. Hemolytic activity:

Hemolytic character was investigated by streaking the culture of *Leuconostoc* strain on Columbia agar containing 5% human blood. After incubation for 24 hours, *leuconostoc* may be α hemolytic (green color around the colonies); β -hemolytic (clarification around the colonies) or γ hemolytic (the medium is not changed)

2.4.4.5. Antibiotic sensitivity of *Leuconostoc* strain:

L. mesenteroides strains were cultured in MRS broth at 30°C for 18h and were then adjusted to a 0.5 McFarland scale and smeared homogeneously on MRS culture plate. Antibiotic discs were placed on the plates and incubated for 24 h at 37°C. The antibiotics included Ampicillin 10 µg, Streptomycin 10 µg, Erythromycin 15µg, Kanamycin 30µg, Chloramphenicol 30µg, Pristinamycin 15µg, Tobramycin 10 µg, Clindamycin 2µg, Spiramycin 100µg, Amikacin 30µg, Licomycin 2µg, Cefatoxin 30µg, Naldixic acid 30µg, Gentamicin 10 µg

The inhibitory circles emerging after 24 h of incubation were measured. Activity was assessed as sensitive (≤ 21 mm), intermediate (16–20 mm), and resistant (≥ 15 mm), as previously described by [30].

RESULTS AND DISCUSSION

1.1. Isolation and identification:

Our isolate were Gram-positive, catalase negative, able to produce gas from glucose (heterofermentative), unable to degrade arginine (Table 1). This isolate were considered as the genus of *Leuconostoc* [31-34]. The strain V1 were able to grow at 15 and 37 °C but not at 4 and 45 °C, which confirms that she were mesophilic bacteria, no able to resist at 63.5 °C for 30 min, but to resist at 55 °C for 15 min, our results seem to those found by [35, 36]. Were able to stand a concentration of 3% of NaCl; but not grow at 6.5% NaCl and were able to grow at pH 6.5 and not at pH 4.8, this results agree with [37]. This strain V1 were able to hydrolyze sucrose to produce dextran, was able to hydrolyze esculin catalyzed by a β -glucosidase through the presence of esculinase which degrades it to glucose and esculin [24, 32]. The strain V1 have a positive character to the use of citrate, appear form blue colonies on medium KMK, reflecting the presence of citratase enzyme and the ability to use this precursor aromatic compound which is taken as an important criterion in the selection of species for technological interest, this was already demonstrated by [24, 38, 39]. The strain V1 were unable to produce acetoin from glucose, which corresponds to the characters of the two subspecies *Leuconostoc mesenteroides subsp mesenteroides* and *Leuconostoc mesenteroides subsp dextranicum* [32, 34]. According to the fermentation profile (Table 2), isolate strain V1 belong to the species *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* which arabinose sugar is the key of distinction between the subspecies of *Leuconostoc mesenteroides*, according to the work done by [32, 40].

3.2. Technological characteristics of strain:

3.2.1. Antimicrobial activity of *Leuconostoc mesenteroides* :

Our strain exhibits inhibitory activity against all tested indicator strains: *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Listeria innocua* ATCC 33090 and *Listeria ivanovii* ATCC 19119. (Figure 1) show the different zones of inhibition. This antimicrobial activity is described by the synthesis of molecules such as organic acids, hydrogen peroxide, carbon dioxide, diacetyl and bacteriocins [41].

In order to ensure that the inhibiting substance is proteinaceous product, and in order to eliminate the lactic acid and hydrogen peroxides effect; Culture were treated with the proteolytic enzyme (pepsin) which led to the disappearance of the inhibition zones, This result indicate that the inhibition is due to a protein nature substance (Date not show)

The production of bacteriocins by *Leuconostoc mesenteroides* strain already was confirmed by [42-45].

3.2.2. Kinetic Monitoring of pH Evolution and Acidity:

The strain V1 that followed indicate a producing of organic acid (lactic and acetic acid), which pacing 65 °D (Figure 3 and 4) and decrease of pH from 7.00 to 4.88 after 24h of incubation (Figure 2).

The indicator strains so decrease of pH was observed, in pure culture pH decrease from 7.00 to 5.79 for *Listeria innocua*, from 7.00 to 5.88 for *Listeria ivanovii* and from 7.00 to 6.2 for *Staphylococcus aureus*. However in mixt culture observed decrease from 7.00 to 5.41 for *Listeria innocua*, from 7.00 to 5.12 for *Listeria ivanovii* and from 7.00 to 5.23 for *Staphylococcus aureus* (Figure 2).

3.2.3. The Growth Kinetics of Strains in pure cultures and mixed cultures with *Leuconostoc* Strain:

The growth of indicator strains in the presence of strain V1 was observed (Figure 5).

The growth of *Listeria innocua* ATCC 33090 after 24 hours of culture which the decrease was of the order of 34.61% , *Listeria ivanovii* ATCC 19119 of which the decrease was of the order of 24% and *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 of which the decrease was of the order of 20%. This decreases may be explain by presence combined with the production of acidity and / or production of antimicrobial substances similar results was measured by [46, 47].

