

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid IBn Badis
Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد ابن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DES SCIENCES ALIMENTAIRES

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par :

Sadji hadjira

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES ALIMENTAIRES

Spécialité : Production et transformation laitières

THÈME

*L'effet du pouvoir inhibiteur des bactéries lactiques autochtones isolés
du blé fermenté vis-à-vis *Lactobacillus plantarum* et des bactéries
pathogènes de références*

Soutenu publiquement le 18/09/2019

Devant les membres du jury

Président	Mr. DAHOU. A	Maitre Assistant	A	U. Mostaganem
Examinatrice	Mme. RECHIDI SIDHOUM. N	Maitre Assistante	A	U. Mostaganem
Encadreur	Mme .TAHLAITI. H	Maitre Assistante	A	U. Mostaganem

Travail réalisé au Laboratoire des Sciences et Techniques de Productions Animales
Année universitaire 2018-2019

Remerciement

*Avant tout, je remercie **Dieu** le tout puissant, le Miséricordieux, de m'avoir donné le courage, la force, la santé et la persistance.*

*j'adresse tous mes respects et mes remerciements à madame le docteur « **TAHLAITI hafida** » pour son encadrement et pour m'avoir accompagné tout au long mes recherche et de m'avoir rassuré lors de mes nombreux doutes et interrogations*

*Mes vifs remerciements s'adressent monsieur le docteur « **DAHOU .A** » d'avoir acceptée la présidence du jury de mon travail.*

*Je tiens à remercier vivement madame « **RECHIDI SIDHOUM .N** » d'avoir acceptée d'examiner mon mémoire.*

*Je tien à remercier également toute **les personnel** du laboratoire LSTPA, leur esprit d'équipe, et leurs aide.*

Enfin, je remercie, tous ceux qui de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Avant toute chose, je tiens à remercier Dieu le tout puissant pour m'avoir donné la force et la patience d'aller jusqu'au bout du rêve et le bonheur de lever mes mains vers le ciel et de dire « *Ya kayoum* »

Je dédie ce modeste travail à mes chères parents, à celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, à ma mère « *Zohra* »

A mon père, école de mon enfance, qui a été mon ombre durant toutes les années des études, et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner l'aide et à me protéger, « *Larbi* ».

Que dieu les garde et les protège

A mes adorables sœurs : *Khadidja, khaoula, Chaima, Chahinez.*

A la princesse de notre famille « *malek* »

Et à ma grande famille

Une spéciale dédicace à tous mes amies

A mes camarades de notre promo et à Toutes la famille pédagogique de laboratoire LSTPA

Merci infiniment à tous. Et à bientôt dans autres travaux.

Hadjira

Résumé

Les bactéries lactiques font naturellement partie de notre environnement et de notre alimentation. Elles sont utilisées dans la fermentation et la bio-conservation des aliments grâce à la production des acides organiques et d'autres substances antibactériennes telles que les bactériocines en inhibant certaines souches pathogènes. Dans le but de mettre en évidence l'effet inhibiteur de ces bactéries, nous avons étudié le pouvoir antagoniste de 19 isolats lactiques isolé à partir du blé fermenté « Hamoum » contre une bactérie lactique du genre *Lactobacillus plantarum* des souches pathogènes et/ou d'altérations (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, et *Pseudomonas aeruginosa*), selon la méthode de Fleming *et al* 1975. Des purifications des isolats lactiques ont été effectuées sur milieu MRS. Les testes de caractérisations phénotypiques de ces isolats, nous à permis d'identifier : 71% de *Enterococcus sp*, 17% *Lactobacillus sp*, 12% *Lactococcus sp*. Les interactions contre les bactéries pathogènes conduites à l'apparition de zones d'inhibition importantes au plus grand halo dont le diamètre est de 14 mm. Un test supplémentaire à été nécessaire pour connaître la nature exacte de l'agent inhibiteur. Les résultats obtenus ont montré que Cette activité antibactérienne peut être due partiellement à l'acide lactique.

Mots clés : Bactéries lactiques, Bactéries pathogènes, Interactions antibactérienne, Inhibition, Facteur d'inhibition.

الملخص

بكتيريا حمض اللبنيك هي بطبيعة الحال جزء من بيئتنا ونظامنا الغذائي . يتم استخدامها في التخمير والحفظ الحيوي للأغذية من خلال إنتاج الأحماض العضوية وغيرها من المواد المضادة للبكتيريا من خلال تثبيط بعض السلالات المسببة للأمراض. من أجل تسليط الضوء على التأثير المثبط لهذه البكتيريا ، درسنا القوة المعادية لـ 19 عزلة لبنية معزولة من القمح المخمر "حموم" ضد بكتيريا اللبن من جنس *Staphylococcus* و *Lactobacillus plantarum* ضد السلالات الممرضة من جنس (*Bacillus cereus* ، *Pseudomonas aeruginosa* ، *Escherichia coli* ، *aureus*) ، وفقاً لطريقة Fleming et al 1995 . أجريت تنقية للعزلات اللبنية على الوسط MRS. لقد سمحت لنا اختبارات التوصيف المظهري لهذه العزلات بالتعرف على: 71٪ من المكورات المعوية « *Enterococcus* » ، و 17٪ من المكورات العصوية اللبنية « *Lactobacillus* » ، و 12٪ من المكورات اللبنية « *Lactococcus* ». التفاعلات ضد البكتيريا المسببة للأمراض تؤدي إلى ظهور مناطق تثبيط مهمة لأكبر هالة قطرها 14 مم. كان من الضروري إجراء اختبار إضافي لمعرفة الطبيعة الدقيقة للعامل المثبط. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن هذا النشاط المضاد للبكتيريا يمكن أن يكون جزئياً بسبب حمض اللبنيك.

الكلمات المفتاحية: البكتيريا اللبنية ، البكتيريا الممرضة ، التفاعلات المضادة للجراثيم ، التثبيط ، عامل تثبيط.

Abstract

Lactic acid bacteria are naturally part of our environment and our diet. They are used in the fermentation and bio-preservation of food through the production of organic acids and other antibacterial substances such as bacteriocins by inhibiting certain pathogenic strains. In order to highlight the inhibitory effect of these bacteria, we studied the antagonistic power of 19 lactic isolates isolated from fermented "Hamoum" wheat against a lactic bacterium of the genus *Lactobacillus plantarum* of pathogenic strains and / or alterations (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, and *Pseudomonas aeruginosa*), according to the method of Fleming et al 1975. Purifications of the lactic isolates were performed on MRS medium. Phenotypic characterization tests of these isolates allowed us to identify: 71% *Enterococcus* sp, 17% *Lactobacillus* sp, 12% *Lactococcus* sp. The interactions against pathogenic bacteria lead to the appearance of important zones of inhibition to the largest halo whose diameter is 14 mm. An additional test was necessary to know the exact nature of the inhibitory agent. The results obtained showed that this antibacterial activity can be partially due to lactic acid

Key words: Lactic bacteria, Pathogenic bacteria, Antibacterial interactions, Inhibition, Inhibition factor.

Table des matières

Remerciements	
Dédicaces	
Résumé.....	2
ملخص.....	3
Abstract.....	4
Sommaire.....	5
Abréviations, singles et acronymes	11
Liste des tableaux	12
Liste des figures	13
Introduction	17
Première partie : étude bibliographique	
Chapitre I : les bactéries lactiques	
I- Généralités sur les Bactéries lactiques	21
II- Définition des bactéries lactiques.....	21
III- Habitat des bactéries lactiques	21
IV- Taxonomie des bactéries lactiques	22
V- Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques.....	23
V.1 Le genre <i>Lactobacillus</i>	23
V.2 Le genre <i>Lactococcus</i>	24
V.3 Le genre <i>Leuconostoc</i>	25
V.4 Le genre <i>Streptococcus</i>	25
V.5 Le genre <i>Vagococcus</i>	26
V.6 Le genre <i>Enterococcus</i>	27
V.7 Le genre <i>Aeorococcus, Pediococcus et Tetragenococcus</i>	28
V.7.1 Le genre <i>Pediococcus</i>	28
V.7.2 Le genre <i>Tetragenococcus</i>	29
V.7.3 Le genre <i>Weissella</i>	29
VI. Les Voies fermentaires des bactéries lactiques	30

VI.1. La voie Homofermentaires.....	30
VI.2. La voie Hétérofermentaires.....	30
VII. Les Voies métaboliques des bactéries lactiques	31
VII.1. Méthodes classiques	32
VII.2. Méthodes moléculaires	32
VIII. Intérêt des bactéries lactiques	33
VIII.1. Dans le domaine thérapeutique.....	33
VIII.2 Rôle technologique.....	33
VIII.2.1 Aptitude aromatisante	33
VIII.2.2 Production d'exopolysaccharides	33
VIII.3. Action probiotique.....	34
VIII.4. Dans l'industrie alimentaire	34
VIII.4.1. Rôle dans la Fermentation alimentaire.....	34
VIII.4.2. Rôle dans la conservation	35
IX. Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques.....	35
IX.1. Production d'acides et diminution de pH.....	35
IX.2. Production de peroxyde d'hydrogène.....	36
IX.3. Production du diacétyl.....	36
IX.4. Production d'acides gras	36
IX.5. Production de reutéline	36
IX.6. Production des bactériocines	36
IX.6.1Classification des bactériocines.....	37
IX6.1.1 Les bactériocines de classe I « L'antibiotiques ».....	37

IX.6.1.2 Les bactériocines de classe II	37
IX.6.1.3 Les bactériocines de classe III.....	38
IX.6.1.4 Les bactériocines de classe IV.....	38
IX.6.2 Mode d'action des bactériocines	38

Chapitre II : Les interactions bactériennes

I. Définition des interactions.....	40
II. Les interactions entre les souches de bactéries lactiques	40
II.1 Interactions positives.....	40
II.2 Interactions négatives.....	40

Chapitre III : les bactéries pathogènes

I. Les bactéries pathogènes	42
I.1 Staphylococcus aureus	42
I.1.1 Pouvoirs pathogènes	43
I.2 Escherichia coli	43
I.2.1 Mode de transmission	44
I.2.2 Pouvoirs pathogènes	44
I.3 Bacillus cereus	44
I.3.1 Pouvoir pathogène	45
I.4 Pseudomonas aeruginosa	45
I.4.1 Pouvoir pathogène	45

Deuxième partie : Recherche expérimentale

Chapitre I : Matériel et Méthodes

Objectif du travail	49
I. Origine, purification et identification des souches utilisées	49
I.1. Origine des échantillons utilisés	49
I.1.1 Les bactéries lactiques	49
I.1.2 Les souches pathogènes	49
I.1.3 Milieux de culture	49
I.2 Purification des souches utilisées.....	50
I.2.1 Revivification et purification des isolats lactiques	50
I.2.2 purification des souches pathogènes	50
I.3 Pré-identification des isolats lactiques.....	52
I.3.1 Tests morphologiques	52
I.3.1.1 Examen macroscopique	52
I.3.1.2 Examen microscopique	52
I.3.1.3 Production de la catalase	52
I.3.1.4 Conservation des souches	52
A - conservation de courte durée	52
B - conservation de longue durée	52
I.3.2 Tests physiologiques et biochimiques.....	52
I.3.2.1 Croissance à différentes températures	52
I.3.2.2 thermorésistance	53
I.3.2.3 Croissance sur milieu hypersalé	53

I.3.2.4 Croissance à pH 5 et à pH 9,6	53
I.3.2.5 Recherche de type fermentaire	53
I.3.2.6 Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH)	53
I.3.2.7 Production de l'acétoïne	54
I.3.2.8 Culture sur lait de Sherman	54
I.3.2.9 Teste en présence d'azide de sodium.....	54
I.3.2.10 Profil fermentaire	54
II . Etude de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques	55
II.1 Méthode de Fleming et <i>al</i> (1975)	55
II.2 Recherche de l'agent inhibiteur par l'utilisation du milieu tamponne.....	57

Chapitre II : Résultats et Discussion

I. Test de revivification des souches	59
II. Pré-identification	59
II.1 Etude macroscopique des bactéries lactiques	59
II.2 Etude microscopique des bactéries	60
II.2.1 Les bactéries lactiques	60
II.2.2 Les bactéries pathogènes	61
II.3 Tests physiologiques et biochimiques	63
II.3.1 Croissance à différents température.....	63
II.3.2 Croissance a différents PH	63
II.3.3 Croissance sur milieu hypersalé	63

II.3.4 test de thermorésistance	63
II.3.5 le types fermentaire	63
II.3.6 production de l'arginine	63
II.3.7 production de l'acétoine.....	63
II.3.8 test de lait de Sherman.....	63
II.3.9 test en présence d'azide de sodium.....	64
II.3.10 profil fermentaire.....	67
III. Résultats de l'activité antimicrobienne.....	69
III.1 activité antimicrobienne des bactéries lactiques contre les bactéries Pathogènes.....	79
III.2 Activité antimicrobienne entre les bactéries lactiques	74
III.3 Caractérisation de la nature de la substance inhibitrice.....	77
III.3.1 La mise en évidence des inhibitions dues à l'acide lactique	77
Conclusion	86
Annexe... ..	88
Liste des références	94

Liste des abréviations

ATCC : American type culture collection.

Pi : Phosphate inorganique.

ADP : Adénosine diphosphate.

Sp : *Streptococcus*.

ATP : Adénosine triphosphate.

Sp : Espèce non précisée.

BL : Bactéries lactique.

VP : La réaction Vogue Proskauer.

B.P : Bactérie pathogène.

Te : *Tetragenococcus*.

En : *Entéroccoccus*.

FAO : Food Agriculture Organisation.

G : Gramme.

GAP : Glycéraldéhyde phosphate.

H₂O₂ : Eau oxygénée.

Lb : *Lactobacillus*.

Lc : *Lactococcus*.

Ln : *Leuconostoc*.

MRS : Man Rogosa et Sharpe.

MRS.BCP : MRS additionné de poupre de bromocrésol.

MRS T : MRS Tamponé.

Na : Sodium.

NaCl : Chlorure de sodium.

NAD⁺ : Nicotinamide adenine dinucléotide.

Pe : *Pediococcus*.

PH : Potentiel d'hydrogène.

liste des tableaux

Tableau 1: <i>Origines et codes des différentes souches pathogènes étudiées.....</i>	<i>49</i>
Tableau 2: <i>Critères morphologiques, la coloration de Gram et le test de catalase des isolats lactiques sous microscope optique</i>	<i>60</i>
Tableau 3: <i>Critères morphologiques, la coloration de Gram et le test de catalase des souches pathogènes sous microscope optique</i>	<i>61.</i>
Tableau 4: <i>résultats des tests physiologiques et biochimiques des bactéries lactiques.....</i>	<i>64</i>
Tableau 5: <i>résultats du test de Profil fermentaire des bactéries lactiques.....</i>	<i>67</i>
Tableau 6: <i>Résultats de l'activité antimicrobienne des isolats lactiques obtenu par la méthode de Fleming et al (1975).....</i>	<i>71</i>
Tableau 7: <i>Résultats de l'activité antimicrobienne entre les bactéries lactiques.....</i>	<i>75</i>
Tableau 8: <i>la mise en évidence des inhibitions dues à l'acidité contre les bactéries pathogènes.....</i>	<i>78</i>
Tableau 9: <i>la mise en évidence des inhibitions dues à l'acidité entre les bactéries lactiques.....</i>	<i>82</i>

Liste des figures

figure 1: <i>Lactobacillus plantarum</i> au microscope électronique.(Denis et al,2007).....	24
figure 2: <i>Lactobacillus acidophilus</i> au microscope électronique(Denis et al,2007).....	24
figure 3: <i>Lactococcus lactis subsp lactis</i> au microscope électronique(Pot, 2008).....	24
figure 4: <i>Lactococcus lactis subsp cremoris</i> au microscope électronique(Pot, 2008).....	24
figure 5: <i>Leuconostoc lactis</i> au microscope électronique.(Ogier et al., 2008).	25
figure 6: <i>Leuconostoc cremoris</i> au microscope électronique.(Ogier et al., 2008).....	25
figure 7: <i>streptococcus thermophilus</i> au microscope électronique.(Furet et al., 2004).....	26
figure 8: genre de <i>vagococcus</i> au microscope électronique(Ammor et al., 2005).....	27
figure 9: <i>Enterococcus faecalis</i> au microscope électronique (Michel fedrighi., 2005).....	27
figure 10: <i>Enterococcus faecium</i> au microscope électronique (Michel fedrighi., 2005).....	27
figure 11: <i>pediococcus acidilactici</i> au microscope électronique (Michel fedrighi., 2005).....	28

figure 12: <i>genre Tetragenococcus au microscope électronique(Masuda et al., 2008)</i>	29
figure 13: <i>Genre weissella au microscope électronique(Michel fedrighi., 2005)</i>	30
figure 14: <i>Représentation schématique des principales voies de fermentation des bactéries lactiques . (Prescott et al. 2003)</i>	31
figure 15: <i>Aspect morphologique de la souche de Staphylococcus aureus observée au microscope électronique (Leyral et Vierling, 2007)</i>	43
figure 16: <i>Escherichia coli observés au microscope électronique (G×10000) (Goubau et Pellengrims,2000)</i>	43
figure 17: <i>Aspect morphologique de la souche de Bacillus cereus observée au microscope électronique (Gaillard, 1989)</i>	44
figure 18: <i>Pseudomonas aeruginosa observés au microscope électronique (Guibert M.,1998)</i>	45
figure 19: <i>Revivification et purification des isolats lactiques</i>	51
figure 20: <i>Revivification et purification des souches pathogènes</i>	51
figure 21: <i>Méthode de Fleming et al (1975) (test des spots)</i>	56
figure 22: <i>revivification des isolats étudiés</i>	59
figure 23: <i>Aspect macroscopique des bactéries lactiques</i>	59
figure 24: <i>Aspect microscopique des bactéries lactiques étudiées</i>	61
figure 25: <i>Aspect microscopique des bactéries pathogènes étudiées</i>	62

figure 26: <i>testes de caractérisation phénotypique des bactéries lactiques</i>	66
figure 27: profil fermentaire des bactéries lactiques étudiées.....	68
figure 28: Distribution quantitative des isolats lactiques.....	69
figure 29: zone d'inhibition d'une bacteria lactique.....	69
figure30: Inhibition des bactéries pathogènes par les bactéries lactiques.....	72
figure 31: Résultats de l'effet inhibiteur des bactéries lactiques contre les bactéries pathogènes.....	73
figure 32: inhibitions entre les bactéries lactiques.....	75
figure 33: Résultats de l'effet inhibiteur des bactéries lactiques vis-à-vis <i>Lactobacillus plantarum</i> (R27).....	76
figure 34: diamètres d'inhibition contre les bactéries pathogènes sur milieu MRS NT et MRS T.....	79
figure 35: Résultats de l'effet inhibiteur des bactéries lactiques contre les bactéries pathogènes sur milieu tamponné.....	80
figure 36: Inhibitions des bactéries lactiques contre les bactéries pathogènes en milieu tamponné et non tamponné.....	81
figure 37: Résultats de l'effet inhibiteur des bactéries lactiques contre la bactérie R27 sur milieu tamponné.....	83
figure 38: Inhibition entre les bactéries lactiques sur milieu MRS NT et MRS T	83
figure 39: Inhibitions entre les bactéries lactiques en milieu tamponné et non tamponné.....	84

Introduction

Introduction :

Les bactéries lactiques sont des microorganismes très répandus dans la nature. On les trouve dans le sol, sur les végétaux. Elles jouent un rôle important dans notre santé car elles constituent une fraction majeure de notre flore intestinale et tapissent les muqueuses nasales, buccales et vaginales, contribuant ainsi à nous protéger contre l'invasion des germes pathogènes.(Badis *et al*, 2005).