3.2.4. Probiotic effect of *Leuconostoc* strain:

3.2.4.1. The pH resistance:

pH tolerance of our results indicates that *Leuconostoc mesenteroides* strain viable at pH 3 and 4 but no viability has been observed at pH 2 (Table 3). This result are in agreement with by [45], The *L. mesenteroides* strain Z8 isolated from Algerian camel milk was not viable at pH 2, but marked an increases of 7.49% and 2.43% at pH 3 and 4, respectively and according to other authors for other probiotic strains, [48] The strains of *Pediococcus acidilactici* (P2), *Lactobacillus curvatus* (RM10), and *P. pentosaceus* (FF) showed tolerance to acid (pH 3.0). [49] The strain of *Eenterococcus faecium* isolated from non fermented animal foods, although no

viable cells were detected at pH 2, the reduction ranges after 3h of exposure to pH3. The survival of *Leuconostoc mesenteroides* strain V1 at pH 3 and 4 indicated that it could transit through the stomach.

3.2.4.2. Hydrolysis resistance and bile salt:

The results of tolerance to bile salt are shown in (Table 4). It appears that our strain (V1) presented variable sensitivity to various bile salt concentrations with a slight reduction in viability after 4 h. No activities of bile salt hydrolysis were observed. This result reported by other authors for the selection of probiotic [49], Exposure to different concentrations of oxgall (0.5% , 1% and 2%) affected the viability of strain *E. faecium* LHICA 28.4 isolated from non fermented animal foods and none of the *E. faecium* strains under study hydrolysed oxgall. ; [45] *L. mesenteroides* strain (Z8) was able to hydrolyse bile salt and were able to grow in the presence of 0.5%, 1%, and 2% oxgall.

3.2.4.3. Resistance to pepsin:

The results are illustrated in (Table 5). No effect and no viability were observed after 3 hours at added 3 mg/ml of the pepsin at pH 2. However a small decrease in growth of the strain at pH 3 with the added 3 mg/ml of pepsin. Our results indicate a resistance to pepsin at pH 3. This result was reported by [45], the strain *L. mesenteroides* was able to survive at pH 2 when 3mg/ml of pepsin was added. However, a remarkable resistance was observed at pH 3 when 3mg/ml of pepsin was added, also [49], reported that no viability had been observed for any of the strains after exposure to pH 2, the addition of pepsin at this pH value had no detectable effect. In contrast, all four *E. faecium* strains survived well when exposed to pepsin at pH 3.

Table 1: The physiological and biochemical testing of isolates obtained from raw goat's milk

Isolates	V1
Catalase	-
Gram	+
ADH	-
CO ₂ Production	+
4°C	-
15°C	+
37°C	+
45°C	-
63.5/30 min	-
55/15 min	+
pH 4.8	-
pH 6.5	+
3% NaCl	+
6.5% NaCl	-
Dextran	+
Hydrolysis of fesculin	+
Citrate utilization	+
Acetone Production	-

+: positive reaction, -: negative reaction.

Table 2: fermentative profile of *L. mesenteroides* Strain

Carbohydrates	V1
Arabinose	+
Glucose	+
Galactose	+
Lactose	+
Fructose	+
Saccharose	+
Sorbitol	-
Mannitol	-
Maltose	+
Rhamnose	-
Raffinose	-
Xylose	-

V1: *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides*

Table 3: Effect of pH on the viability of the strain *Leuconostoc*

pH2	pH3	pH4

0h	3h	0h	3h	0h	3h
5,13	0	7.45	7.67	7.14	7.77

These results are expressed as *log CFUN*.

Table 4: Effect of different concentrations of bile salts on the *Leuconostoc* strain.

0,5 %		1 %		2 %	
0h	4h	0h	4h	0h	4h
7.75	7.23	7.80	7.25	7.79	7.09

These results are expressed as *log CFUN*.

Table 5: Effect of pepsin in the presence of different pH on the viability of the strain *Leuconostoc*.

Pepsin (pH2)		Pepsin (pH3)	
0h	3h	0h	3h
8.10	0	8.13	7.88

These results are expressed as *log CFUN*.

Table 6: Antibiotic sensitivity test.

Antibiotic	Symbol	µg/ disc	Clear zone diameter (mm)	
Ampicilin	AM	10	08	R
Streptomycin	S	10	07	R
Erythromycin	E	15	15	R
Kanamycin	K	30	06	R
Chloramphénicol	C	30	22	S
Pristinamycin	PT	15	21	S
Tobramycin	TOB	10	09	R
Clindamycin	DA	2	23	S
Spiramycin	SP	100	17	I
Amikacin	AK	30	12	R
Licomycin	L	2	25	S
Cefotaxim	CTX	30	00	R
Nalidixique acid	NA	30	00	R
Gentamicin	CN	10	08	R

R : resistance, I : intermidiate, and S : sensitive.

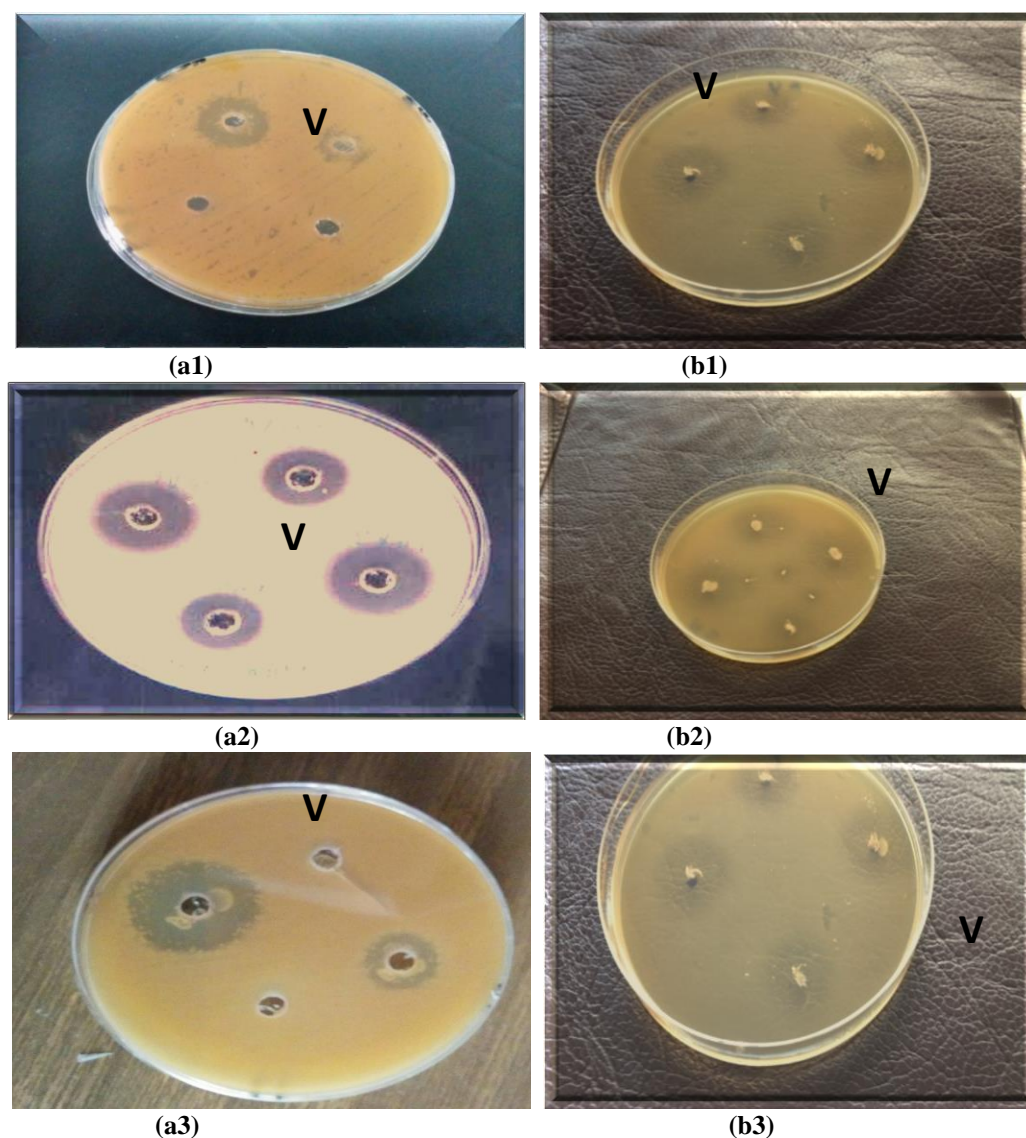


Fig. 1: The inhibition spectra of *Leuconostoc mesenteroides* strains against indicator microorganisms.
 (a1) Inhibition of *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 by *Leuconostoc mesenteroides* using a direct method.
 (a2) Inhibition of *Listeria innocua* ATCC 33090 by *Leuconostoc mesenteroides* using a direct method.
 (a3) Inhibition of *Listeria ivanovii* ATCC 19119 by *Leuconostoc mesenteroides* using a direct method.
 (b1) Antibacterial activity of *Leuconostoc mesenteroides* versus *S. aureus* ATCC 43300 using a buffered medium.
 (b2) Antibacterial activity of *Leuconostoc mesenteroides* versus *L. innocua* ATCC 33090 using a buffered medium.
 (b3) Antibacterial activity of *Leuconostoc* versus *Listeria ivanovii* ATCC 19119 using a buffered medium.

3.2.4.4. Hemolytic activity:

The *Leuconostoc mesenteroides* strain was not capable to hydrolysis human blood on the Columbia medium. So the strain is non-hemolytic bacteria (γ -hemolytic). This character has been confirmed by [45, 50, 51].

3.2.4.5. Antibiotic resistance:

The resistance profile or sensitivity of 14 antibiotics disc is shown in (Table 6) and (Figure 6). The *Leuconostoc mesenteroides* strain resisted 9 antibiotics: Ampicillin, Kanamycin, Erythromycin, Streptomycin, Tobramycin, Amikacin, Cefatoxin, Gentamicin and Nalidixic acid, However the profile of sensitivity was observed for Chloramphenicol, Pristinamycin, Clindamycin, Licomyacin and Spiramycine as an intermediary. Our results are consistent with those obtained in other studies author for *Leuconostoc mesenteroides* strain [45, 52].

The results of this study showed that the strain *Leuconostoc mesenteroides* V1 can be a good potential probiotic candidate. Therefore, it seems that strain V1 has a potential probiotic needed in foods system for développement of foods production.