Les bactéries lactiques sont utilisées depuis des siècles pour fermenter les aliments. Elles ont largement présentées un grand intérêt biotechnologique. Considérées comme inoffensives pour l'homme, leur usage est fréquent dans le monde entier pour fabriquer des produits laitiers fermentés (fromage, yaourts...).(Stiles *et al*,1997). La production d'acide lactique est essentielle à la fermentation de ces produits et leur confère une saveur typique.(Pilet *et al*,2005).

Les bactéries lactiques colonisent naturellement plusieurs matrices alimentaires. Ces micro-organismes sont tolérés par l'homme et les animaux, ce qui a conduit à la reconnaissance de leur statut GRAS (Generally Recognized As Safe) (Klaenhammer *et al.*, 2005).

La capacité des bactéries lactiques à produire des composés antagonistes tels que les acides organiques (acide lactique et acide acétique), qui font baisser le pH dans le milieu. Ces composés constituent des facteurs majeurs qui inhibent la croissance des autres microorganismes concurrents. La synthèse du peroxyde d'hydrogène est reconnue depuis très longtemps, elle consiste des composés inhibiteurs de nature protéique appelés bactériocines qui renforce la conservation (Bekhouche et Boulahrouf, 2005).

Les bactériocines sont des substances protéiques antimicrobiennes qui ont un large spectre d'inhibition incluant des micro-organismes d'altération et pathogènes, Ceci a conduit les chercheurs à s'intéresser à ces molécules et à leur éventuelle application dans le domaine de l'agro-alimentaire comme bio-conservateurs et en médecine humaine et vétérinaire comme de nouveaux agents antimicrobiens (Mozzi *et al.*, 2010).

La bio-conservation ou bien la technologie dite «douce» de conservation des aliments est une conservation naturelle qui préserve les propriétés organoleptiques et nutritionnelles de l'aliment, par l'utilisation des microorganismes vivants (Gálvez *et al.*, 2007; Settanni & Corsetti, 2008).

L'utilisation des bactéries lactiques permet de satisfaire les besoins de point de vue sanitaire en industrie alimentaire, et permet d'inhiber la prolifération des microorganismes pathogènes et ainsi d'assurer une bonne conservation des aliments (Paul Ross et *al.*, 2002).

Notre travail s'inscrit dans le cadre de la recherche du pouvoir inhibiteur des bactéries lactiques isolée du *Hamoum*. La sélection des souches inhibitrices ayant un pouvoir inhibiteur contre une bactérie lactique du genre *Lactobacillus plantarum* et des bactéries pathogènes et/ou d'altérations (*staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, et *pseudomonas aeruginosa*) s'avère nécessaire.

Première partie

Synthèse bibliographique

Chapitre 1

Les bactéries lactiques

I. Généralités sur les Bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques sont utilisées depuis des millénaires dans l'alimentation humaine (Penaud, 2006). La découverte de leur action sur le lait fut probablement accidentelle mais leur utilisation fut perpétuée sous forme de levains. La fermentation confère aux aliments une saveur et une texture particulière, permet de mieux les conserver et apporte aussi certains bénéfices nutritionnels. Ces bactéries furent et sont encore utilisées sous la forme de levains artisanaux, mais le développement de l'industrie de transformation, en particulier de l'industrie laitière, a conduit à la production de ferments industriels capables d'assurer à la fois la qualité et la constance du produit. Malgré leur importance économique, les bactéries lactiques n'ont pas toujours reçu l'attention nécessaire ni de la part des microbiologistes ni de celle des industriels. Depuis quelques années, elles deviennent un sujet d'étude privilégié de par le monde (Novel G., 1993).

II. Définition des bactéries lactiques :

Décrites pour la première fois par Orla-Jensen (1919) au début du XX^{ème} siècle, les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène, qui n'est pas clairement défini du point de vue taxonomique.

Les bactéries lactiques sont définies comme des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes (requièrent des molécules organiques complexes comme source énergétique) (Roissart, 1986); elles rassemblent en effet un certain nombre de genres qui se caractérisent par la production liée à un métabolisme exclusivement fermentaire, de quantités importantes d'acide lactique à partir des sucres. La fermentation est dite : homolactique si l'acide lactique est pratiquement le seul produit formé et hétérolactique si d'autres composés sont aussi présents (acide acétique, éthanol, CO₂ ...etc.) (Leveau et Bouix, 1993; Pilet et al., 2005). Elles sont Gram positif, généralement immobiles, asporulées, catalase négative, oxydase négative généralement nitrate réductase négative, ce sont des bactéries anaérobies facultatives. Elles 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).

III. Habitat des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques ont pour habitat de nombreux milieux naturels, des végétaux (Plantes et fruits), des animaux et des humains (cavités buccales et vaginales, fèces et dans le lait). Mais certaines espèces semblent s'adapter à un environnement spécifique et ne

sont guère trouvées ailleurs que dans leurs habitats naturels (De Roissart., 1986). Les espèces du genre *Lactococcus* sont isolées du lait ou des végétaux qui sont les réservoirs naturels de la plupart de ses espèces. L'espèce *Lactococcus lactis* a été isolée pour la première fois à partir du lait fermenté par Lister en 1873 et reconnue comme agent primaire de l'acidification du lait caillé. (Bergey's manual., 2009).

Parmi les espèces du genre *Streptococcus*, l'espèce *Streptococcus thermophilus* est isolée du lait pasteurisé, du matériel de laiterie et de levains artisanaux. Les espèces du genre *Leuconostoc* sont isolées du lait, des produits laitiers, des fruits, des légumes (en particulier la betterave), des végétaux en fermentation (comme la choucroute), des produits de la panification et des solutions visqueuses de sucre dans les sucreries. Les espèces du genre *Pediococcus* sont présentes surtout dans les végétaux en décomposition, parfois dans les boissons alcoolisées, le lait, les différents fromages (Parmesan et autres fromages italiens) et les préparations culinaires (Saucisses, anchois salés ou sauce de soja). (Bekhouche., 2006). Les espèces du genre *Lactobacillus* sont présentes dans plusieurs milieux différents : dans le lait et les fromages (*Lb. casei subsp. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. curvatus* et *Lb. brevis*), dans les laits fermentés (*Lb. kefir*, *Lb. brevis* et *Lb. fermentum*), dans les produits végétaux fermentés, les marinades, l'ensilage, le vin et les viandes fraîches ou fermentées (*Lb. brevis*, *Lb. Curvatus*, *Lb. buchneri* et *Lb. san francisco*) (Demazeaud., 1996).

IV. Taxonomie des bactéries lactiques :

Depuis la description du *Bacterium lactis*, la taxonomie des bactéries lactiques est en évolution permanente. Le nombre de nouvelles espèces a augmenté énormément au cours de ces dix dernières années.

La classification phénotypique des bactéries lactiques est fondée sur la morphologie, la croissance à différentes températures, le mode de fermentation des sucres, la capacité de croissance à différentes concentrations de sel, la tolérance aux pH acides et alcalins, la configuration de l'acide lactique, l'hydrolyse de l'arginine et la formation d'acétoïne.

Par ailleurs, une classification selon la composition de la paroi cellulaire (de Ambrosini et al., 1996) incluant la nature des acides gras qui la composent, a été proposée (Gilarová et al., 1994; König & Fröhlich, 2009). Une autre classification, basée sur la nature des produits du métabolisme bactérien obtenus à partir des glucides a subdivisé les bactéries lactiques en trois groupes (McLeod et al., 2008).

-Le groupe 1 : renferme majoritairement les *Lactobacilles* homofermentaires.

-Le groupe 2 : contient les bactéries hétérofermentaires et regroupe les espèces des genres *Leuconostoc*, *Oenococcus*, et *Weissella*, ainsi que quelques espèces appartenant au genre *Lactobacillus*.

-Le groupe 3 : regroupe quant à lui quelques espèces appartenant au genre *Lactobacillus* et la majorité des espèces appartenant aux genres *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus*. Ce dernier qui occupe une position intermédiaire entre les groupes 1 et 2, renferment ainsi des espèces capables d'être homo- ou hétérofermentaires selon les conditions environnementales (McLeod et al., 2008). Selon la seconde édition de Bergey's manual of systematic bacteriology (Vos et al., 2009), les bactéries lactiques sont classées dans le phylum des Firmicutes, la Classe des *Bacilli* et l'Ordre des *Lactobacillales*, renfermant trente-cinq genres répartis en six familles :

Aerococcaceae, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* et *Streptococcaceae*. Seuls douze genres sont utilisés en technologie alimentaire.

L'appellation bactérie lactique est aussi souvent étendue aux genres *Bifidobacterium*,

Macrococcus, *Brevibacterium* et *Propionibacterium* qui leur sont apparentés et qui sont également utilisés pour la fabrication de divers produits fermentés (Klaenhammer et al., 2005; Pfeiler & Klaenhammer, 2007). Ils bénéficient également du statut GRAS (Adams & Marteau, 1995; Klaenhammer et al., 2005). Quelques espèces du genre *Streptococcus*, *Enterococcus* et certains *Lactobacillus* sont néanmoins considérées comme des pathogènes opportunistes pouvant provoquer des maladies (Aguirre & Collins, 1993; König & Fröhlich, 2009).

V. Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques

V.1. Le genre *Lactobacillus* :

Famille : *Lactococcaceae*

Genre : *Lactobacillus*

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



Figure 01 : *Lactobacillus plantarum* au microscope électronique. (Denis et al,2007).

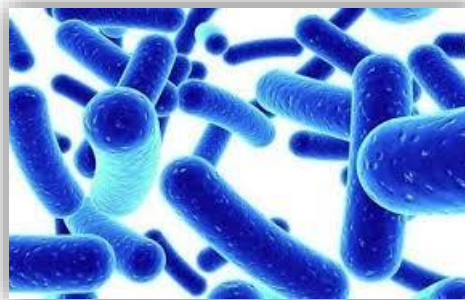


Figure02 : *Lactobacillus acidophilus* au microscope électronique (Denis et al,2007).

V.2. Le genre *Lactococcus* :

Famille : *Streptococcaceae*

Genre : *Lactococcus*

Le genre *Lactococcus* (*streptocoque* du groupe N) représente les streptocoques dits «lactiques», car ils sont associés à de nombreuses fermentations alimentaires et ne possèdent aucun caractère pathogène. Les produits végétaux constituent leur réservoir principal, mais ils sont largement présents dans le lait et les produits laitiers (Pilet et al., 2005). *Les lactocoques* se présentent sous forme de coques en paires ou en chaînes de longueur variable . Ce sont des bactéries anaérobies facultatives homofermentaires ne produisant que de l'acide lactique L(+), seul *Lactococcus lactis ssp. lactis biovar. diacetylactis* produit le diacétyle. Leur température optimale de croissance est proche de 30°C, capables de se développer à 10°C, mais pas à 45°C.

Quelques espèces produisent des exopolysaccharides et des bactériocines. Elles sont capables de se développer à 3% de bleu de méthylène et d'hydrolyser l'arginine (Tammime, 2002). Actuellement, le genre *Lactococcus* comprend cinq espèces et plusieurs sous-espèces; *Lactococcus lactis* est l'espèce la plus connue avec ses trois sous-espèces : *Lc. lactis subsp lactis*, *Lc. lactis subsp cremoris* et *Lc. lactis subsp hordniae* (Pot et al., 1996 ; Pot, 2008).



Figure03: *Lactococcus lactis subsp lactis* au microscope électronique(Pot, 2008).



Figure04: *Lactococcus lactis subsp cremoris* au microscope électronique(Pot, 2008).

V.3. Le genre *Leuconostoc* :

Famille : *Leuconostocaceae*

Genre : *Leuconostoc*

Ils représentent les coques hétérofermentaire , avec production d'acide lactique (isomère D), de CO₂ et d'éthanol, et se regroupent en paires ou en chaînettes mésophiles. Les caractéristiques telles que l'hydrolyse de l'esculine, la formation de dextrans, les conditions de croissance, la capacité à croître à différents pH et température, l'assimilation de citrate et/ou malate permettent la différenciation entre les genres *Leuconostoc* et *Weissella* (Ho et al., 2007). Actuellement, le genre *Leuconostoc* comprend quatorze espèces, ils sont également anaérobies facultatifs et exigeants au point de vue nutritionnel et leur croissance est toujours lente. Le développement des *Leuconostoc* entraîne souvent l'apparition d'une viscosité dans le milieu grâce à la production des exopolysaccharides. Les *Leuconostoc* principalement *Ln. mesenteroides ssp. cremoris* et *Ln. lactis* sont utilisés en association avec les *lactocoques* dans l'industrie laitière pour produire en plus de l'acide lactique et le CO₂, des substances aromatiques telles que le diacétyl et l'acétone à partir des citrates du lait (Ogier et al., 2008). Récemment, l'espèce *Leuconostoc oenos* isolée de vins a été classée dans un nouveau genre, *Oenococcus oeni* et certaines espèces de *lactobacilles* hétérofermentaires ont été groupées avec *Leuconostoc paramesenteroides* dans le nouveau genre *Weissella* (Stiles et Holzappel, 1997).



Figure05 : *leuconostoc lactis* au microscope électronique.(Ogier et al., 2008).

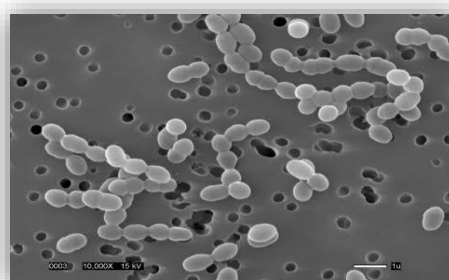


Figure06: *leuconostoc cremoris* au microscope électronique.(Ogier et al., 2008).

V.4. Le genre *Streptococcus*

Famille : *Streptococcaceae*

Genre : *Streptococcus*

Le genre *Streptococcus* est toujours large et la classification est très mouvementée . Ce genre est généralement divisé en trois groupes : pyogène, oral et les autres streptocoques. Le groupe pyogène contient plusieurs streptocoques pathogènes, hémolytiques

(hémolyse) qui nuisent à la santé humaine. Les *Streptococcus pneumoniae*, précédemment inclus dans ce groupe, sont transférés maintenant dans le groupe oral puisqu'ils sont associés principalement à la cavité orale de l'homme et de l'animal. En général,

les *streptocoques pyogènes* sont α -hémolytiques tandis que les *streptocoques oraux* sont α - ou non-hémolytiques. Le groupe oral est divisé en cinq sous-groupes phylogénétiques qui sont respectivement les groupes *anginosus*, *mitis*, *salivarius*, *bovis* et *mutans*.

Les caractéristiques biochimiques telles que: la fermentation des hydrates de carbonés, l'hydrolyse de l'arginine, et certaines activités enzymatiques sont utilisées dans la classification (Furet et al., 2004; Rantsiou et al., 2004; Rossetti et Giraffa, 2005 ; Koort et al., 2006 ; Piraino et al., 2006 ; Desari et al., 2008).

La seule espèce de streptocoques qui soit utilisée en technologie alimentaire est *Streptococcus thermophilus*. Cette espèce est l'un des deux ferments (avec *Lactobacillus delbrückii ssp bulgaricus*) impliquée (et obligatoire) pour la dénomination yaourt en législation française et pour certains fromages. Les *Sp. thermophilus* ont été inclus dans le groupe des «autres streptocoques» (Scheilfer, 1987) mais ensuite, transférés au groupe des streptocoques oraux à cause de leur degré d'homologie avec l'ADN de *Sp. salivarius* (Haddie, 1995). Une troisième espèce, *Sp. vestibularis* appartient également au groupe des streptocoques (Kawamura et al., 1995). La résistance à la température, la capacité à croître à 52°C et le nombre limité des hydrates de carbone permettent de distinguer les *Sp. thermophilus* de la plupart des autres streptocoques (Haddie, 1986).

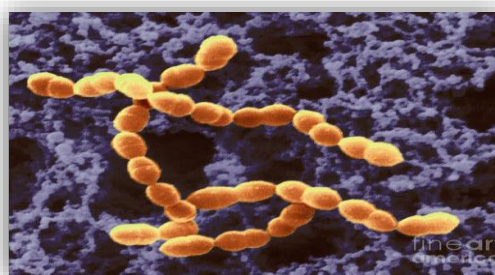


Figure07: *streptococcus thermophilus* au microscope électronique. (Furet et al., 2004).

V.5. Le genre *Vagococcus* :

Famille : *Enterococcaceae*

Genre : *Vagococcus*

Les espèces du nouveau genre *Vagococcus* sont facilement confondues avec les *lactocoques* au niveau morphologique, mais ces deux genres sont clairement distincts

par leur composition en acides gras. Certaines espèces de *Vagococcus* sont mobiles (Teixeira et al., 1999). Les amorces d'oligonucléotides spécifiques à ce genre et ses espèces sont disponibles, ce qui rend l'identification des bactéries de ce genre fiable et réalisable (Ammor et al., 2005 ; Endo et Okada, 2005).



Figure08: genre de *vagococcus* au microscope électronique (Ammor et al., 2005)

V.6. Le genre *Enterococcus*

Famille : *Enterococcaceae*

Genre : *Enterococcus*

Le genre *Enterococcus* regroupe les *streptocoques fécaux* qui présentent une hémolyse de type α , β , et qui appartiennent au groupe sérologique D. Ce sont des commensaux de l'intestin. Les espèces rencontrées dans l'alimentation sont essentiellement *En. faecalis* (auparavant *Streptococcus faecalis*), et ses variétés *En. durans* et *En. bovis*). Les *Enterococcus* sont les bactéries lactiques les plus controversées (Franz et al., 2003). Les *entérocoques* produisent des bactériocines (Moreno et al., 2006 ; Sabia et al., 2003, Sabia et al., 2002).

D'ailleurs, des préparations d'*En. faecium* (autrefois *Sp. faecium*) et d'*En. faecalis* ont été utilisées en tant que probiotiques (Ruiz-Moyano et al., 2008). Certaines résistent aux antibiotiques et transfèrent de telles propriétés au moyen d'éléments génétiques mobiles.

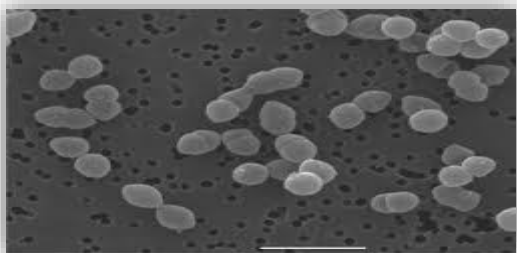


Figure09: *Enterococcus faecalis* au microscope électronique (Michel fedrighi., 2005).

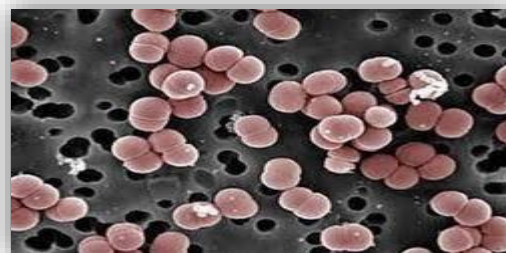


Figure10: *Enterococcus faecium* au microscope électronique (Michel fedrighi., 2005).