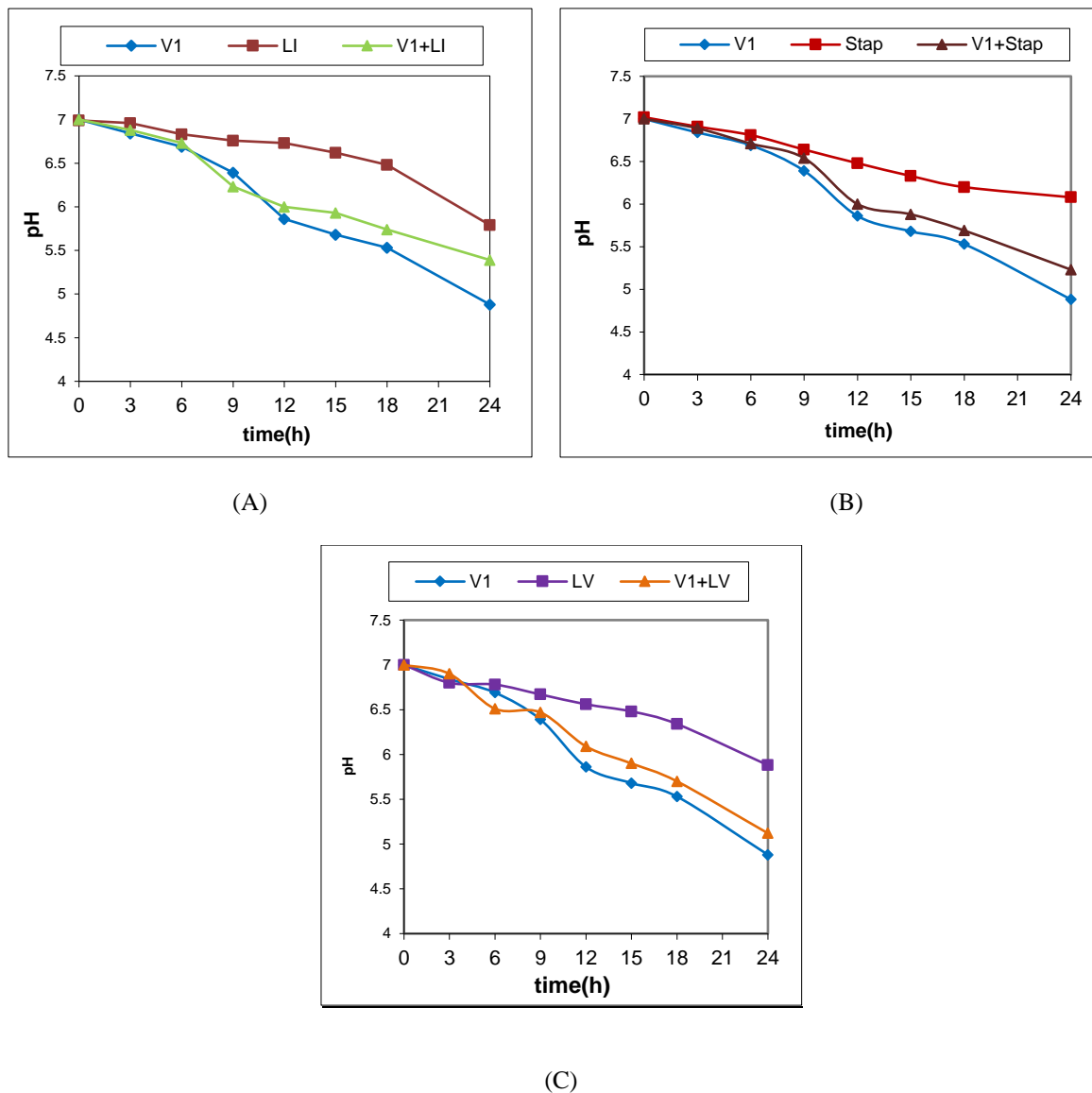


Fig. 2: Kinetics of evolution of the pH:

(A): In pure culture strains V1, *Listeria innocua* ATCC 33090 and in mixed culture strains V1+ *Listeria innocua* ATCC 33090.

(B): In pure culture strains V1, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 and in mixed culture strains V1+ *Staphylococcus aureus* ATCC 43300.

(C): In pure culture strains V1, *Listeria ivanovii* ATCC 19119 and in mixed culture strains V1+ *Listeria ivanovii* ATCC 19119.

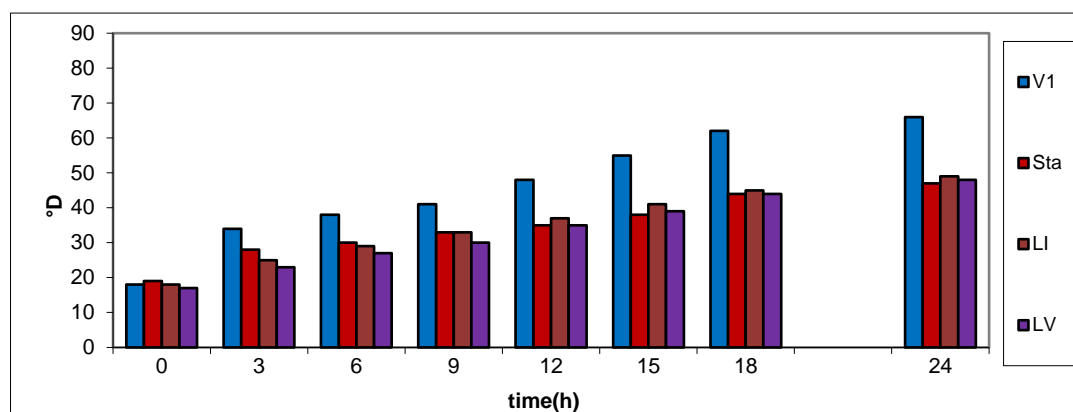


Fig. 3: Kinetics of evolution of the Dornic acidity in pure culture

Kinetics of evolution of the Dornic acidity in pure culture for strains: *Leuconostoc mesenteroides* (V1) *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (Sta), *Listeria inocoua* ATCC 33090(LI) and *Listeria ivanovii* ATCC 19119(LV)