V.7. Le genre *Aerococcus*, *Pediococcus* et *Tetragenococcus*

Ce sont des coques formées de cellules groupées en tétrades. Le genre *Aerococcus* qui contient cinq espèces est généralement moins intéressant dans l'agroalimentaire. Cependant, une étude récente a suggéré que ces bactéries pourraient être responsables du verdissement des produits carnés cuits (Peirson et al., 2003).

V.7.1. *Pediococcus*

Famille : *Lactococcaceae*

Genre : *Pediococcus*

Sept espèces de *Pediococcus* sont connues: *Pe. acidilactici*, *Pe. damnosus*, *Pe.dextrinicum*, *Pe. inopinatus*, *Pe. parvutus*, *Pe. pentosaceus* et *Pe.urinaeequi*. Collins et al.1990), ont proposé de reclasser la dernière avec le genre des *Aerococcus* mais aucun changement officiel sur cette suggestion n'a été réalisé (Dobson et al., 2010). Avec la transposition de *Pe. urinae-equi* au genre *Aerococcus* et de *Pe. halophilus* au genre *Tetragenococcus*, les *Pediococcus* peuvent être décrits comme les seules coques lactiques acidophiles et homofermentaires. Ils se divisent alternativement dans deux plans ce qui aboutit à la formation de tétrades (Simpson et Taguchi, 1995). Ces dernières sont importantes dans l'agroalimentaire tant sous l'aspect négatif que positif. Les *Pe.damnokus* sont les microorganismes majeurs de l'altération de la bière à cause de la formation des diacétyl/acétoïne qui créent le goût du bière. Les espèces *P. acidilactici* et *P. pentosaceus* ont démontré leur utilité dans l'élaboration de plusieurs produits carnés fermentés naturels. Ceci a conduit à de nombreuses sélections de souches et l'utilisation comme agents antibactériens ou probiotiques dans la fabrication de produits carnés (Ruiz-Moyano et al., 2008 ; Albano et al., 2007 ; Schneider et al., 2006). Les pédiocoques sont également des bactéries lactiques autochtones qui permettent la maturation des fromages (Gonzalez et al., 2007 ; Gurira et al., 2005).

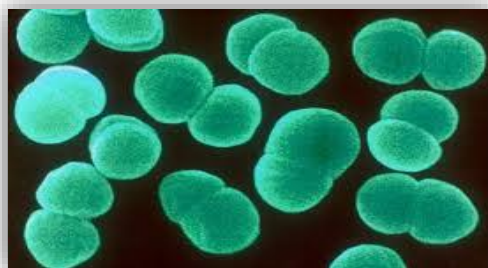


Figure11: *pediococcus acidilactici* au microscope électronique (Michel fedrighi., 2005)

V.7.2. *Tetragenococcus***Famille :** *Enterococcaceae***Genre :** *Tetragenococcus*

Seulement deux espèces de *Tetragenococcus* sont connues: *Te. halophilus* (précédemment considérées comme *Pe. halophilus*) et *Te. muriaticus*. Les *Enterococcus solitarius* sont phylogénétiquement liés au *Tetragenococcus*. Ces bactéries résistent à des concentrations élevées en sel (supérieures à 18% NaCl) et en sont dépendantes pour leur croissance. Les espèces *Tetragenococcus* ont un rôle crucial dans la fabrication des produits alimentaires à concentration de sel élevée par exemple les sauces de soja (Masuda et al., 2008 ; Tosukhowong et al., 2005).

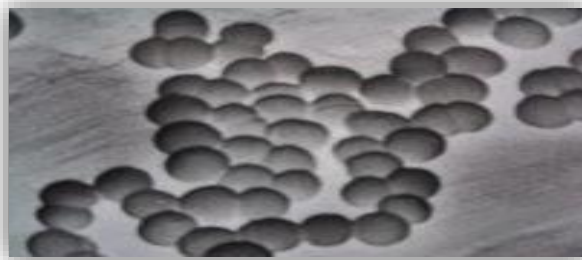


Figure12: genre *Tetragenococcus* au microscope électronique(Masuda et al., 2008)

V.7.3. *Weissella***Famille :** *Leuconostocaceae***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 G. positif, se présentant de manière isolée ou groupés par deux ou en courtes chaînes, non sporulés, immobiles, catalase négative (*Weissella paramesenteroides* peut produire une pseudocatalase 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. (Michel fedrighi., 2005).

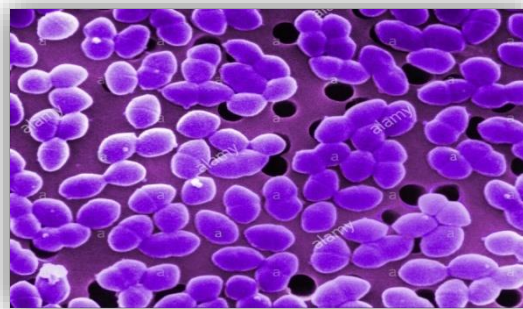


Figure13: Genre *Weissella* au microscope électronique
(Michel fedrighi., 2005)

VI. Les Voies fermentaires des bactéries lactiques :

En se basant sur la voie empruntée et le produit final de la fermentation, les bactéries lactiques sont divisées en deux groupes :

VI.1 La voie Homofermentaires :

Toutes les bactéries lactiques (à l'exception des genres : *Leuconstoc*, *Oenococcus*, *Weissella* et certains membres du genre *Lactobacillus*) empruntent la voie de la glycolyse pour dégrader les hexoses (ex : glucose). Après son transfert vers la cellule, le glucose subit une phosphorylation pour se transformer en fructose qui est à son tour phosphorylé en fructose 1-6 di-phosphate puis clivé en dihydroxyacétone phosphate et glycéraldéhyde phosphate (GAP), ces deux derniers sont convertis en pyruvate. Le pyruvate est dans une dernière étape réduit en acide lactique qui est le produit unique c'est la fermentation homolactique.

Dans les conditions défavorables telles la limitation du glucose, ces bactéries produisent également l'acide formique, l'acide acétique, l'éthanol et/ou le CO₂ par la voie de fermentation des acides mixtes (Mozzi et *al.*, 2010).(figure14.)

VI.2 La voie Hétérofermentaires :

Ce groupe de bactéries lactiques utilise la voie des pentoses phosphate (ou 6-phosphogluconate) qui consiste à une déshydrogénation du glucose, après sa phosphorylation, pour donner le 6-phosphogluconate qui subira une décarboxylation. Le pentose résultant est clivé en glycéraldéhyde phosphate (GAP) qui suit la voie de la glycolyse donnant l'acide lactique et l'acétyl phosphate qui sera réduit en éthanol. En raison de la production de CO₂, d'éthanol ou de l'acétate en plus de l'acide lactique, cette fermentation est appelée hétérolactique (Salminen et *al.*, 2004).(figure14).

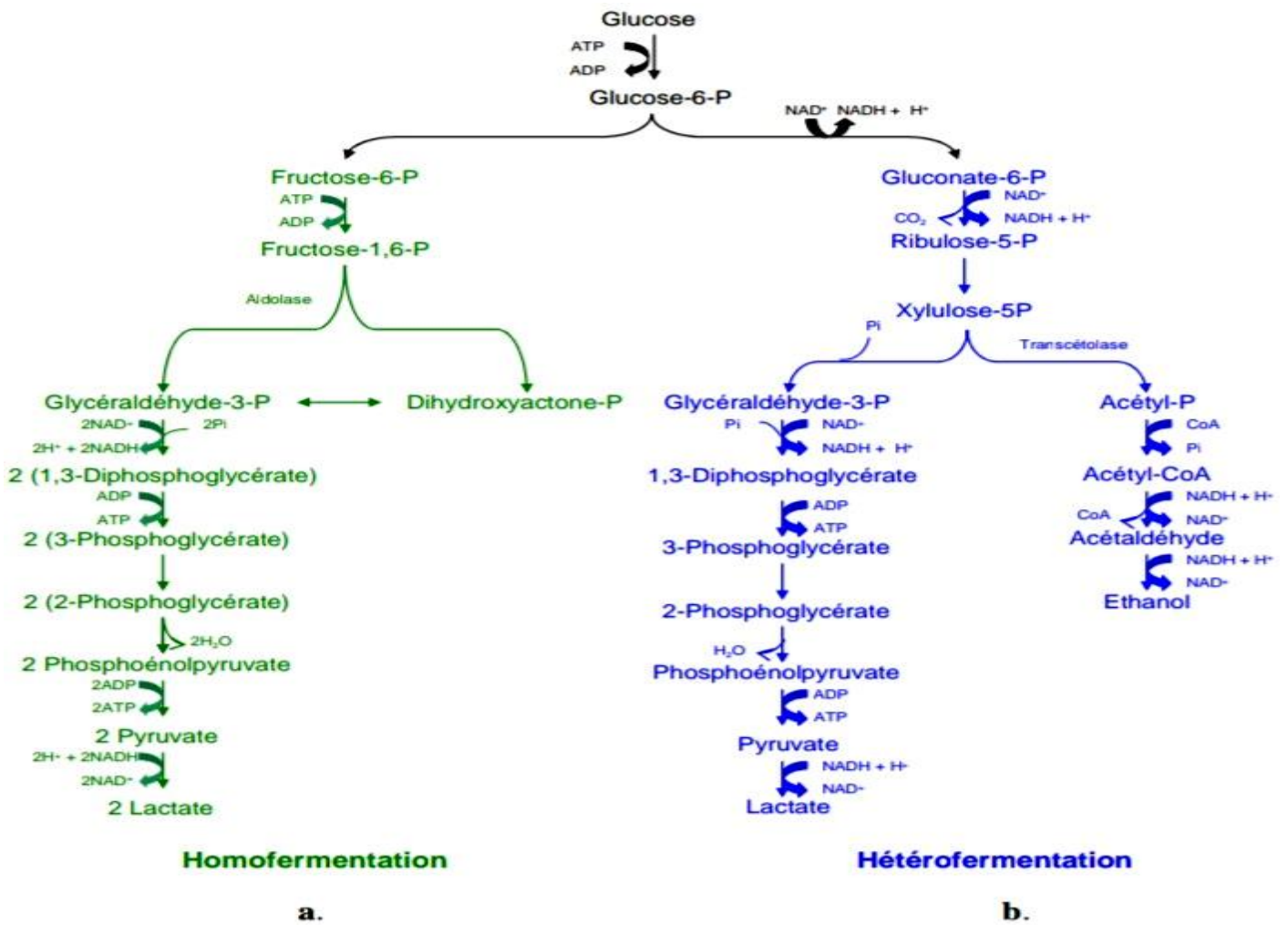


Figure 14: Représentation schématique des principales voies de fermentation des bactéries lactiques . (Prescott et al. 2003).

ATP : Adénosine triphosphate.

ADP : Adénosine diphosphate.

NAD⁺/ NADH, H⁺ : Couple oxydant/réducteur du nicotinamide/ adénine dinucléotide.

Pi: Phosphate inorganique.

VII. Les Voies métaboliques des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques ont de nombreuses propriétés métaboliques. Ces propriétés (technologiques, sensorielles antimicrobiennes ou probiotiques) sont spécifiques de l'espèce, ce qui implique qu'on puisse les mettre en évidence par des techniques d'identification et de différenciation.

VII.1. Méthodes classiques :

Les caractéristiques phénotypiques ont généralement servi de point de départ pour plusieurs tests sophistiqués et constituent la base de différenciation et d'identification des bactéries lactiques. Différents tests clefs sont largement adoptés. La morphologie ainsi que les méthodes physiologiques, métaboliques/ biochimiques et chimio-taxonomiques sont les plus utilisées. Les méthodes physiologiques incluent principalement, la croissance à certaines températures, à certaines concentrations de NaCl, à différents pH. Les méthodes métaboliques /biochimiques incluent principalement, la production de CO₂ en milieu glucosé le profil de fermentation de nombreux sucres, l'hydrolyse de l'arginine, de l'esculine et la détermination de l'isomère optique de l'acide lactique. Les méthodes chimio-taxonomiques incluent principalement, la détection de l'acide meso-diaminopimelique (mDAP) dans le peptidoglycane. Schillinger et Lücke (1987) ont été les premiers à proposer une clef d'identification des bactéries lactiques de la viande basée sur la comparaison des caractéristiques physiologiques et biochimiques typiques des différentes espèces (Ammor, 2004).

Au plus des méthodes mentionnés ci-dessus, il ya aussi la technique sérologique. pour les bactéries lactiques, l'analyse sérologique de fait principalement suivant la méthode de Lancefield (1933), basée sur l'utilisation de polysaccharides de l'enveloppe cellulaire en tant qu'antigènes (Curk et *al.*, 1994).

VII.2. Méthodes moléculaires :

Les techniques génotypiques basées sur l'analyse de l'ADN permettent une meilleure différenciation des micro-organismes à différents niveaux, allant du genre jusqu'à la souche en fonction des méthodes utilisées. En général, elles ont l'avantage sur les méthodes d'identification phénotypique de ne pas être influencé par les conditions de culture (Gevers, 2002). Les méthodes de typage des souches deviennent de plus en plus importantes dans l'étude des bactéries lactiques dont on peut dénombrer les suivantes :

- Extraction d'ADN.
- Hybridation ADN-ADN.
- Séquençage de la sous unité ribosomale 16S.

- Utilisation du PCR (Polymerase Chain Reaction).
- Analyse des séquences et identification des bactéries.

VIII. Intérêt des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques jouent un rôle important que ce soit dans l'industrie alimentaire ou dans le domaine thérapeutique.

VIII.1. Dans le domaine thérapeutique :

Dans le domaine de la santé, certaines bactéries lactiques spécifiques sont utilisées comme probiotiques c'est-à-dire des micro-organismes vivants dont l'application à l'homme ou à l'animal exercent un effet bénéfique sur ce dernier par amélioration des propriétés de la flore intestinale. Les espèces couramment utilisées sont *Lb. Acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. johnsoni*, *Lb. reuteri*, *Lb. delbruecki, subsp bulgaricus* (Salminen et al., 2004). Les souches lactiques sont également utilisées dans le traitement de certaines affections telles que les diarrhées, les allergies alimentaires. D'autres effets, comme la prévention des gastro-entérites nosocomiales chez le nourrisson, des propriétés anti-cancérogènes, anti hypercholestérolémiques, lutte contre *Clostridium* et *Helicobacter pylori*, prévention des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

VIII.2 Rôle technologique

VIII.2.1 Aptitude aromatisante :

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. butane-diol, l'éthanol, l'acétate, le formiate, ...etc.) principalement à partir du lactose, du citrate, des acides aminés et des matières grasses. Cette fonctionnalité est particulièrement importante lors de l'élaboration des laits fermentés, des fromages frais, crèmes et beurre, dont l'arôme principal est lié à cette activité microbienne (Bourgeois et larpent, 1996 ; Gerrit et al., 2005 ; Cholet, 2006).

VIII.2.2 Production d'exopolysaccharides

Certaines souches de bactéries lactiques ont la capacité de synthétiser et d'excréter, au cours de leur croissance, des polymères de sucre appelés polysaccharides exocellulaires ou EPS, qui permettent d'améliorer la texture et la viscosité du produit fini (Dupont, 1998). En général, la présence de polysaccharides dans des produits fermentés, tels les yogourts, permet d'augmenter l'homogénéité du produit et rend sa présentation plus agréable (Desmazaud, 1983).

VIII.3 Action probiotique

Le terme probiotique dérive de deux mots grecs « pro » et « bios » et signifie littéralement « en faveur de la vie » (Roberfroid, 2002). Un probiotique est un microorganisme vivant qui est lorsqu'il est ingéré en quantité suffisante, exerce un effet positif sur la santé (FAO, 2001).

Les bactéries lactiques sont de plus en plus utilisées en alimentation humaine et animale pour leurs effets probiotiques (Givry, 1996). Parmi ces effets, on peut citer :

- un effet inhibiteur sur le développement et la synthèse de toxines par autres microorganismes pathogènes (Karovicova Et Kohajdova, 2003) .
- Des propriétés antitumorales qui pourraient être due soit à l'inactivation ou l'inhibition des composés carcinogènes dans le tractus gastro-intestinal, la réduction des activités enzymatiques des bactéries intestinales telle que la *β.glucoronidase*, l'*azoréductase* et la *nitroréductase* (Chafai ,2006).
- *La prévention et traitement des diarrhées dues aux infections gastro-intestinales* (Lyons, 2000).
- Certaines souches de bactéries lactiques ont la capacité de déconjuguer les sels biliaires, les formes déconjuguées ont un pouvoir inhibiteur plus important sur le développement des bactéries que les formes conjuguées (Chafai ,2006).
- Certaines souches de probiotiques notamment les lactobacille excrètent la *β.galactosidase* souvent déficiente dans le tractus digestif de l'hôte et facilitent la digestion du lactose, elles stimuleraient l'activité enzymatique des microorganismes endogènes, permettant ainsi une meilleure assimilation des aliments. Elles stimuleraient également les activités des cellules épithéliales du tractus digestif (Larpen-Gourgau, 1997) ;
- La diminution de la cholestérolémie par réduction de l'absorption intestinale du cholestérol endogène et exogène et la diminution de sa synthèse dans le foie (Dacosta, 2001).

VIII.4 Dans l'industrie alimentaire :

VIII.4.1 Rôle dans la Fermentation alimentaire:

Les bactéries lactiques sont utilisées depuis longtemps dans la fabrication de divers produits fermentés (Leroy et Devuyt, 2004). Elles interviennent dans la transformation de divers produits agro-alimentaires, comme le lait (crème maturée, yaourt, fromage...), dans la vinification, la fabrication des salaisons, fermentation des végétaux (Hamoum, ensilage) et en boulangerie traditionnelle (Desmazeaud, 1998).

Les bactéries lactiques ont plusieurs rôles dans la production des produits fermentés.

Le premier rôle, intervient dans le changement de la saveur et la texture de l'aliment, grâce à l'acide lactique sécrété par les bactéries lactiques tout au cours de leur croissance.

Les bactéries lactiques produisent ainsi des peptides et des molécules comme l'acétoïne, l'acétaldéhyde, le diacétyl ou l'éthanol qui sont important pour la flaveur des aliments.

En production laitière, la fermentation lactique joue un rôle primordial, c'est-à-dire, les ferments lactiques naturels ou commerciaux interviennent dans l'élaboration de tous les produits laitiers fermentés (Pilet et *al.*, 2005). Ces ferments assurent plusieurs fonctions, telles que la protéolyse qui donne aux fromages leurs caractères rhéologique (viscosité, plasticité et l'élasticité) et la production des agents épaississants pour améliorer la texture du fromage.

VIII.4.2 Rôle dans la conservation :

Les bactéries lactiques jouent un rôle essentielle dans la conservation des produits alimentaires, elles sont capables de produire une variété de produits inhibiteurs dont les effets peuvent se répercuter sur la flore lactique elle-même mais aussi sur la flore indésirable ou pathogène (Piard et Desmazaud, 1991).

IX. Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques

On reconnaît depuis longtemps, aux bactéries lactiques, la propriété de produire des substances antibactériennes leur permettant de se développer préférentiellement dans divers écosystèmes. L'activité antagoniste des bactéries lactiques est due aux métabolites excrétés : l'acide lactique et autre acides organiques, peroxyde d'hydrogène, diacétyl et les bactériocines (Leveau et *al.*, 1991 ; Klaenhammer et *al.*, 1994 ; De Vuyst et Leroy, 2007)

IX.1. Production d'acides et diminution de pH

Les acides organiques sont produits par les bactéries lactiques lors du processus de fermentation et permettent d'inhiber la croissance des levures et d'autres bactéries qui ne peuvent se développer à pH acide (Vignola, 2002).