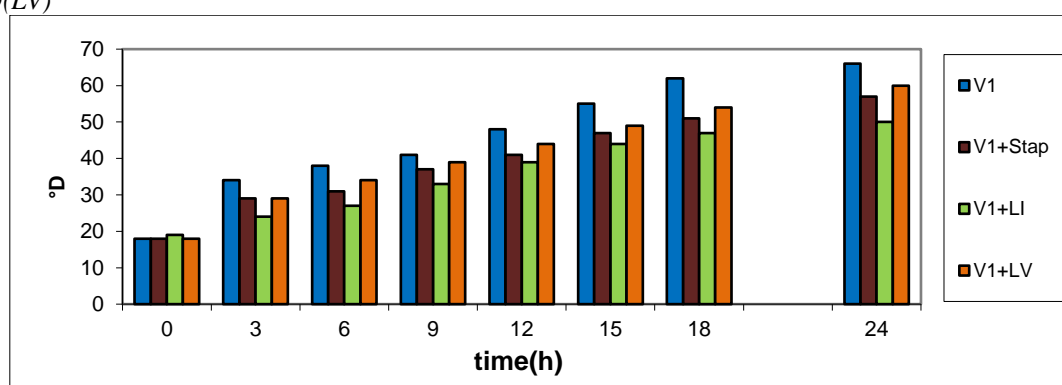
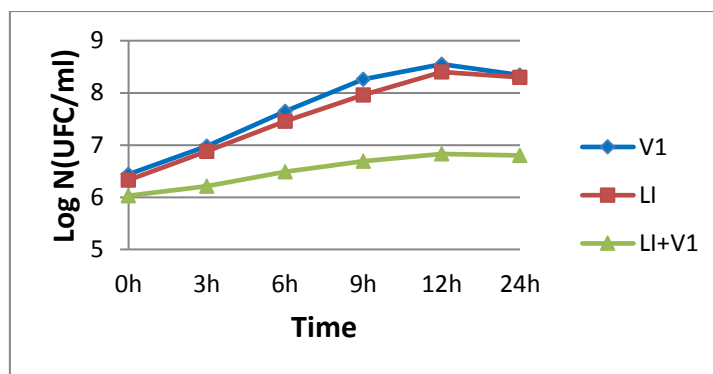
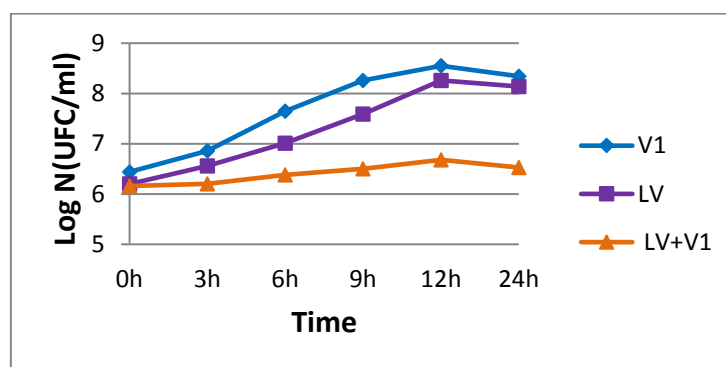


Fig. 4: Kinetics of evolution of the Dornic acidity in mixed culture

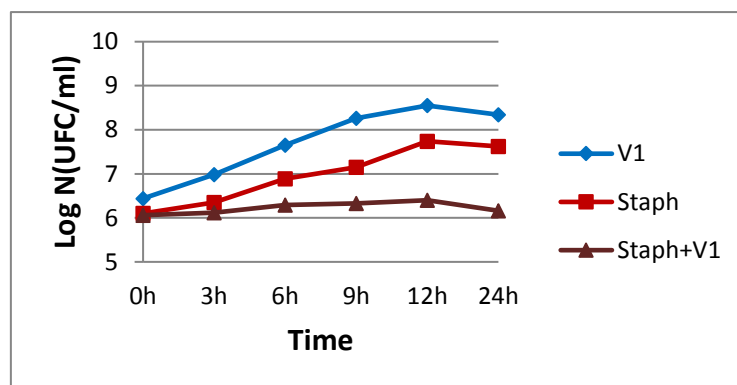
Kinetics of evolution of the Dornic acidity mixed culture for strains: *Leuconostoc mesenteroides* (V1) *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Listeria inocoua* ATCC 33090 and *Listeria ivanovii* ATCC 19119



(A)



(B)



(C)

Fig. 5: Growth rate in pure culture and in mixed culture

(A): In pure culture strains V1, *Listeria innocua* ATCC 33090 and in mixed culture strains V1+ *Listeria innocua* ATCC 33090.

(B): In pure culture strains V1, *Listeria ivanovii* ATCC 19119 and in mixed culture strains V1+ *Listeria ivanovii* ATCC 19119.

(C): In pure culture strains V1, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 and in mixed culture strains V1+ *Staphylococcus aureus* ATCC 43300.