L'effet inhibiteur de ces acides organiques est principalement provoqué par les molécules non dissociées qui diffusent à travers les couches lipidiques des membranes des microorganismes provoquant ainsi un abaissement du pH dans le cytoplasme qui a pour conséquence la déstabilisation des cellules (Brillet, 2005).

IX.2. Production de peroxyde d'hydrogène

La production et l'accumulation de peroxyde d'hydrogène crée un environnement toxique pour les cellules non équipées de système de protection capable de dégrader ce composé. Son accumulation est inhibitrice vis-à-vis des souches qui génèrent de peroxyde mais aussi vis-à-vis d'autres microorganismes (De roissart et luquet, 1985).

IX.3. Production du diacétyl

Il est synthétisé par différents genres de bactéries lactiques comme *Lactococcus sp.*, *Leuconostoc sp.*, *Lactobacillus sp.* et *Pediococcus sp.* Le diacétyl (C₄H₆O₂) est un des composants aromatiques essentiels du beurre. Il a des propriétés antimicrobiennes qui sont dirigées contre les levures, les bactéries Gram-négatif et les bactéries Gram-positif non lactiques, ces dernières y sont néanmoins moins sensibles (El ziney et al, 1998).

IX.4. Production d'acides gras :

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

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

IX.5. Production de reutéline :

La reutéline est produite par *Lactobacilles reuteri*, une espèce hétérofermentaire dont la niche écologique est l'appareil gastro-intestinal des humains et des animaux (Axelsson et al., 1989).

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

IX.6. Production des bactériocines :

Les bactériocines sont des substances de nature protéique synthétisées par des bactéries et qui ont un pouvoir antibactérien dirigé contre des bactéries taxonomiquement proches du micro- organisme producteur (Daoudi, 2000). Ces peptides antibactériens ont une action contre les bactéries à Gram positif associées à l'altération de la qualité hygiénique des ali-

ments et à certaines pathologies humaines (Ennahar, 1999). En général, elles ont un spectre d'action restreint, inhibant seulement les bactéries voisines de la souche productrice.

Les bactéries à gram+ n'inhibent pas les bactéries à gram- et vice versa (Ouwehand et Vestergaard, 2004). Habituellement, elles sont de faible poids moléculaire (mais des bactériocines à haut poids moléculaire sont également produites). C'est leur nature protéique et leur spectre d'inhibition étroit qui les distingue des antibiotiques (De Vuyst et Leroy, 2007).

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

- Stable à la chaleur
- Stable à l'acidité
- Résistante aux protéases qui se trouvent dans l'aliment
- Active pendant une période prolongée En activité au pH de l'alimentation (4,5 à 7,0)
- Avoir un effet bactéricide que bactériostatique

Un large éventail d'hôtes, en inhibant plusieurs agents pathogènes et nuisibles (Fox et al., 2000)

IX.6.1 Classification des bactériocines

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

IX.6.1.1 Les bactériocines de classe I « L'antibiotiques »

Ce sont des peptides de taille inférieure à 5 kDa, stables à la chaleur et qui contiennent des acides aminés inhabituels soufrés formés post-traditionnellement, c'est-à-dire la lanthionine, la β -méthyl lanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine. Ils peuvent être divisés en deux types : la classe Ia qui comprend des peptides cationiques hydrophobes allongés contenant jusqu'à 34 acides aminés et la classe Ib qui comprend les peptides globulaires chargés négativement ou sans charge nette et contenant jusqu'à 19 acides aminés (Mcauliffe et al., 2001 ; Twomey et al., 2002).

IX.6.1.2 Les bactériocines de classe II :

Le mécanisme d'action supposé des bactériocines de classe II est l'interaction de la bactériocine avec la membrane ou un récepteur spécifique, la « mannose perméase », pour ensuite former un pore dans la membrane de la cellule, ce qui induit la perméabilisation de la

membrane, la dissipation des deux composantes de la force proton motrice et la mort de la cellule. Le mécanisme de formation des pores n'est pas connu, même si l'hypothèse la plus courante est l'association de différentes molécules de la bactériocine (Dortu et Thonart, 2009). Les bactériocines de classe II b' ont en général un spectre d'action inhibant une large gamme de bactéries Gram+. Elles forment des pores et rendent la membrane perméable à différentes petites molécules, des cations monovalents ou des anions, ce qui dissipe une ou les deux composantes de la force proton motrice (Dortu et Thonart, 2009.)

IX.6.1.3 Les bactériocines de classe III

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

IX.6.1.4 Les bactériocines de classe IV

Englobe les bactériocines qui nécessitent une partie non protéique pour être active. Cette quatrième classe, comportant des bactériocines complexes qui exigent des carbohydrates ou des fractions lipidiques pour leur activité biologique (Morisset *et al.*, 2005 ; Savadogo *et al.*, 2006). Les bactériocines de classe IV présentée par Klaenhammer (1993) a été contestée par la suite par de nombreux auteurs, puisque aucun de ces peptides n'a été incorporé avec sa partie glucidique ou lipidique (Nes *et al.*, 1996)

IX.6.2 Mode d'action des bactériocines :

Le siège d'activité des bactériocines est la membrane cellulaire, raison pour laquelle les bactériocines n'ont pas d'activité contre les bactéries G positive. Cependant, les mécanismes d'action des bactériocines sur la membrane sont variés. (Mcauliffe *et al.*, 2001 ; Twomey *et al.*, 2002).

Chapitre 2

Les interactions bactériennes

I. Définition des interactions :

Les produits laitiers, en général, comme le lait fermenté ou les fromages sont les supports d'écosystèmes dont la composition évolue avec le temps. Les facteurs de sélection qui gouvernent cette évolution sont générés par l'activité métabolique des micro-organismes eux mêmes. Ceux-ci, à un instant donné, créent à la fois les conditions de leur déclin et celles favorisant l'installation d'autres groupes microbiens :

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

II. . Les interactions entre les souches de bactéries lactiques :

Lorsque les bactéries lactiques sont utilisées en cultures mixtes pour la fermentation du lait, des interactions entre les différentes souches se manifestent. Ces interactions sont généralement classées en deux groupes : l'antagonisme et la stimulation. (Grattepanche, 2005).

II.1. Interactions positives:

Le meilleur exemple en est l'effet coopératif entre deux espèces ; *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbruecki* qui jouent un rôle dans l'élaboration du yaourt. Au début de la fermentation, c'est le streptocoque qui se développe le plus rapidement et produit différents acides (acide pyruvique, acide formique, acide lactique), l'adénine et une très faible quantité de CO₂. L'abaissement progressif du pH et la présence de ces substances vont petit à petit activer la croissance du lactobacille qui est plus acidophile. Celui-ci a une activité protéolytique plus importante que celle du streptocoque et la libération d'acides aminés (valine, histidine, glycine, acide glutamique, leucine, méthionine) et des peptides vont les stimuler. Malheureusement pour le streptocoque, ces interactions positives ne durent pas très longtemps, dans la mesure où il est beaucoup plus sensible au pH que le lactobacille, sa croissance va être progressivement inhibée par l'acidité du milieu (Branger et al., 2007).

II.2. Interactions négatives : inhibition

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

Chapitre 3

Les bactéries pathogènes

I. Les bactéries pathogènes

Ces microorganismes sont présents partout dans l'environnement sur les plantes, les animaux et les humains eux-mêmes. Certains de ces microorganismes provoquent seulement des altérations des produits alimentaires alors que d'autres, causent des maladies aux consommateurs.

Les bactéries pathogènes sont susceptibles d'entraîner des maladies, des toxi-infections alimentaires ou intoxication causé par la production de toxines des bactéries (Thierry, 2008).

I.1 *Staphylococcus aureus* :

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

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

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

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

Dans le lait de chèvre, Chub (1985) a détecté des souches coagulases positives dans 40% des échantillons du lait pris de façon aseptique de chèvres de Nouvelle Galles du Sud (Australie) qui ne montraient aucun signe de mammite. Vassiliadou (1991) a rapporté que 59.1% d'échantillons de lait de chèvre cru en Grèce était positives aux souches. Harvey et Gilmour (1988) ont rapporté que les *Staphylococcus* étaient l'espèce prédominante isolée du lait de chèvre en Irlande du Nord (Seifu, 2007). Seuls les *staphylocoques* coagulase positifs sont considérés comme pathogènes. Trois

espèces peuvent coaguler le plasma du lapin oxalaté : *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus byicius*, l'espèce *Staphylococcus aureus* est elle-même scindée en plusieurs biotypes selon l'origine animale de la souche (Leyral et Vierling, 2007).

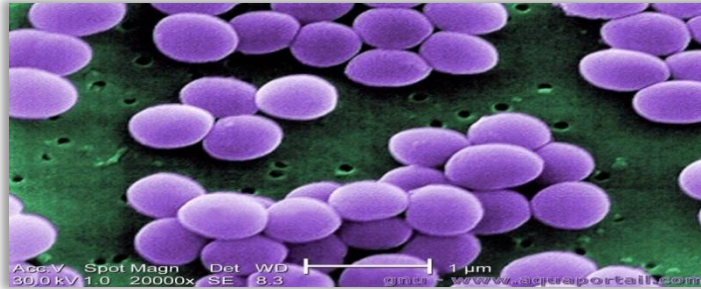


Figure 15 : Aspect morphologique de la souche de *Staphylococcus aureus* observée au microscope électronique (Leyral et Vierling, 2007).

I.1.1 Pouvoirs pathogènes :

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

I.2 *Escherichia coli* :

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



Figure16 : *Escherichia coli* observés au microscope électronique (G×10000) (Goubau et Pellengrims,2000)

I.2.1 Mode de transmission :

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

I.2.2 Pouvoirs pathogènes :

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

Les facteurs de virulence sont des flagelles et des pilis qui permettent l'adhésion à la muqueuse intestinale ainsi qu'une capsule qui prévient la phagocytose et les entérotoxines (Goubau et Pellegrims, 2000). Les colibacilles responsables d'entérites sont subdivisés en quatre catégories, au moins, en fonction du syndrome provoqué et du mécanisme pathogénique.

I.3 *Bacillus cereus* :

Le genre *Bacillus* renferme des germes telluriques aérobies stricts ou aéro-anaérobies, sporogènes, se présentant sous forme de bâtonnets à Gram positif généralement mobiles. En dehors de *Bacillus anthracis*, les *Bacillus* sont habituellement considérés comme des germes de l'environnement et leur rôle en pathologie humaine est souvent négligé. (Gaillard, 1989).

En réalité, il est actuellement bien établi que certaines espèces du genre *Bacillus* peuvent être responsables chez l'homme de toxi-infections alimentaires ou, plus rarement, d'infections opportunistes.

Bacillus cereus est le principal germe incriminé, mais d'autres espèces comme *Bacillus licheniformis* ou *Bacillus subtilis* peuvent également être mises en cause (Gaillard, 1989).

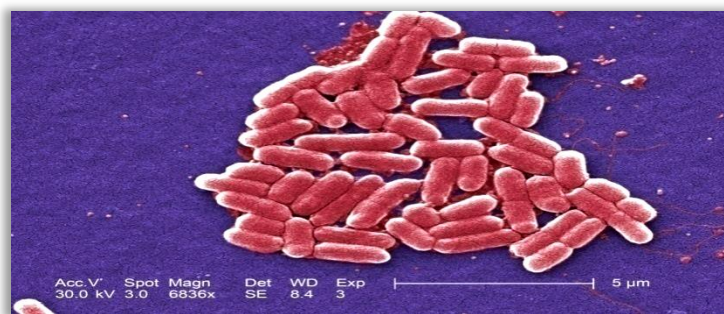


Figure 17: Aspect morphologique de la souche de *Bacillus cereus* observée au microscope électronique (Gaillard, 1989).

I.3.1 Pouvoir pathogène :

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

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

I.4 *Pseudomonas aeruginosa* :

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie à G négatif qui vit dans le sol, l'eau et les milieux humides comme les robinets et les tuyauteries, et possède une grande capacité d'adaptation aux environnements hostiles. Ses nombreux facteurs de virulence font d'elle un agent très pathogène pour les organismes fragilisés ou immunodéprimés, entraînant un taux élevé de morbidité et de mortalité.(Carle Gessard 1882).



Figure18 : *Pseudomonas aeruginosa* observés au microscope électronique (Guibert M.,1998).

I.4.1 pouvoir pathogène :

Pseudomonas aeruginosa est responsable d'infections multiples de l'organisme : urinaires, cutanées, pulmonaires, ophtalmologiques, Ces bactéries peuvent infecter le sang, la peau, les os, les oreilles, les yeux, les voies urinaires, les valves cardiaques et les poumons, ainsi que les plaies (telles que les brûlures, les blessures ou les plaies d'origine chirurgicale). La transmission de *Pseudomonas aeruginosa* se fait par les mains du personnel soignant et par des équipements médicaux infectés. Les interventions médicales invasives telles que la pose d'un cathéter ou d'une sonde urinaire font peser un risque élevé de transmission des agents infectieux.(Nordmann

p, Guibert M., 1998).

Les facteurs de virulence jouent un rôle important dans la colonisation, la survie de la bactérie et l'invasion des tissus. Il existe deux types de facteurs de virulence :

1) les facteurs impliqués dans l'infection aiguë : ces facteurs sont soit à la surface de *P. aeruginosa*. Les pilis permettent l'adhésion aux épithéliums. L'exoenzyme S ainsi que d'autres adhésines non pilées renforcent cette adhésion. L'exotoxine A agit d'une manière comparable à la toxine diphtérique, cytotoxine responsable d'une inflammation sévère et d'une nécrose tissulaire. La phospholipase C est une hémolysine thermolabile. Le rôle pathogène de l'exoenzyme S est attribuable à la perturbation de l'organisation du cytosquelette normal, la destruction de l'immunoglobuline G et A, conduit à la dépolymérisation des filaments d'actine et contribue à la résistance aux macrophages. *P. aeruginosa* produit au moins quatre protéases (LasA, LasB...) provoquant des hémorragies et des nécroses tissulaires.

2) les facteurs impliqués dans l'infection chronique : sidérophores (pyoverdine et pyochéline), permettent aux bactéries de se multiplier en l'absence de fer libre. Les souches isolées chez les patients souffrant de mucoviscidose possèdent une pseudocapsule d'alginate qui protège la bactérie de la phagocytose, la déshydratation et des antibiotiques. De plus, elle améliore l'adhérence aux cellules épithéliales en formant un biofilm. La majorité de ces facteurs de virulence sont sous la dépendance de deux systèmes de régulation : le système à deux composants et le *quorum sensing*, qui permettent la survie et la multiplication de ce micro-organisme dans l'hôte. (Fournier C, Andre J, Marlier H, Guinet R, Gilly 1993).

Deuxième partie

Recherche expérimentale

Chapitre 1

Matériel & Méthodes

Matériels et méthodes

Notre travail a été effectué au niveau de Laboratoire des Sciences et Techniques de Production Animale (LSTPA) de l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem.

Objectif du travail :

Notre étude répond à trois objectifs :

- ✓ Identification des isolats lactiques isolées à partir de blé fermenté « Hamoum ».
- ✓ Recherche des isolats lactiques producteurs de substances inhibitrices.
- ✓ Recherche de la nature de substances inhibitrices.

1. Origine, purification et identification des souches utilisées

1.1. Origine des échantillons utilisés

1.1.1 Les bactéries lactiques

Dix neuf isolats de bactéries lactiques ont été isolées à partir de blé fermenté « Hamoum » et font partie de la collection de notre directrice de mémoire.

Ce blé fermenté « Hamoum » est un blé mis dans des silos souterrain. C'est des grains de couleur marron jaunâtre dû au degré de fermentation présents dans les silos.

1.1.2 Les souches pathogènes

Nous avons utilisées des souches pathogènes à Gram positive et négative. Ces souches sont considérées comme des bactéries indicatrices pour l'étude de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques. Ce sont des souches de références provenant de l'institut Pasteur d'Alger.

Tableau 01 : Origines et codes des différentes souches pathogènes étudiées

Souches pathogènes	Code des souches	Origine des souches
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 33862	Institut Pasteur (Alger)
<i>Escherichia coli.</i>	ATCC 25922	Institut Pasteur (Alger)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Institut Pasteur (Alger)
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10876	Institut Pasteur (Alger)

ATCC : American Type Culture Collection.

1.1.3 Milieux de culture

Les milieux de culture utilisés pour l'étude des bactéries et leur conservation sont :

- Milieu MRS (De Man, Rogosa et Sharpe) (solide, semi-solide, liquide) à pH 6.5
- Milieu MRS tamponné (solide, semi-solide, liquide) à pH 7
- Milieu Moëller à arginine.
- Milieu Clark et Lubs.
- Milieu hypersalé (6.5% NaCl).

Le milieu de culture sélectif pour les bactéries pathogènes est :

- Milieu tryptica soja ;(solide, semi-solide, liquide).

Les milieux étaient stérilisés par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

1.2. Purification des souches utilisées

1.2.1. Revivification et purification des isolats lactiques

La revivification des isolats a été réalisée par un enrichissement des cultures dans le bouillon MRS. La croissance des isolats est traduite par un trouble.

Elle est suivie par une purification. Cette pureté est obtenue par des repiquages successifs (3 fois) sur MRS solide selon la méthode des Quadrants, afin d'obtenir des isolements espacés de même forme, taille et couleur après 24 à 72 h d'incubation à 37°C. Les colonies bien isolées sont retenues pour vérifier leur appartenance au groupe lactique. Les bactéries lactiques sont de Gram positif et à catalase négatif (Idoui et *al.* 2009). Seuls les isolats à Gram positifs et catalase négatifs sont retenus.

1.2.2. Purification des souches pathogènes

Les souches pathogènes ont été purifiées sur milieu de culture tryptica soja. Avant leur utilisation pour les tests d'inhibition, elles sont repiquées sur bouillon nutritif et incubées 18 heures à 37 °C.

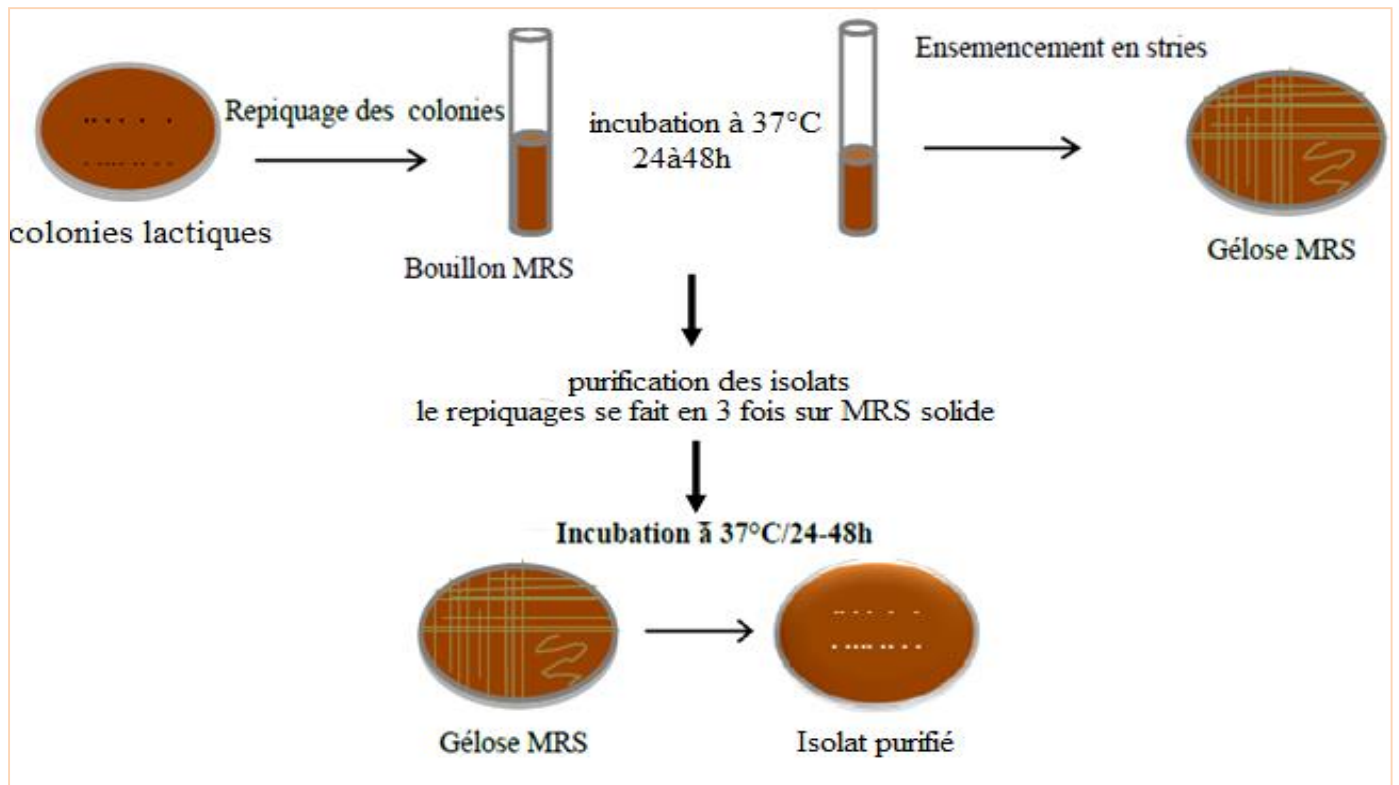


Figure 19 : Revivification et purification des isolats lactiques

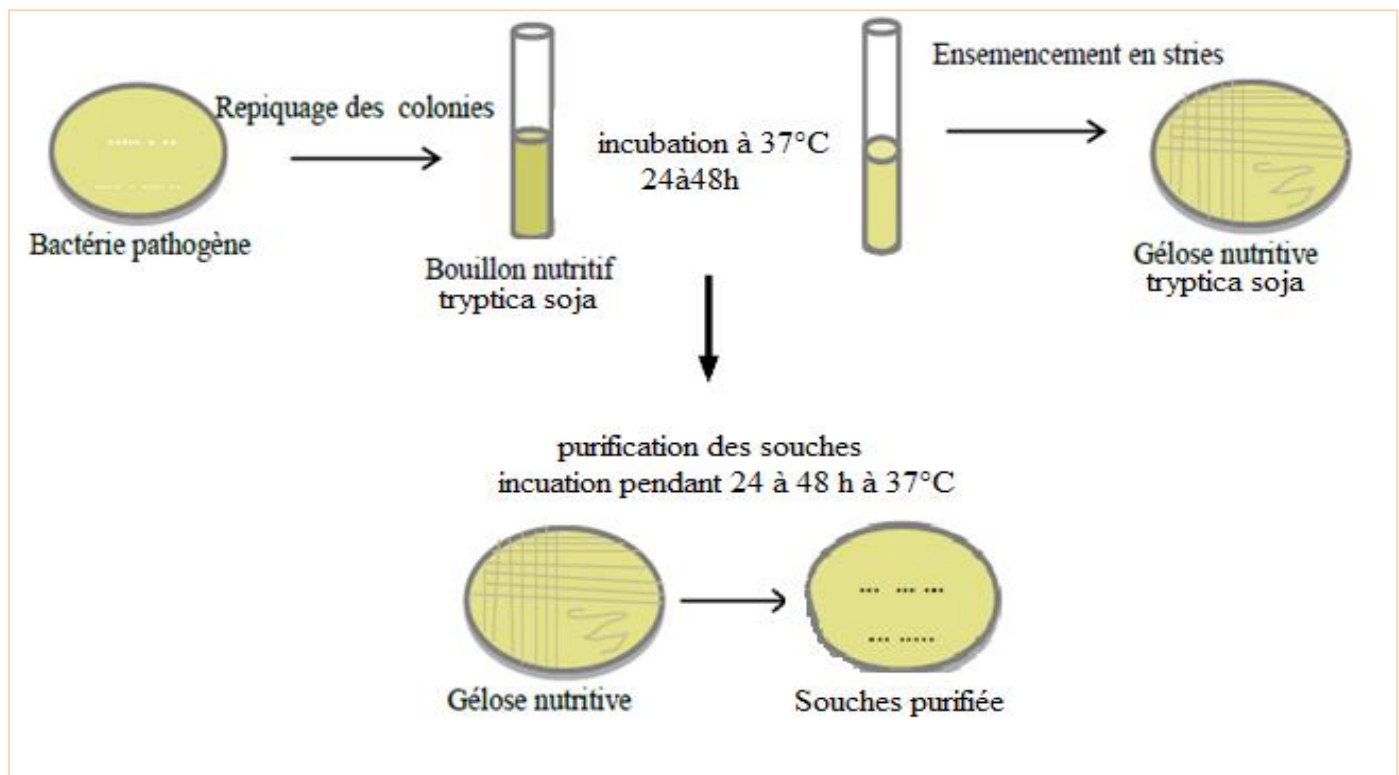


Figure 20 : Revivification et purification des souches pathogènes.

1.3. Pré-identification des isolats lactiques

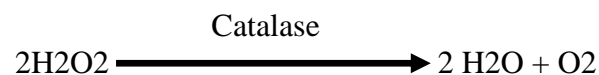
L'identification des isolats lactiques a été réalisée par l'application des techniques classiques de microbiologie, basées sur la recherche d'un certain nombre de caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques. Toutes les techniques d'identification ont été décrites par Larpent (1997).

1.3.1. Tests morphologiques :

1.3.1.1 Examen macroscopique Cette étude est basée sur l'observation des isolats sur milieu MRS solide, qui consiste à décrire les caractéristiques culturels des isolats. Les colonies isolées sont décrites selon leur forme, taille et couleur.

1.3.1.2 Examen microscopique L'observation microscopique d'un frottis bactérien, permet de préciser la forme, la taille, le type de Gram et le mode d'association (Guiraud 1998).

1.3.1.3 Production de la catalase L'activité catalasique permet la dégradation de l'eau oxygénée en oxygène et en eau. Elle est mise en évidence en émulsionnant une à deux colonies de l'isolat de la culture à tester dans une solution fraîche d'eau oxygénée à 10 volumes. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse, traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de l'enzyme à tester (Guiraud, 2003). La catalase permet la décomposition de l'eau oxygénée selon la réaction :



1.3.1.4 Conservation des souches :

A- Conservation de courte durée : Est réalisée par ensemencement sur gélose inclinée des colonies pures et incubée à 37°C pendant 24h, les isolats sont conservés à +4 °C. Le renouvellement des souches se fait par repiquage tout les 4 semaines.

B - Conservation de longue durée : Les cultures bactériennes pures sont placées dans des tubes Eppendorfs contenant les bouillons MRS additionnés de 30 % (v/v) de glycérol stérile puis conservés à -20°C (Hariri et *al*, 1996).

1.3.2. Tests physiologiques et biochimiques

1.3.2.1 Croissance à différentes températures : Ce test est important car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles (Leveau et *al*. 1991). ce test consiste à inoculer dans les bouillons MRS des isolats lactiques à différents

températures (25°C, 37°C, 45°C.) pendant 24 h à 48 h d'incubation. La croissance se traduit par l'apparition d'un trouble dans le milieu. La comparaison est réalisée avec un tube témoin non ensemencé (Guiraud, 2003).

1.3.2.2 Thermorésistance : Le test de thermorésistance permet de sélectionner les espèces thermorésistantes. Les isolats à tester sont préalablement répartis dans des tubes MRS. Ces tubes sont par la suite exposés à une température de 60°C pendant 30 min dans un bain-marie, après ils sont incubés à 37°C pendant 24 à 72 heures. La croissance est appréciée par un trouble du milieu.

1.3.2.3 Croissance sur milieu hypersalé : Les cultures à tester sont ensemencées sur des boîtes de Pétri contenant du MRS solide hypersalé à 6.5% de NaCl. Après une incubation à 37°C pendant 24h à 72h (jusqu'à une semaine), le développement se traduit par la croissance des colonies sur la boîtes de Pétri (Carr *et al.*, 2002).

1.3.2.4 Croissance à pH 5 et à pH 9,6 : Ces tests sont réalisés en milieu MRS liquide dont le pH est ajusté à 5 et 9, 6. Le développement des cultures a été apprécié par l'apparition d'un trouble et par comparaison avec un tube témoin non ensemencé incubé dans les mêmes conditions. L'observation d'un trouble traduit une croissance à ces pH (Saidi, 1997).

1.3.2.5 Recherche de type fermentaire : Ce test permet de différencier les bactéries lactiques homofermentaires de celles hétérofermentaires. Il consiste à mettre en évidence la production du gaz (CO₂). De jeunes cultures préalablement préparées sont ensemencées dans des tubes contenant du bouillon MRS, avec une cloche de Durham stérile. Après incubation à 37°C pendant 24–48 heures, la présence ou l'absence de gaz dans la cloche indique le type fermentaire (Hariri *et al.*, 2009). Les souches homofermentaires vont produire 90% d'acide lactique, et seulement 10% de CO₂, par contre les souches hétérofermentaires vont produire en plus de l'acide lactique le CO₂, à proportions égales (Carr *et al.*, 2002).

1.3.2.6 Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH) : Le rôle de cette enzyme est de libérer l'ammoniac à partir de l'arginine. Pour effectuer ce test on utilise le milieu Moëller à arginine par l'ensemencement et l'incubation à 37 °C pendant 24 h (Thomas, 1973). Ce milieu contient un indicateur de pH, le pourpre de bromocrésol, si la couleur du milieu vire au jaune puis vers

le violet ceci indique la présence de l'enzyme et la dégradation de l'arginine. Si elle reste jaune cela veut dire que la bactérie est ADH négative. on compare par un tube témoin Moëller sans arginine.

1.3.2.7 Production de l'acétoïne : Les isolats lactiques sont cultivées sur milieu Clark et Lubs afin d'étudiées La production de l'acétoïne (acétyl méthyl carbinol). il est considéré comme une substance aromatique importante dans la flaveurs des produits lactières. Après 24h d'incubation à 37°C, 2 ml de cette culture sont transvasés dans des tubes à essai, on ajoute 5 gouttes du réactif VP1 et 5 gouttes de réactif VP2. on agite soigneusement les tubes à température ambiante (tube ouvert pour permettre une bonne oxygénation). un résultat positif se traduit par l'apparition d'un anneau rose à rouge à la surface du tube.

1.3.2.8 Culture sur lait de Sherman : Ce test permet la différenciation entre les *streptocoques* et les *lactocoques*. Chaque culture à tester a étéensemencée dans le lait écrémé au bleu de méthylène à 0.1% et à 0.3%. Après une incubation à 37°C pendant 24h à 48h, on note les observations relatives à la réduction de bleu de méthylène et la coagulation du lait. La réaction positive se traduit par la réduction de bleu de méthylène qui vire du bleu (forme oxydé) vers le blanc (forme réduite). (Iarpent 1997, Gusils 2010, Maghnia 2011).

1.3.2.9 Test en présence d'azide de sodium : Ce test à pour but de différencier entre les streptocoques et les entérocoques. Dans 200 ml de milieu MRS on ajoute 0.03g d'azide de sodium, 5 ml de cette culture sont transvasés dans des tubes à essai, ils sontensemencés par les cultures à tester puis incubés à 37°C pendant 24h. La croissance est appréciée par un trouble du milieu.

1.3.2.10 Profil fermentaire : Les bactéries lactiques dégradent différemment les sources de carbone. L'étude de la fermentation des sucres est réalisée sur le milieu spécifique bouillon MRS (sans le glucose et l'extrait de viande), additionné de pourpre de bromocrésol comme indicateur de pH (MRS-BCP) (Badis et al, 2004). Dans des tubes à essai stériles, on met 1ml de MRS BCP, puis on ajoute 0,1ml de chaque sucre (quelque gouttes) après on ensemence le contenu des tubes avec les isolats à tester et on les incubés à 37°C pendant 24h. Le virage de la couleur du milieu du violet au jaune indique la fermentation du sucre. on compare les résultats par un tube témoin (Hariri et al., 2009).

II. Etude de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques

Dans cette étude, nous avons utilisé la méthode de Fleming et *al* (1975) pour la détection de l'activité antimicrobienne des souches des bactéries lactiques. Les isolats lactiques sont considérés comme inhibitrices et la souche *Lactobacillus plantarum* « R27 » avec les souches pathogènes et/ou d'altération sont considérées comme souches indicatrices.

II.1 Méthode de Fleming et *al* (1975) :

Cette méthode est réalisée selon les étapes suivantes:

- Préparation des cultures de 18h pour les souches utilisées à 37°C en MRS liquide.
- Sur des boîtes de Pétri contenant du MRS solide, on a ensemencé en touche les isolats considérés comme inhibitrices à l'aide d'une micropipette. Après séchage à température ambiante, les boîtes sont pré-incubées à 37°C pendant 24h.
- On couvre nos cultures avec 10ml de gélose molle (0.75% d'agar) de MRS en surfusion à (45°C), pré-ensemencés avec 0.5 ml d'une culture de 24h de la souche indicatrice.
- Après solidification, les boîtes sont remises à l'étuve à 37°C pendant 24h.
- L'inhibition se révélera par la présence d'une zone transparente autour des souches ensemencées en touches.
- La lecture des résultats est réalisée par la mesure des diamètres des halos d'inhibitions.

Méthode de Fleming *et al.*, 1975

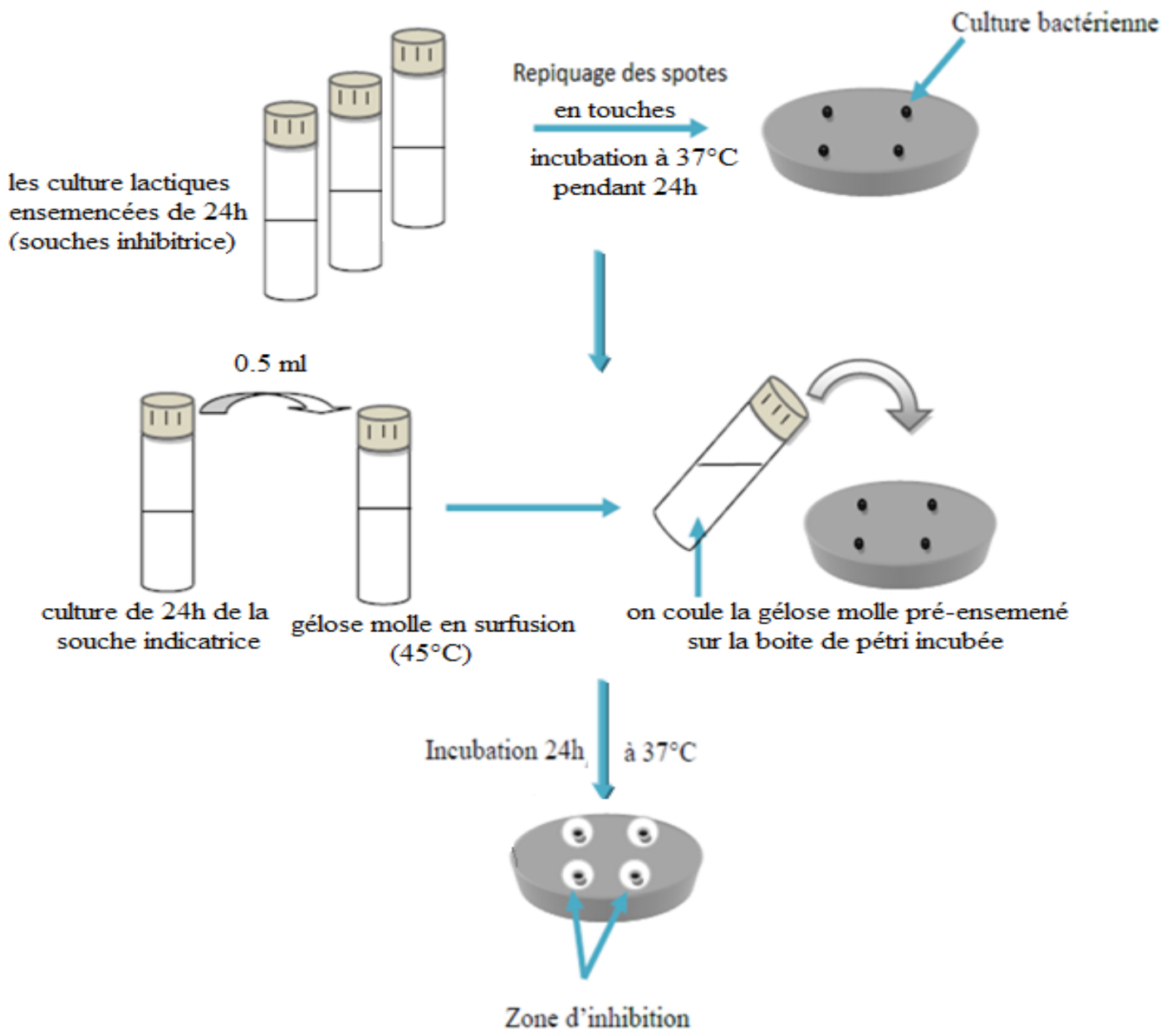


Figure 21: Méthode de Fleming *et al* (1975) (test des spots).

II.2 Recherche de l'agent inhibiteur par l'utilisation du milieu tamponné:

L'emploi du milieu tamponné a pour but d'étudier l'effet de l'acide lactique sur le développement des souches indicatrices. Ce milieu est obtenu par l'addition d'une solution A et une solution B (Annexe C).

L'acide lactique est un facteur majeur dans les inhibitions. Nous avons procédé selon la méthode de Fleming *et al.* (1975) sauf que nous avons utilisé le milieu MRS tamponné à pH 7 (Larpen-Gourgaud *et al.*, 1997). Nous avons utilisé comme témoin le même test en milieu non tamponné. La lecture des boîtes s'effectue après 24h d'incubation à 37°C, la lecture des résultats se fait par la mesure puis la comparaison des halos d'inhibition sur les deux milieux.

Chapitre 2

Résultats et discussion

Résultats et Discussion

I. Test de revivification des souches

La revivification de nos 19 isolats lactiques présente un trouble indiquant une bonne croissance bactérienne.



Figure 22: Revivification des isolats étudiés.

A : Aspect des bactéries lactique sur milieu MRS

B : Aspect des bactéries pathogènes sur milieu tryptica soja

II. Pré-identification :

II.1 Etude macroscopique des bactéries lactiques

L'observation macroscopique de culture révèle la présence de colonie de forme circulaire, de petites tailles, lisses, opaques, de couleurs blanchâtres et à contour régulier.