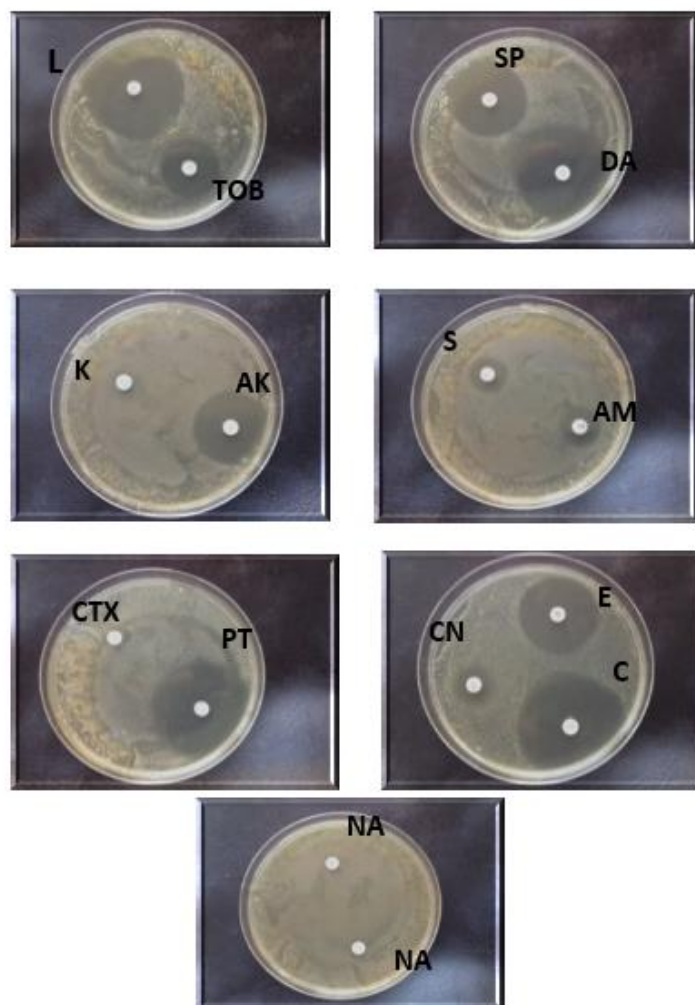


Fig. 6 : Results of Antibiotic resistance.

L: Licomycin, TOB: Tobramycin, SP : Spiramycin, DA: Clindamycin, K: Kanamycin , AK: Amikacin, S: Streptomycin, AM: Ampicilin, CN: Gentamicin, E: Erythromycin, C: Chloramphénicol, CTX: Cefotaxim, PT: Pristinamycin, NA: Nalidixic acid

REFERENCES

- [1] Grnrviève, F., 1997. "Interets nutritionnel et diététique du lait de chèvre Niort(France)" : 1-51
- [2] Carole, L., Vignola, 2002. Science et technologie du lait. Canada, Fondation de technologie laitière du Québec.
- [3] Radler, F., K. Brohl, 1984. "The metabolism of several carboxylic acids by lactic acid bacteria". Zeitschrift .fir Lebensmittel- Untersuchung und -Forschung, 179:228-231.
- [4] Lawford, G.R., A. Kugerman., T. Williams, 1979. "Dextran biosynthesis and dextransucrase production by continuous culture of *Leuconostoc mesenteroides*." Biotechnol. Bioeng., 21: 1121-1131.
- [5] Pucci, M.J., B.S. Kunka, 1995. Novel dextran produced by *Leuconostoc dextranicum*. Microlife technics incorporation. United starts patent N°4933 191.
- [6] Duboc, P., B. Mollet, 2001. "Applications of exopolysaccharides in the dairy industry." International Dairy Journal, 11: 759-768.
- [7] Cook, A.M., K. Denger, 2002. "Dissimilation of the C2 sulfonates." Arch Microbiol, 179:1-6.
- [8] Hemme, D., C. foucaud-scheunemann, 2004. "Leuconostoc, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods." Int. Dairy: pp: 467-494.
- [9] Vedamuthu, E.R., 1994. "The dairy Leconostoc: Use in dairy products". Journal of Dairy Science, 77: 2725-2737.
- [10] Priscilia, Y. Heredia-Castro; José I. Méndez-Romero; Adrián Hernández-Mendoza; Evelia Acedo-Félix; Aarón F. González-Córdova; Belinda Vallejo-Cordoba, 2015. Antimicrobial activity and partial