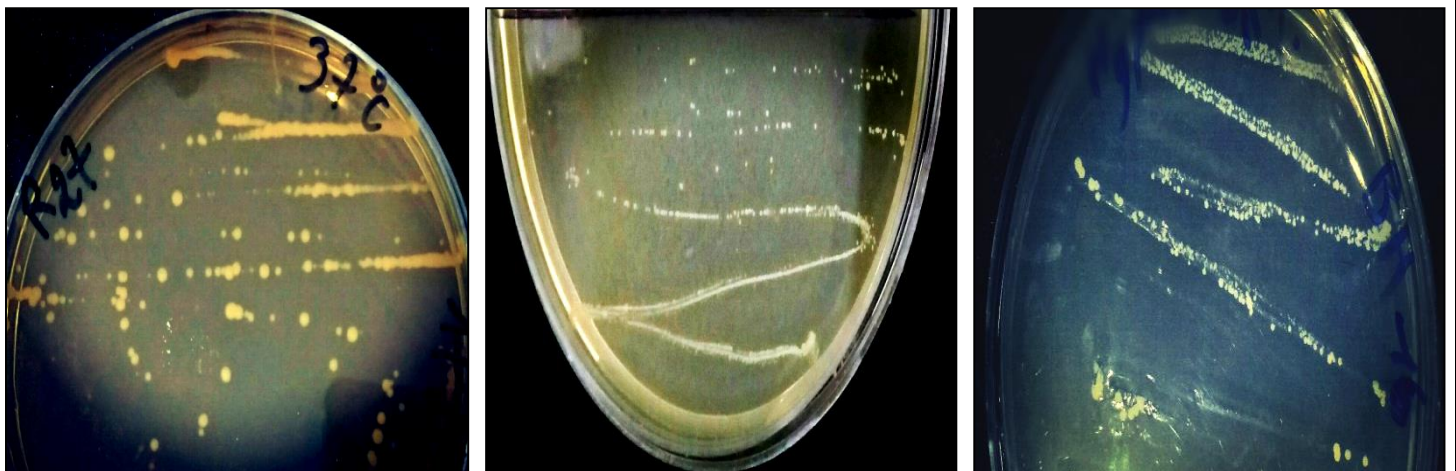


Figure 23 : Aspect macroscopique de bactérie lactique.

II.2 Etude microscopique des bactéries

L'observation microscopique des bactéries nous a permis de révéler que ce sont des bactéries Gram positif de forme ovoïde et rond (coques) et sous forme bâtonnet (longue, courte, en chaînette) et dans la disposition été en tétrade, en amas, en paire et isolé.

II.2.1 Les bactéries lactiques :

Après le test de catalase et la coloration de Gram, toutes bactéries Gram + et catalase - sont des bactéries lactiques. Ainsi une observation microscopique fut réalisée. La figure 24 et le tableau 02 présentent l'aspect des isolats des bactéries lactiques.

Tableau 02: Critères morphologiques, la coloration de Gram et le test de catalase des isolats lactique sous microscope optique (G×100).

Isolats lactiques	Catalase	Gram	Forme et disposition
R27	-	+	Bacille en chaînette
BHC1	-	+	diplocoque/en amas
BHC2	-	+	Coque/paire et chaînette
BHC3	-	+	diplocoque/en amas
BHC4	-	+	Coque/paire et chaînette
BHC6	-	+	diplocoque/en amas
BHC8	-	+	diplocoque/en amas
BHC9	-	+	diplocoque/en amas
BHC13	-	+	diplocoque/en amas
BHC16	-	+	diplocoque/en amas
BHC18	-	+	diplocoque/en amas
BHC19	-	+	diplocoque/en amas
BHC23	-	+	diplocoque/en amas
BHC26	-	+	diplocoque/en amas
BHC28	-	+	diplocoque/en amas
M5	-	+	diplocoque/tétrade
BHL5	-	+	Bacille isolé
BHL25	-	+	Bacille isolé
BHL27	-	+	Bacille en paire

II.2.2 Les bactéries pathogènes :

L'observation microscopique des souches pathogènes nous a permis d'observer la forme et la disposition des cellules microbiennes, ainsi que leur Gram.

Tableau 03: Critères morphologiques, la coloration de Gram des souches pathogènes sous microscope optique (G×100).

Souches pathogènes	Gram	Forme
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	Coque en amas
<i>Pseudomonace aeruginosa</i>	-	Bacille isolés
<i>Escherichia coli</i>	-	Bacille isolés
<i>Bacillus cereus</i>	+	Bacille en chainette

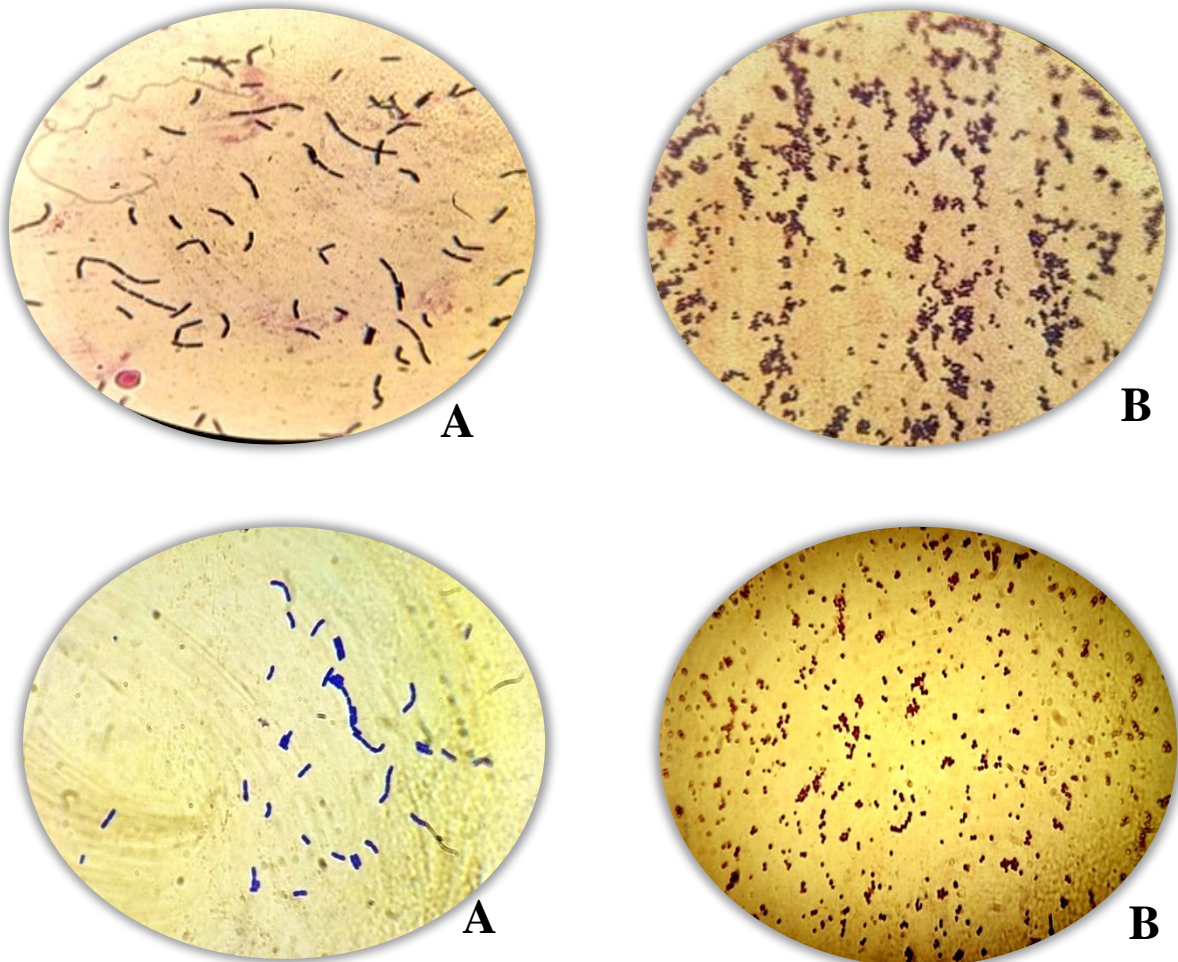
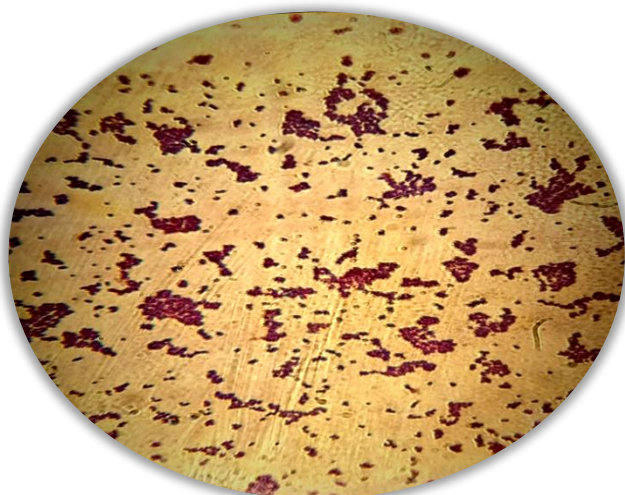


Figure 24 : Aspect microscopique des bactéries lactiques étudiées. (G×100)

A : Bactérie lactique en forme bacilles.

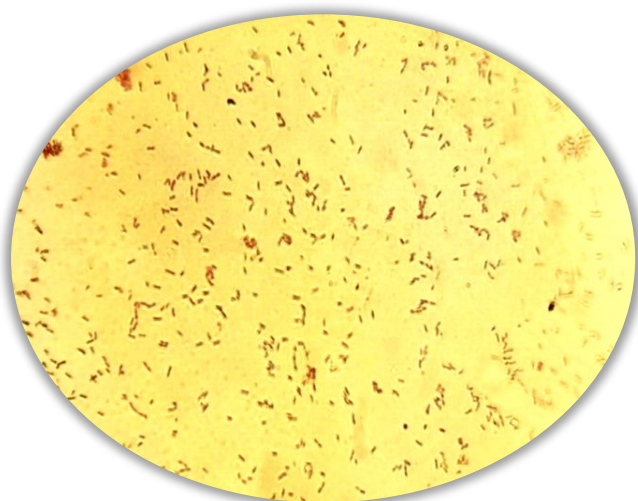
B : Bactérie lactique en forme coques.



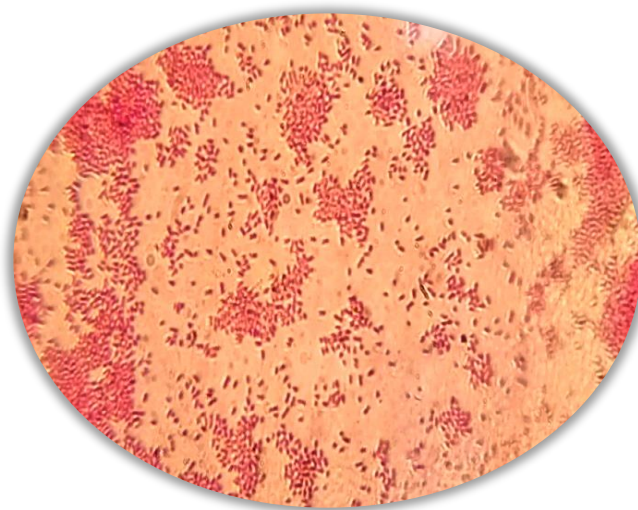
Staphylococcus aureus



Bacillus cereus



Pseudomonas aeruginosa



Escherichia coli

Figure 25 : Aspect microscopique des bactéries pathogènes étudiées. (G×100)

II.3 Tests physiologiques et biochimiques

Ces tests sont réalisés dans le but de différencier entre les lactocoques et les entérocoques.

II.3.1 Croissance à différents température.

- Tous les isolats poussent à température 37°C.
- La majorité des isolats sont capable de croitre à une température de 25°C sauf BHC19, BHC23.
- A l'exception de BHC2, BHC4, BHC19, BHC26, et BHC28, tous les isolats se développent à température 45°C.

II.3.2 Croissance à différents pH.

- A pH 9.6, tous les isolats testés poussent à ce pH à l'exception de BHC2, BHC4, BHC26.
- A pH5, tous les isolats se développent à ce pH.

II.3.3 Croissance sur milieu hypersalé.

- A la concentration 6.5% de NaCl, tous les isolats poussent à cette concentration sauf BHC2, BHC4, BHC26.

II.3.4 Test de thermorésistance

A l'exception de BHC2, BHC4, BHC19, BHC26, BHC28, tous les isolats sont des thermorésistantes (tableau 04).

II.3.5 Type fermentaire

Touts les isolats étudiés sont des homofermentaires.

II.3.6 Production de l'arginine.

- Tous les isolats sont ADH négative, ils n'ont pas la capacité à hydrolyser l'arginine.

II.3.7 Production de l'acétoine.

- Dans le cas de testes d'acétoine on remarque qu'il n'ya pas un anneau rouge dans les tubes, cela indiquent que les résultats sont négatives.

II.3.8 Test de lait de Sherman

- A 0.3%, deux isolats ont réduits le bleu de méthylène " BHC2, BHC4".
- A 0.1%, Cinque isolats ont réduits le bleu de méthylène "BHC2, BHC4, BHC6, BHC13, BHC18".

II.3.9 Test en présence d'Azide de sodium

→ On remarque que tous les isolats poussent dans ce milieu sauf « BH2, BH4, BH13, BH18».

Tableau 04: Résultats des tests physiologiques et biochimiques des bactéries lactiques

Isolats lactiques	Test de Sherman		Test de différentes T°			Therm	PH		Nacl	Azid de Na	ADH	Type fermentaire	Acétoïne
	0.1%	0.3%	25°C	37°C	45°C	60°C	5	9.6	6.5%				
BHC1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	Homo	-
BHC2	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	Homo	-
BHC3	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	Homo	-
BHC4	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	Homo	-
BHC6	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	Homo	-
BHC8	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	Homo	-
BHC9	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	Homo	-
BHC13	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	Homo	-
BHC16	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	Homo	-
BHC18	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	Homo	-
BHC19	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	Homo	-
BHC23	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	Homo	-
BHC26	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	Homo	-
BHC28	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	Homo	-

+ : Réaction positive, - : Réaction négative, Homo : Homofermentaire, ADH - : pas de production d'Arginine dihydrolase



T: 25 °C



T: 37 °C



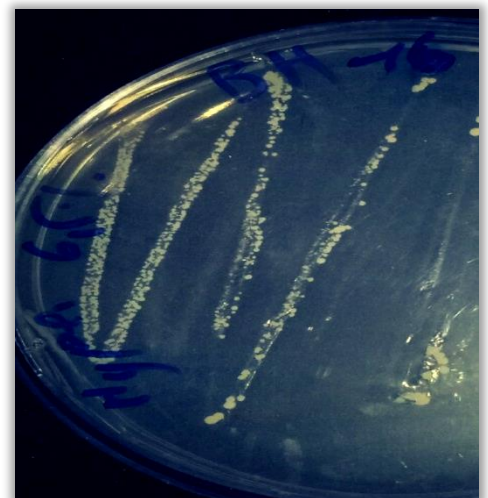
T: 45 °C



Homofermentaires



T: Témoin



Croissance à 6.5% de NaCl

Figure 26 : Tests de caractérisation phénotypique des bactéries lactiques

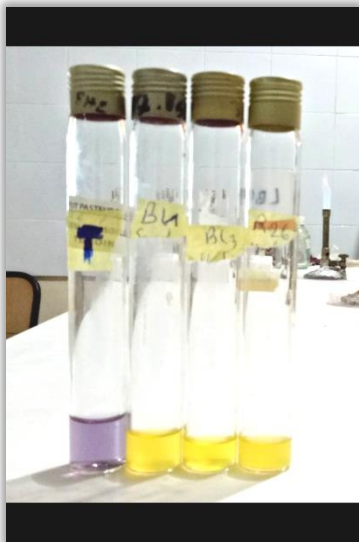


0.1%



0.3%

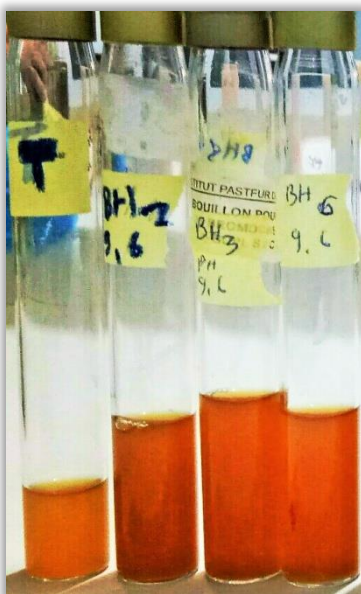
Réduction de bleu de méthylène



ADH



Azide de Na



PH : 9.6



PH : 5

T: Témoin

Figure 26 : Tests de caractérisation phénotypique des bactéries lactiques

II.3.10 Profil fermentaire

Ce test est utilisé pour but d'identifié les isolats au niveau de l'espèce, Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 05.

- Le virage de couleur de milieu MRS-BCP indique que les isolats ont dégradé les sucres ajouté dans le milieu (Figure 27).
- Le profil fermentaire des sucres nous a permis de confirmer la pré-identification de nos isolats en se basant sur des donnés bibliographiques établis par (Carr *et al.*, 2002 et Khedid *et al.*, (2006)).

Tableau 05: Résultats du test de profil fermentaire des bactéries lactiques

Les souches lactiques	Tréhalose	Cellobiose	Galactose	Xylose	Maltose	Saccharose
BHC1	+	+/-	+	+	-	+/-
BHC2	+	+	+	+	+	+/-
BHC3	+	+	+	+	+	+/-
BHC4	+	+	+	+	+/-	+
BHC6	+	+	+	+	+/-	+/
BHC8	+	+	+	+	+/-	+/-
BHC9	+	+	+/-	+	+/-	+/-
BHC13	+	+	+	+	+/-	+/-
BHC16	+	+	+	+	+/-	+/-
BHC18	+	+	+	+	+	+/-
BHC19	+	+	+	+	+	+/-
BHC23	+	+	+	+	+/-	+/-
BHC26	+	+	+	+	+/-	+/-
BHC28	+	+	+	+	+/-	+/-

+ : Réaction positive, - : Réaction négative, +/- : Réaction variable



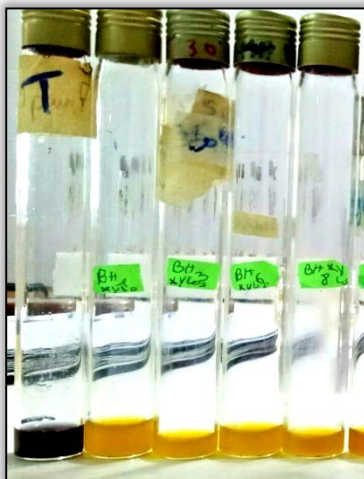
Maltose



Cellobiose



Saccharose



Xylose



Tréhalose



Galactose

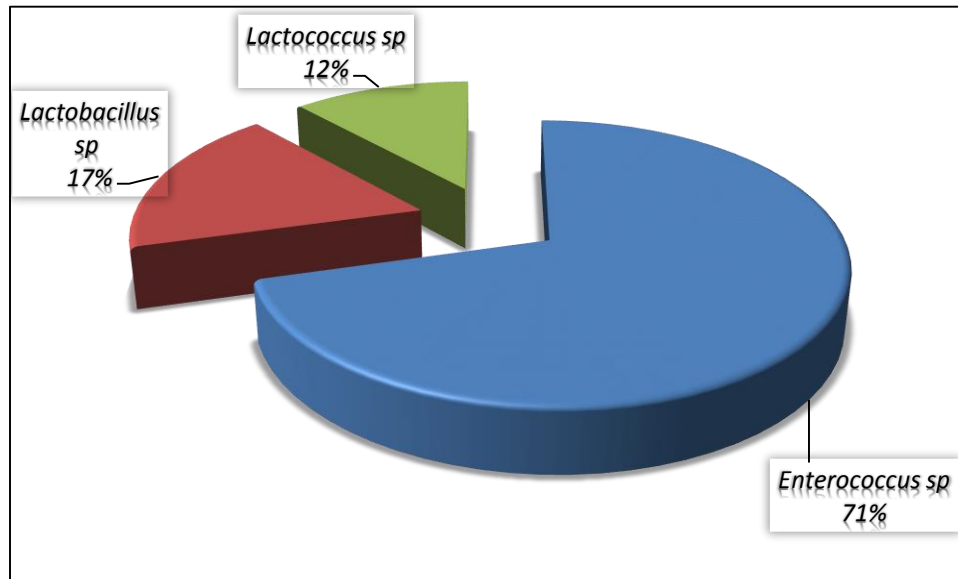
Figure 27 : Profil fermentaire des bactéries lactiques étudiées

→ Selon le schéma général de différenciation des genres appartenant aux bactéries lactiques (Carr et *al.*, 2002) et d'après les résultats obtenues par l'utilisation des tests d'identifications morphologiques et biochimiques classiques, nos souches bactériennes isolées à partir du blé fermenté « hamoum » peuvent être apparentées probablement aux espèces suivants :

Lactobacillus sp : BHL5, BHL25, BHL27.

Lactococcus sp : BHC2, BHC4.

Enterococcus sp : BHC1, BHC3, BHC6, BHC8, BHC9, BHC13, BHC16, BHC18, BHC19, BHC23, BHC26, BHC28.



Figures 28 : Distribution quantitative des isolats lactiques

III. Résultats de l'activité antimicrobienne

III.1 Activité antimicrobienne des bactéries lactiques contre les bactéries pathogènes

Dans cette étude nous avons testé la capacité d'inhibition des bactéries lactiques vis-à-vis des bactéries pathogènes à gram positive telle que *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 et *Bacillus cereus* ATCC 10876 et des autres à Gram négative telle que *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, par contact direct en utilisant la méthode de Fleming et *al* (1975).

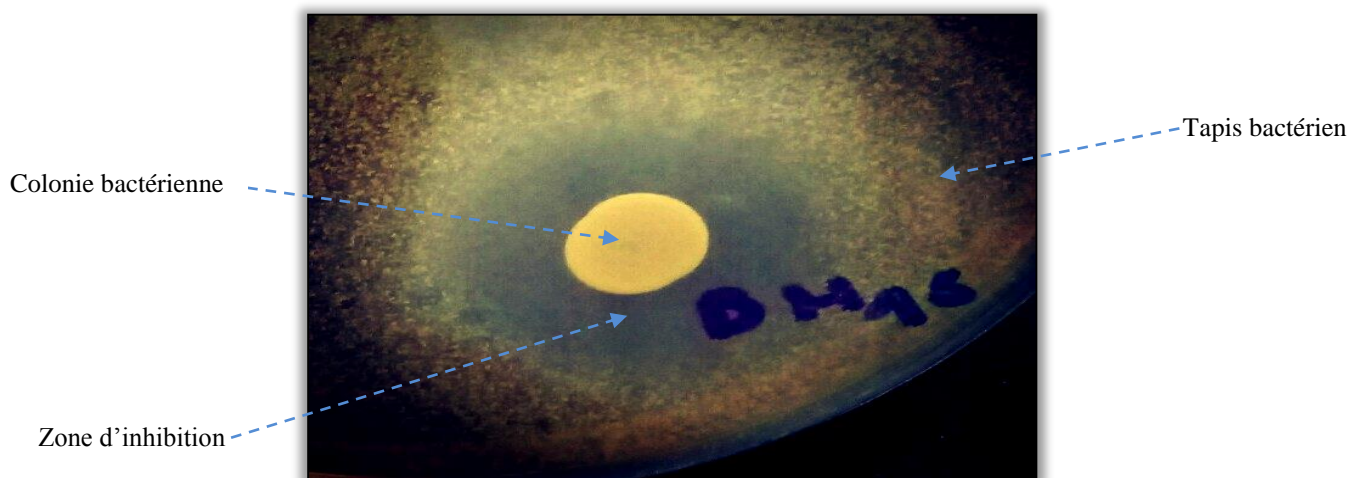


Figure 29: Zone d'inhibition d'une bactérie lactique

Les résultats obtenus de l'interaction entre les bactéries lactiques et les souches pathogènes, révèlent une présence de zone claire autour des isolats lactiques.

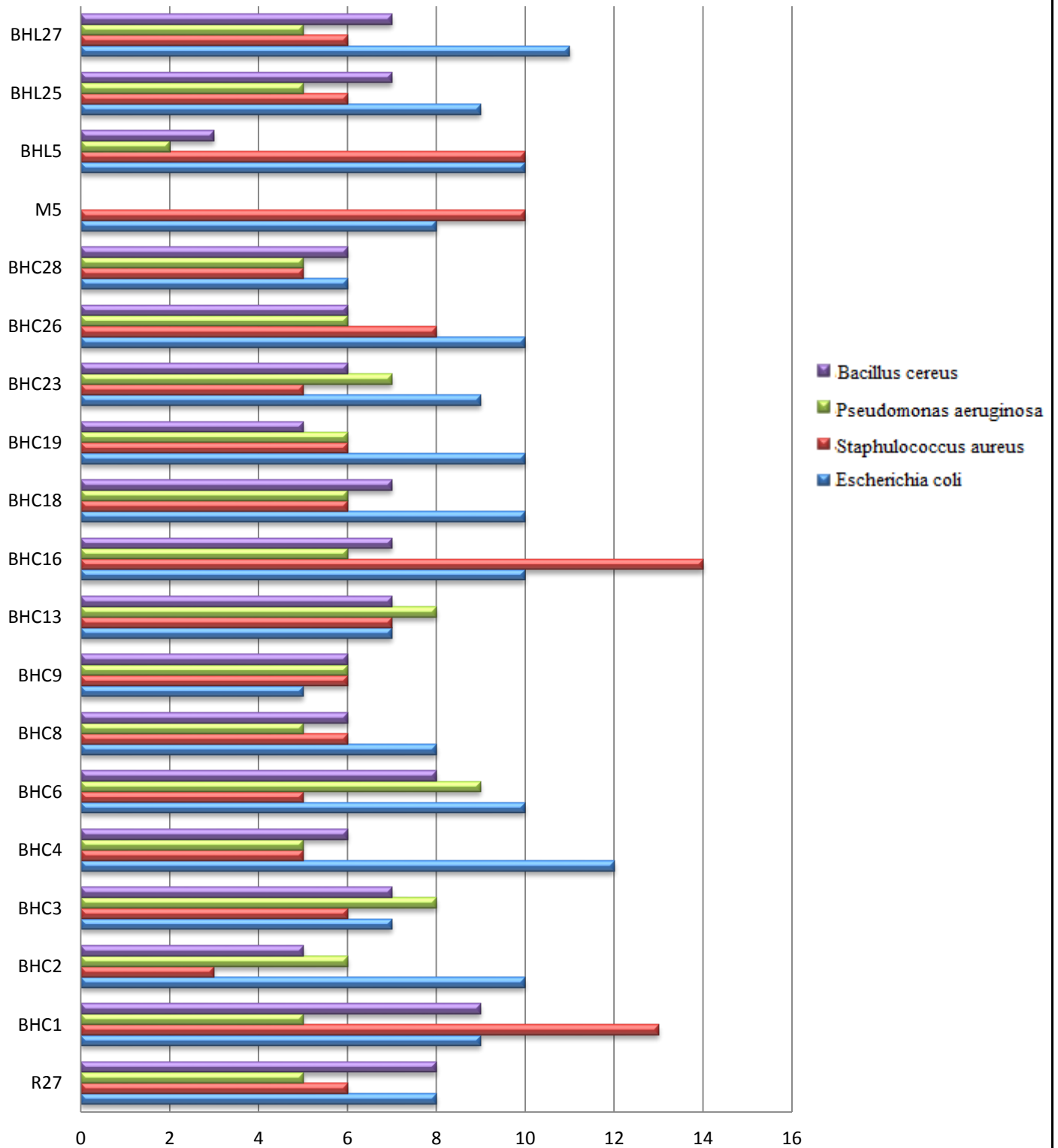
Le tableau 06 et la figure 38 représentent les résultats d'inhibition contre les bactéries pathogènes. L'inhibition est notée positive lorsqu'elle est supérieure de 1mm (Schillinger et Lüke 1989).

- ➔ Les résultats obtenus montrent clairement que tous les isolats lactiques étudiés ont une activité inhibitrice contre les bactéries pathogènes, dont les diamètres varient entre 2 et 14 mm. A l'exception de M5 « *Pediococcus acidilactici* » ou on observe une absence d'inhibition vis-à-vis de *Pseudomonad aeruginosa* et *Bacillus cereus*.
- ➔ Les différents isolats de *Enterococcus sp* sélectionnées, présentent un spectre d'activité élevé vis-à-vis des autres genres de bactéries inhibitrices étudiées. Les diamètres des zones d'inhibition varient entre 5 et 14 mm.
- ➔ Les diamètres des zones d'inhibition de genre *Lactobacillus sp* varient entre 2 et 11 mm.
- ➔ Les diamètres des zones d'inhibition de genre *Lactococcus* varient entre 3 et 12 mm.
- ➔ Les diamètres des zones d'inhibition de genre *Pediococcus* varient entre 8 et 10.
- ➔ Le diamètre d'inhibition des espèces *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*, sont les plus grandes par rapport Les deux autres souches pathogènes testées.

Tableau 06: Résultats de l'activité antimicrobienne des isolats lactiques obtenu par la méthode de Fleming et *al* (1975).

Souches		Diamètre de la zone d'inhibition des bactéries en mm			
Indicatrice Inhibitrice	<i>Escherichia .coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacillus cereus</i>	
	R27	8	6	5	8
BHC1	9	13	5	9	
BHC2	10	3	6	5	
BHC3	7	6	8	7	
BHC4	12	5	5	6	
BHC6	10	5	9	8	
BHC8	8	6	5	6	
BHC9	5	6	6	6	
BHC13	7	7	8	7	
BHC16	10	14	6	7	
BHC18	10	6	6	7	
BHC19	10	6	6	5	
BHC23	9	5	7	6	
BHC26	10	8	6	6	
BHC28	6	5	5	6	
M5	8	10	0	0	
BHL5	10	10	2	3	
BHL25	9	6	5	7	
BHL27	11	6	5	7	

Isolats lactiques



Figures 30: Inhibition des bactéries pathogènes par les bactéries lactiques.



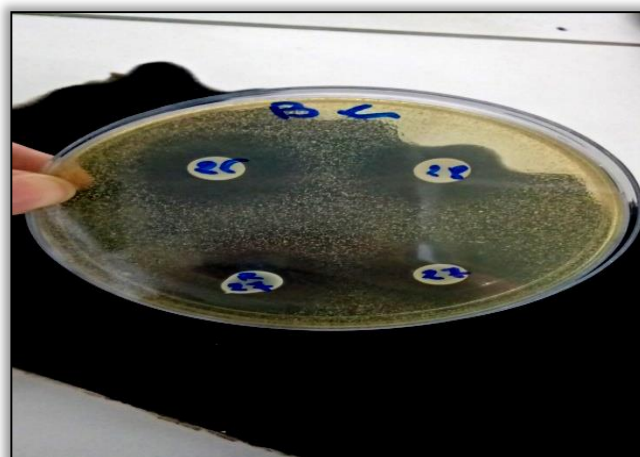
Staphylococcus aureus



Pseudomonace aeruginosa



Escherichia coli



Bacillus cereus

Figures 31: Résultats de l'effet inhibiteur des bactéries lactiques contre les bactéries pathogènes.

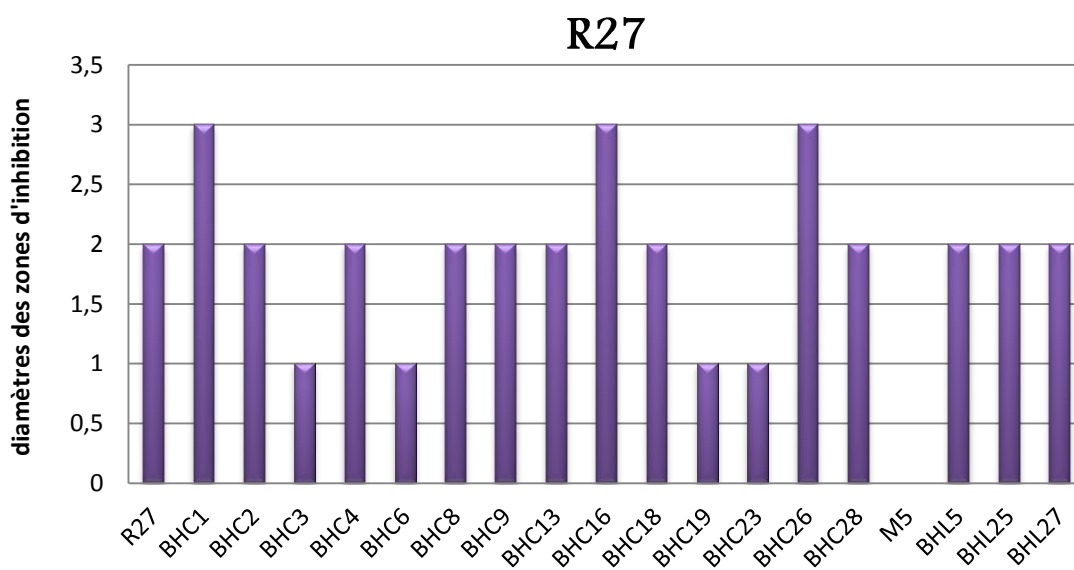
III.2 Activité antimicrobienne entre les bactéries lactiques

Dans cette étude, tous les isolats lactiques présentent une activité inhibitrice contre la souche R27 dont les diamètres varient entre 1mm et 3mm. A l'exception de la souche M5 « *Pediococcus acidilactici* » ou on observe une absence d'inhibition vis-à-vis la souche R27 « *Lactobacillus plantarum* ».

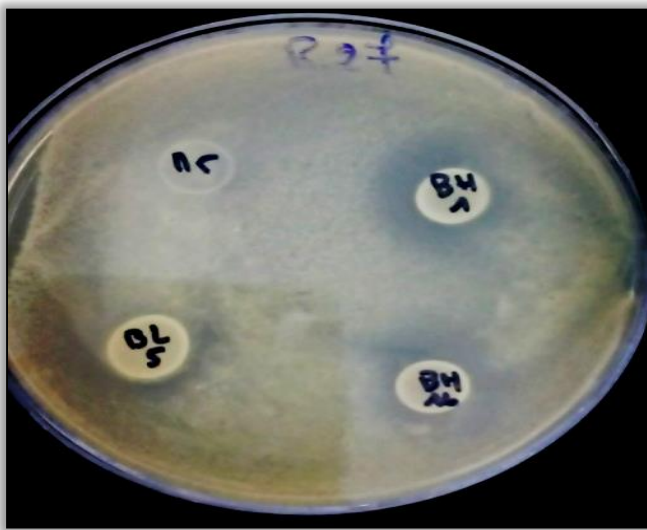
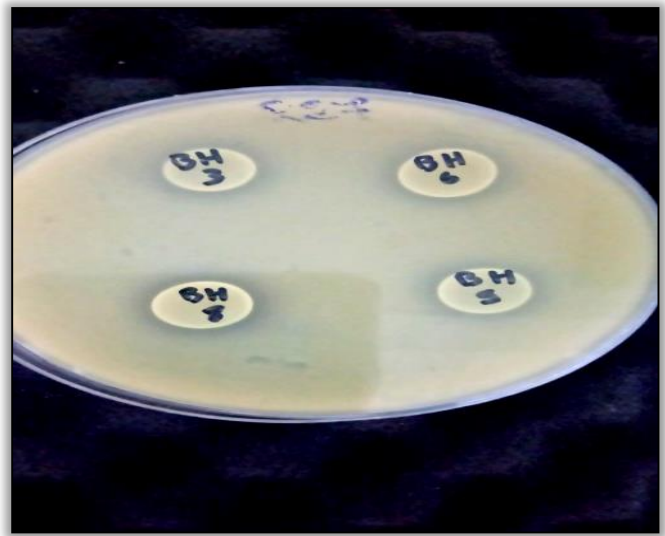
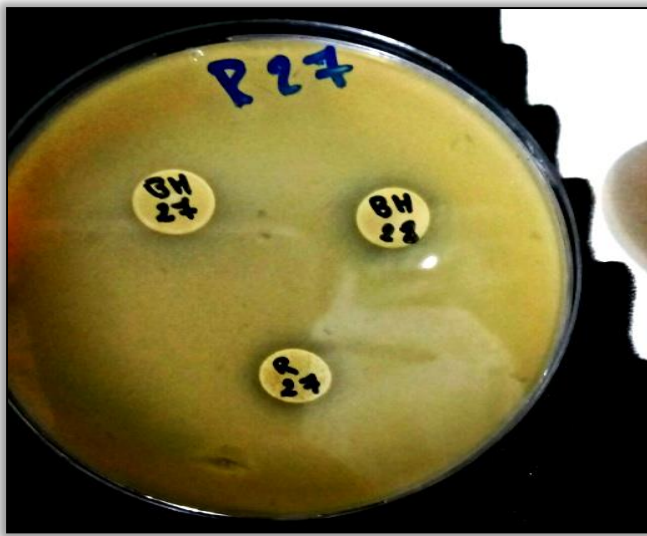
- Les isolats BHC1, BHC16, BHC26 qui appartient au genre *Enterococcus sp*, présentent le plus grand pouvoir inhibiteur au vu des halos d'inhibition dont le diamètre de 3 mm. Tandis que le diamètre de la zone d'inhibition des genres *Lactobacillus sp* et les *Lactococcus sp* est de 2 mm.
- Les isolats BHC3, BHC6, BHC19, BHC23 qui appartient au genre *Enterococcus sp* sont montré l'inhibition la plus faible contre l'isolat R27 (*Lactobacillus plantarum*) dont le diamètre presque nul de 1 mm.
- Le genre *Pediococcus acidilactici* ne révèle aucune zone d'inhibition.
- Les isolats de *Lactobacillus plantarum* se sont auto-inhibés dans un diamètre d'inhibition de 2 mm.
- Par cette méthode, la majorité des isolats testés ont présenté une activité antimicrobienne vis-à-vis la souche R27.
- Ces inhibitions sont probablement dues à la production d'acide lactique, car vu la nature homofermentaire des entérocoques et des *Lactocoques*, l'acide lactique est le principal ou le seul produit du métabolisme sécrété à partir du lactose (Larpent-Gourgaud *et al.*, 1997).
- La présence des halos d'inhibition peut être également due à l'accumulation du peroxyde d'hydrogène qui est sécrété par les bactéries lactiques, peut alors inhiber ou tuer de façon non spécifique d'autres bactéries, particulièrement celles qui ne possédant pas de catalase peroxydase (Eschenbach *et al.*, 1989), ce qui est le cas d'activité antimicrobienne entre les bactéries lactiques
- Cet antagonisme peut être aussi provoquée par le contacte cellulaire ou par l'épuisement de nutriments, dans le cas d'auto-inhibition entre les bactéries lactiques.