- characterization of bacteriocin-like inhibitory substances produced by *Lactobacillus* spp. isolated from artisanal Mexican cheese. *Journal of Dairy Science*, 98(12) : 8285-8293.
- [11] Tabanelli, G., V. Verardo, F. Pasini, P. Cavina, R. Lanciotti, M.F. Caboni, F. Gardini, C. Montanari, 2016. Survival of the functional yeast *Kluyveromyces marxianus* B0399 in fermented milk with added sorbic acid. *Journal of Dairy Science*, 99(1): 120-129.
- [12] Ashraf, R., Nagendra P. Shah, 2014. Immune System Stimulation by Probiotic Microorganisms. *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 54(7): 938-956
- [13] Ejtahed, H.S., J. Mohtadi-Nia, A. Homayouni-Rad, M. Niafar, M. Asghari-Jafarabadi, V. Mofid, 2011. Effect of probiotic yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* on lipid profile in individuals with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Dairy Science*, 94 : 3288e3294.
- [14] Pigeon, R.M., E.P. Cuesta, S.E. Gilliland, 2002. Binding of Free Bile Acids by Cells of Yogurt Starter Culture Bacteria. *Journal of Dairy Science.*, 85: 2705-2710.
- [15] 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 »)
- [16] Ahn, C., M.E. Stiles, 1990. " plasmid associated bacteriocin production by a strain of *Carnobacterium piscicola* from meat." *Appl. Environ. Microbiol.*, 56:2503.
- [17] Revol-junelles, A.M., G. Lefebvre, 1996. "Purification and N-Terminal Amino Acid Sequence of Dextranin 24, a Bacteriocin of *Leuconostoc* sp". *Current Microbiology*, 33: 136-137.
- [18] Hechard, Y., B. Derijard., F. Letellier., Y. Cenatiempo, 1992. "Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*." *J. Gen. Microbiol.*, 138: 2725-2731.
- [19] Stiles, M.E., L.M. MC Mullen, 1994. "Quality of fresh retail pork cuts stored under modified atmosphere under temperature conditions simulating export to distant markets". *Meat Sci.*, 38: 163-77.
- [20] Kempler, G.M., L.L.M. Kay, 1980. "Improved medium for detection of citrate fermenting *Streptococcus lactis* subsp *diacetylactis*." *J. Appl. Environ. Microbiol.*, 39: 956-927.
- [21] Bjorkroth, J., W.H. Holzapfel, 2006. "Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella* in: The Prokaryotes". *Springer*, 4: 267-319.
- [22] Carr, F.J., D. Hill, N. Maid, 1998. "The lactic acid bacteria: A literature survey." *Crit. Rev. Microbiol.*, 28 (2002): 281-379.
- [23] Mayeux, J.V., W. E. Sandine., P.R. Elliker, 1962. "A selective medium for detecting *Leuconostoc* in mixed-strain starter cultures." *J. Dairy Science.*, 45: 655-656.
- [24] Samelis, J., F. Maurogenakis., J. Metaxopoulos, 1994. "Characterization of Lactic Acid Bacteria isolated from naturally fermented greek dry salami." *Int. J. Food Microbiol.*, 23: 179-196.
- [25] Guiraud, J.P., 1998. "Microbiologie alimentaire". DUNOD; Paris, pp: 282-290.
- [26] Guessas, B., M. Kihal, 2004. "Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goat's milk." *African Journal of Biotechnology*, 3(6): 339-342
- [27] Philippon., C. Poyart, 2008. "Autres coques à Gram positif catalase négative d'intérêt médical : *Aerococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ". *EMC Elsevier Masson SAS. Biologie clinique*. 90-05-120.
- [28] Fleming, H.P., J.L. Etchells., R.N. Costilow, 1975. "Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber brines," *Journal of Applied Microbiology*, 30: 1040-1042.
- [29] Kihal, M., H. Prevost, D.E. Henni., Z. Benmecherrhene., C. Divies, 2009. "Carbon Dioxide Production by *Leuconostoc mesenteroides* Grown in Single and Mixed Culture with *Lactococcus lactis* in Skimmed Milk." *Scientific Research and Essay*, 4(11): 1348-1353.
- [30] McDonald, L.C., H.P. Flemming., H.M. Hanssen, 1990. "Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*." *Appl. Environ. Microbiol*, 56: 2120-2124.
- [31] 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.
- [32] Mathot, G., M. Kihal, H. Prevost., C. Divies, 1994. "Selective enumeration of *Leuconostoc* on Vancomycin agar medium." *International Dairy Journal*, 4: 459-469.
- [33] Liasi, S.A., T.I. Azmi., M.D. Hassan, M. Shuhaimi, M. Rosfarizan, A.B. Ariff, 2009. "Antimicrobial activity and anti-biotic sensitivity of three isolates of lactic acid bacteria from fermented fish product," *Malaysian Journal of Microbiology*, 5: 33-37.
- [34] Garvie, E.I., 1986. Gram positive cocci genus *Leuconostoc* in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol II. 9th edit. The Williams and Wilkins Co Baltimore, pp: 1071-1075.
- [35] Badis, D., N. Laouabdia-sellami., D. Guetarni., M. Kihal., R. Ouzrout, 2005. "Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales "arabia et kabyle". *Sciences & Technologie*, 23: 30-37.
- [36] Ogier, J.C., E. Casalta., C. Farrokh., A. Saihi, 2008. "Safety assessment of dairy microorganisms: The *Leuconostoc* genus." *International Journal of Food Microbiology*, 126: 286-290.

- [37] Ghazi, F., D.E. Henni., Z. Benmcherrhene, M. Kihal, 2009. "Phenotypic and Whole Cell Protein Analysis by SDS-PAGE for Identification of Dominant Lactic Acid Bacteria Isolated from Algerian Raw Milk." *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 4:78-78.
- [38] Dellaglio, F., H. De Roissard, S. Torriani, M.C. Curk, D. Janssens, 1994. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In: *Bactéries lactiques*. Loriga, Uriage, 11: 25-116.
- [39] Bellengier, P., D. Hemme, C. Foucaud, 1994. Citrate metabolism in sixteen *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* and subsp. *dextranicum* strains. *J. Appl. Bacteriol.*, 77: 54-60.
- [40] Kihal, M., 1996. "Etude de la production du dioxyde de carbone par *Leuconostoc mesenteroides*, éléments d'application en technologie fromagère type fromage bleu". Thèse de Doctorat d'Etat. *Université d'Oran Algérie*.
- [41] Khedid, K., M. Faid, A. Mokhtari, A. Soulaymani, A. Zinedine, 2006. Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. *Microbiol. Res.*, 10: 10-16.
- [42] Vuyst, L., E.J. Vandamme, 1994. Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: properties, biosynthesis, fermentation and applications. In: De Vuyst L, Vandamme EJ, eds. *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. Blackie Academic and Professional., pp: 151-223.
- [43] Osmanfaoulu, Ö., 2007. Detection and characterization of Leucocin OZ, a new anti-listerial bacteriocin produced by *Leuconostoc carnosum* with a broad spectrum of activity. *Food Control.*, 18: 118-123.
- [44] Xiraphi, N., M. Georgalaki, K. Rantsiou, L. Coccolin, E. Tsakalidou, E.H. Drosinos, 2008. "Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* E131," *MeatScience.*, 80:194-203.
- [45] Trias, R., E. Badosa, E. Montesinos, L. Bañeras, 2008. Bioprotective *Leuconostoc* strains against *Listeria monocytogenes* in fresh fruits and vegetables. *Int. J. Food Microbiol.*, 127: 91-98.
- [46] Benmcherrhene, Z., H.F. Chentouf, Y. Bellil, F. Ghazi, M. Quintela-Baluja, P. Calo-Mata, J. Barros-Velázquez, 2013. "Technological Aptitude and Applications of *Leuconostoc mesenteroides* Bioactive Strains Isolated from Algerian Raw Camel Milk". *BioMed Research International.*, pp: 14.
- [47] Ammor, S., G. Tauveron., E. Dufor, I. Chevalier, 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.
- [48] Lacriox, M., M. Mellette, 2011. Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *US20110236359A1*.
- [49] Hosseini, S.V., S. arlindo1, K. Bohmel, C. Fernandez, P. Calo-Mata, J. Barros -Vellazquez, 2009. "Molecular and probiotic characterization of bacteriocin producing *Enterococcus faecium* strains isolated from non fermented animal food". *Journal of Applied Microbiology*, 107: 1392-1403.
- [50] Allameh, S.K., H. Daud, F.M. Yusoff, C.R. Saad, A. Ideris, 2012. "Isolation, identification and characterization of *Leuconostoc mesenteroides* as a new probiotic from intestine of snakehead fish (*Channa striatus*)," *African Journal of Biotechnology*, 11: 3810-3816.
- [51] Argyri, A., G. Zoumpoulou, G. Kimon-Andreas, K.A. Karatzas, E. Tsakalidou, G.J. Nychas, E.Z. Panagou, C.C. Tassou, 2013. "Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests," *Food Microbiology*, 33: 282-291.
- [52] Zarour, K., Z. Benmcherrhene, M. Hadadji, B. Moussa-Boudjemaa, J.E. Henni, M. Kihal, 2012. "Caractérisation microbiologique et technologique des espèces de *Leuconostoc mesenteroides* isolées du lait cru de chèvre et de chèvre d'Algérie". *Nature & Technologie Revue.*, 8:39-47.

Résumé

La caractérisation phénotypique et génotypique des 31 souches isolées à partir de six échantillons de lait cru de chamelle et de chèvre a permis d'identifier des souches comme *Leuconostoc mesenteroides*, *Weissella cibaria*, *Weissella confusa*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* et *Lactobacillus paracasei*. Dans le but de sélection les critères de performance les souches isolées ont montré une activité antimicrobienne intéressante contre les souches indicatrices testées. En plus la détermination de nature de substances antimicrobiennes a permis de sélectionner 20 souches produisent des substances de nature protéique. Parmi ces souches, on a sélectionné 11 souches les plus performantes pour l'étude des propriétés fonctionnelles et technologiques. Selon les critères de performance résultats obtenu révéler une forte activité acidifiante des souches *Leuconostoc mesenteroides* (V1), *Lactobacillus plantarum* (AM15, AM17 et AM22) et *Lactobacillus paracasei* (AM6 et AM13), une forte activité protéolytique pour les souches *Lactobacillus plantarum* (AM15 et AM17), *Lactobacillus paracasei* (AM6, et AM13), *Weissella cibaria* AM10 et AM12) et *Leuconostoc mesenteroides* (V3 et N3) a été remarqués. Une absence de l'activité lipolytique et l'activité hémolytique avec une grande sensibilité aux antibiotiques tels que le chloramphénicol, la clindamycine, la doxycycline et l'ampicilline ont été aussi observés. L'étude de profil probiotique a montré des souches une nature hydrophobe et un phénomène d'auto-agrégation entre (49,19–85,49 %) et (31-76,36 %) respectivement avec la capacité de la survie dans diverses barrières biologiques telles que les acides (pH 3 et 4), les sels biliaires (0.5 %, 1 % et 2 %) et pepsine 3mg / ml à pH 3. L'activité antioxydante des souches par radical DPPH a révélé une inhibition du DPPH entre (32,91-69,94 %). Le potentiel antibiofilm du surnageant des souches a montré qu'il était possible d'inhiber la formation de biofilms de *Pseudomonas fluorescens* (62,7–80,32 %), *Listeria ivanovii* (42,02-76,28 %), *E. coli* (44,6-65,9 %) et *klebsiella* sp (19,08 -74,2 %). Les bactéries lactiques sélectionnées pourraient être étudiées de façon plus approfondie par des tests *in vivo*.

Mot clés :

Bactéries lactiques; Chamelle; Chèvre; Substances antimicrobiennes; Bactériocine; Antibiotique; Probiotique; Antioxydante; Biofilm; *in vivo*.