Tableau 07: Résultats de l'activité antimicrobienne entre les bactéries lactiques

Indicatrice Inhibitrice	R27
R27	2 mm
BHC1	3 mm
BHC2	2 mm
BHC3	1 mm
BHC4	2 mm
BHC6	1 mm
BHC8	2 mm
BHC9	2 mm
BHC13	2 mm
BHC16	3 mm
BHC18	2 mm
BHC19	1 mm
BHC23	1 mm
BHC26	3 mm
BHC28	2 mm
M5	0 mm
BHL5	2 mm
BHL25	2 mm
BHL27	2 mm



Figures 32: Inhibitions entre les bactéries lactiques



Figures 33: Résultats de l'effet inhibiteur des bactéries lactiques vis-à-vis *Lactobacillus plantarum* (R27).

III.3 Caractérisation de la nature de la substance inhibitrice

III.3.1 La mise en évidence des inhibitions dues à l'acide lactique

Pour minimiser la production d'acide, nous avons utilisé un milieu tamponné à pH 7 avec le tampon phosphate. Le milieu tamponné à pH 7 maintient le pH constant (Sambrook et *al.*, 1986) afin d'éliminer l'effet de l'acidité produite dans le milieu.

L'évaluation des résultats obtenu avec le milieu témoin (non tamponné) et le milieu tamponné à pH 7 nous ont permis de déterminer si la production d'acide est un facteur actif des inhibitions enregistrée.

Sur milieu MRS solide tamponné, les diamètres des zones d'inhibitions à diminuée (tableau 08, 09). Par rapport au milieu témoin (non tamponné), cela indique que cette diminution due à l'acide lactique.

Les observations que nos pouvons faire à partir des résultats de ce test sont :

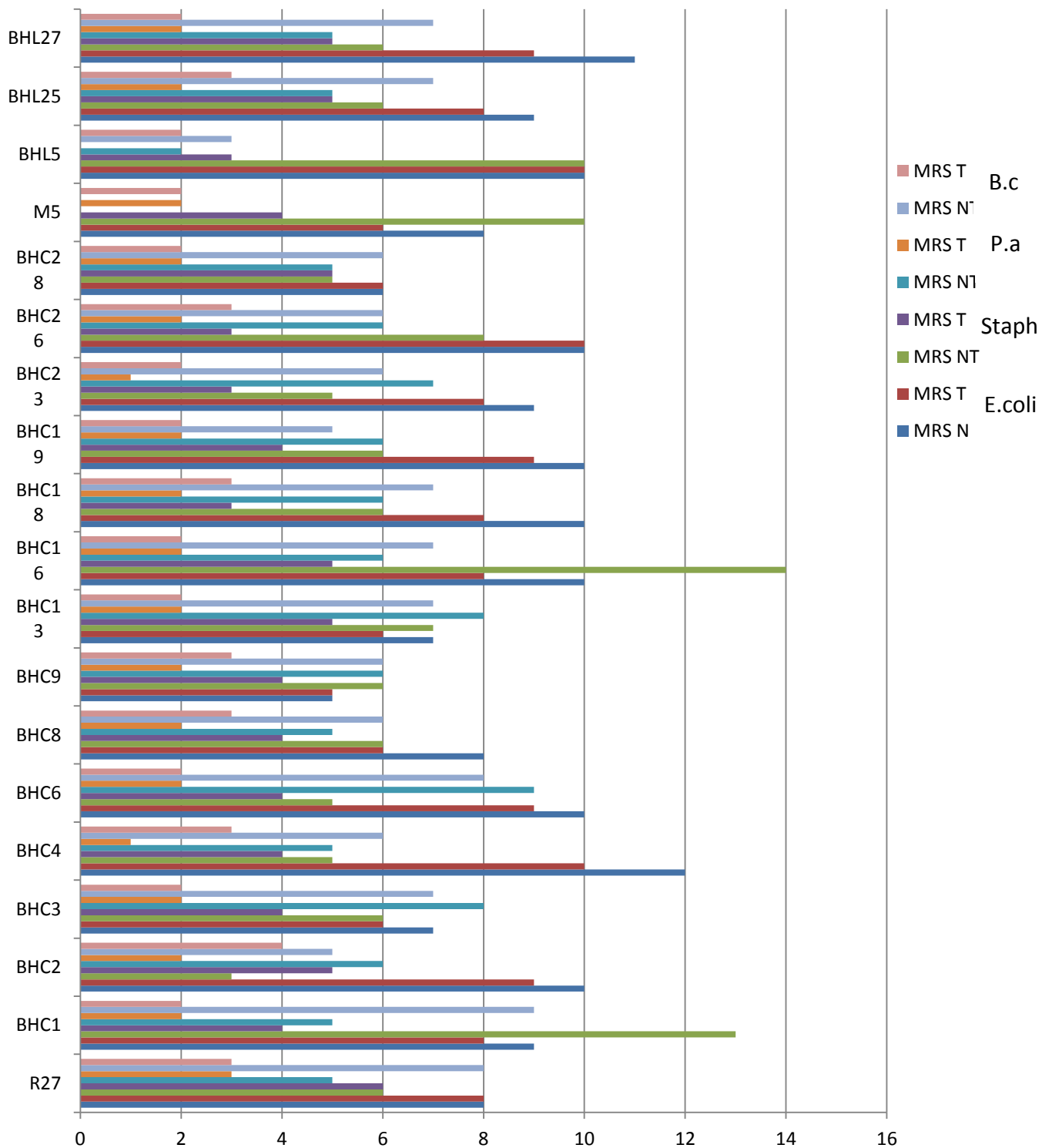
- ➔ nous avons observées des levées partielles des inhibitions, dans ces cas nous pouvons dire que l'acidité est partiellement en cause. Ces inhibitions peuvent aussi être dues à la production de bactériocines, certaines bactériocines sont actives à pH acide et perdent leur activités à pH neutre.
- ➔ Dans le cas de BHL5, on a observée une levée d'inhibition vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*, ce qui signifie que l'acide lactiques est en cause.
- ➔ Dans le cas des isolats R27, BHC9, BHC26, BHC28, BHL5, aucune diminution des zones d'inhibition n'a été observée vis-à-vis *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.
- ➔ On observe que les diamètres des zones d'inhibition ont diminués beaucoup plus dans le cas des souches *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus cereus*.

Tableau 08: Inhibitions des isolats lactiques on milieu tamponné et non tamponné.

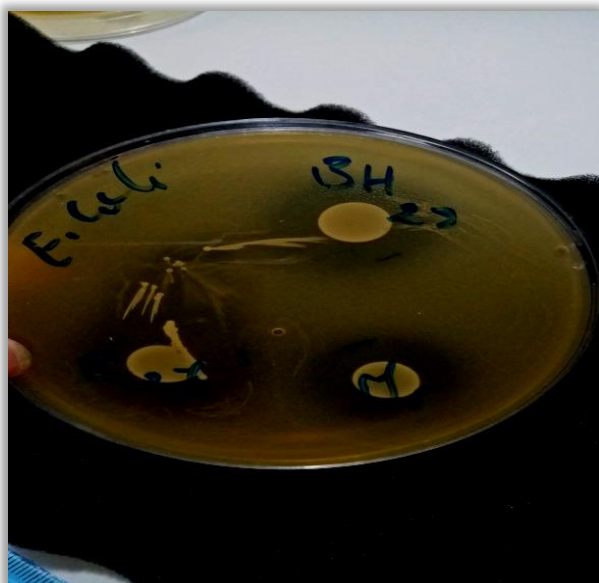
Souches		Diamètre de la zone d'inhibition des bactéries en mm							
Indicatrice Inhibitrice	<i>Escherichia .coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Bacillus cereus</i>		
	MRS NT	MRS T	MRS NT	MRS T	MRS NT	MRS T	MRS NT	MRS T	
R27	8	8	6	6	5	3	8	3	
BHC1	9	8	13	4	5	2	9	2	
BHC2	10	9	3	5	6	2	5	4	
BHC3	7	6	6	4	8	2	7	2	
BHC4	12	10	5	4	5	1	6	3	
BHC6	10	9	5	4	9	2	8	2	
BHC8	8	6	6	4	5	2	6	3	
BHC9	5	5	6	4	6	2	6	3	
BHC13	7	6	7	5	8	2	7	2	
BHC16	10	8	14	5	6	2	7	2	
BHC18	10	8	6	3	6	2	7	3	
BHC19	10	9	6	4	6	2	5	2	
BHC23	9	8	5	3	7	1	6	2	
BHC26	10	10	8	3	6	2	6	3	
BHC28	6	6	5	5	5	2	6	2	
M5	8	6	10	4	0	2	0	2	
BHL5	10	10	10	3	2	0	3	2	
BHL25	9	8	6	5	5	2	7	3	
BHL27	11	9	6	5	5	2	7	2	

MRS T : MRS Tamponné

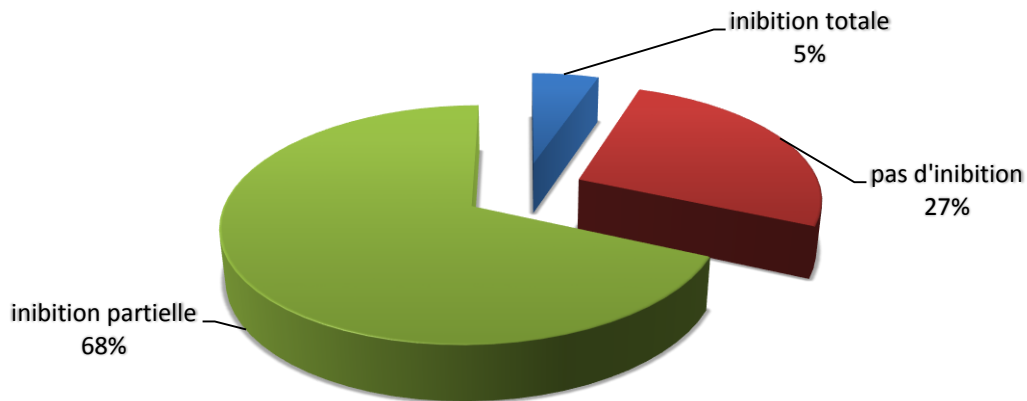
MRS NT : MRS Non Tamponné



Figures 34: Diamètres d'inhibition contre les bactéries pathogènes sur milieu MRS NT et MRS T
 B.c : *Bacillus cereus*.
 P.a : *Pseudomonas aeruginosa*.
 Staph : *Staphylococcus aureus*.
 E.coli : *Escherichia coli*.



Figures 35: Résultats de l'effet inhibiteur des bactéries lactiques contre les bactéries pathogènes sur milieu tamponné.



Figures 36 : Inhibitions des bactéries lactiques contre les bactéries pathogènes en milieu tamponné et non tamponné.

- ➔ D'après les résultats obtenus on observe que 68% des inhibitions dues partiellement à l'acide lactique, et 5% dues totalement à l'acide lactique et 27% ne révèle aucune inhibition.
- ➔ Nous avons observée que les zones d'inhibitions des isolats lactiques ont diminuées dans le milieu tamponné comparé à ceux obtenues en milieu non tamponné. Ceci indique que l'acidité est partiellement en cause dans cette inhibition.
- ➔ Le diamètre d'inhibition de *Lactobacillus plantarum* contre elle-même ne change pas dans le milieu non tamponné et Tamponné. Dans ce cas l'auto-inhibition de la souche R27 n'est pas due à l'acide lactique mais à d'autres facteurs (le peroxyde d'hydrogène, les bactériocines...).

On observe une levée d'inhibition dans le cas des isolats BHC2, BHC4 qui appartiennent au genre *Lactococcus sp*, et les isolats CHC3, BHC19, BHC23 qui appartiennent au genre *Enterococcus sp*. Cela indique que l'inhibition de ces bactéries due à l'acide lactique.

Tableau 09: Inhibitions entre les isolats lactiques on milieu tamponné et non tamponné.

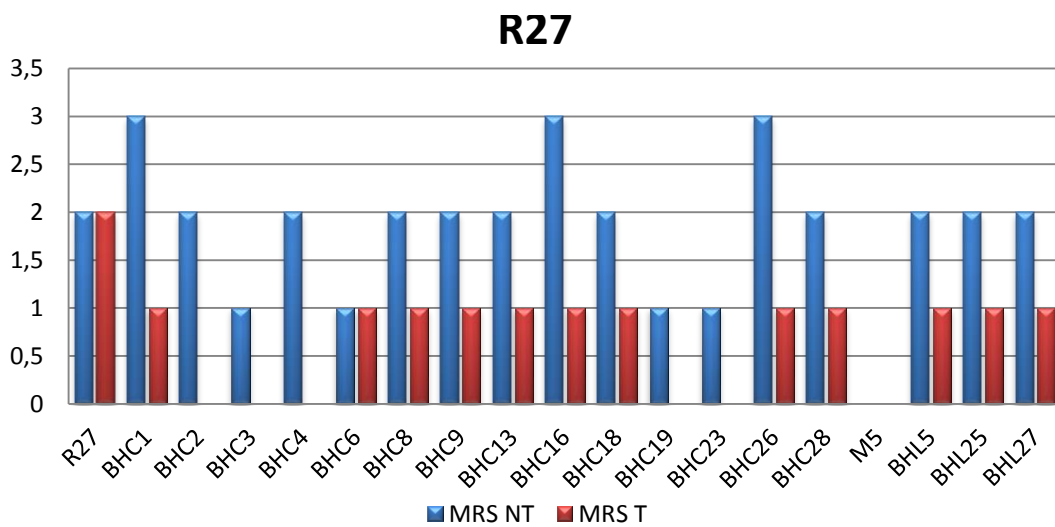
Isolats	R27	
Indicatrice Inhibitrice	MRS NT	MRS T
R27	2 mm	2 mm
BHC1	3 mm	1 mm
BHC2	2 mm	0 mm
BHC3	1 mm	0 mm
BHC4	2 mm	0 mm
BHC6	1 mm	1 mm
BHC8	2 mm	1 mm
BHC9	2 mm	1 mm
BHC13	2 mm	1 mm
BHC16	3 mm	1 mm
BHC18	2 mm	1 mm
BHC19	1 mm	0 mm
BHC23	1 mm	0 mm
BHC26	3 mm	1 mm
BHC28	2 mm	1 mm
M5	0 mm	0 mm
BHL5	2 mm	1 mm
BHL25	2 mm	1 mm
BHL27	2 mm	1 mm

MRS T : MRS Tamponné

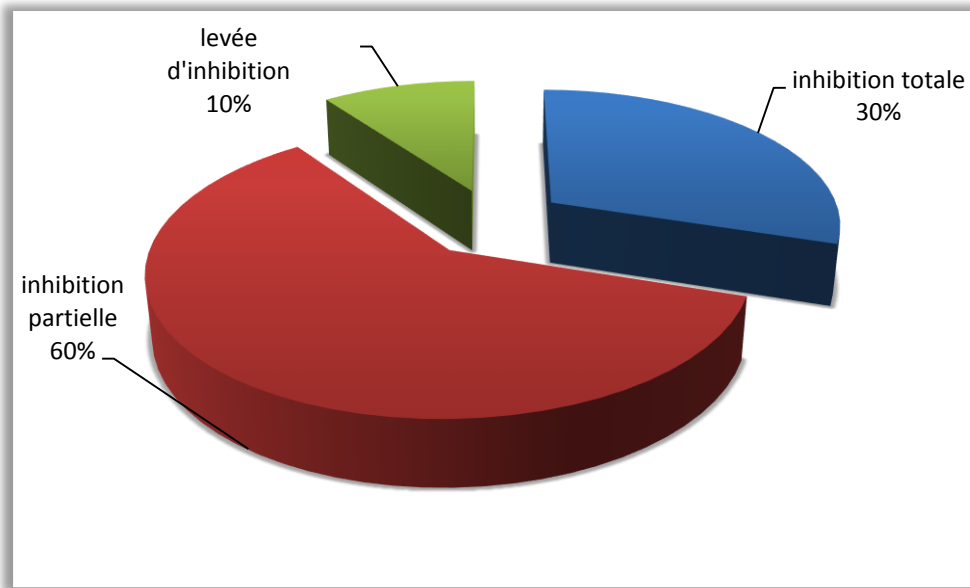
MRS NT : MRS Non Tamponné



Figures 37: Résultats de l'effet inhibiteur des bactéries lactiques contre la bactérie R27 sur milieu tamponné.



Figures 38: Inhibition entre les bactéries lactiques sur milieu MRS NT et MRS T



Figures 39: Inhibitions entre les bactéries lactiques en milieu tamponné et non tamponné.

➔ D'après les résultats d'inhibition entre les bactéries lactique dans milieu tamponné, on observe un levé d'inhibition d'environ 10% des bactéries, et 60% des inhibitions dues partiellement à l'acide lactique, et une valeur de 30% dues totalement à l'acide lactique.

Conclusion

Conclusion

L'identification des bactéries lactiques et l'étude des interactions ont permis de mettre en évidence les inhibitions antimicrobiennes contre les bactéries pathogènes des bactéries lactiques. En effet cette activité antimicrobienne peut participer à la conservation des produits laitiers, en produisant des substances susceptibles d'inhiber les bactéries responsables de leur altération.

Notre étude basée sur les tests biochimiques et physiologique classiques à permis l'identification des bactéries lactiques isolées à partir de blé fermenté et se répartit comme suit : *Lactobacillus sp* (BHL5, BHL25, BHL27), *Lactococcus sp* (BHC2, BHC4) et *Enterococcus sp* (BHC1, BHC3, BHC6, BHC8, BHC9, BHC13, BHC16, BHC18, BHC19, BHC23, BHC26, BHC28).

Dans la pratique industrielle, les levains de bactéries lactiques ne sont jamais constitués d'une seule souche pure, mais de mélanges de souches. Dans ces conditions, des interactions métaboliques entre ces bactéries se manifestent.

Les interactions entre les bactéries lactiques et les souches pathogènes a révélé des zones d'inhibition bien distincte dont le diamètre vari entre 2 à 14 mm.

L'activité antimicrobienne entre les bactéries lactiques et les bactéries pathogènes a permis de détecter des inhibitions dues à l'acidité et a différents facteurs antimicrobienne (peroxyde d'hydrogène, bactériocine, reutéline...).

L'activité antimicrobienne entre les bactéries lactiques à permis de détecter des inhibitions dues à l'acidité et a différents facteurs antimicrobienne tel que le peroxydes d'hydrogènes, les bactériocines...).

Nous avons conclu qu'il existe plusieurs genres des bactéries lactiques dans le blé fermenté qui ont un pouvoir antimicrobien, cela est un indice de sa qualité nutritionnel et sa bio-conservation.

Annexes

Annexe A :

➤ Milieu MRS (milieu de Man, Rogosa et Sharpe , de Man et al, 1960) :

Peptone	10g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	5g
Glucose	20g
Phosphate di potassique	2g KH ₂ pou
Acétate de sodium	5g
Tween	80ml
Citrate d'ammonium	2g
Sulfate de magnésium.....	0.2g MgSo ₄
Sulfate de manganèse.....	0.5g MnSo ₄
Agar.....	15g
PH.....	6.5
Eau distillé	1000ml

Stérilisation à 120°C pendant 15 min

➤ Milieu MRS (semi solide) :

MRS liquide	1000ml
Agar	7.5g
Ph	6.5

Stérilisation à 120°C pendant 15 min.

➤ **Milieu Tryptica-soja :**

Peptone de caséine	17g
Peptone de farine soja.....	3g
Glucose	2.5g
Chlorure de sodium	5g
Phosphate Di potassique.....	2.5g
Eau	1000ml
PH	7.3

➤ **Milieu Tryptica-soja (semi solide) :**

Tryptica-soja liquide.....	1000ml
Agar	7.5g
PH.....	7.3

Stérilisation à 120°C pendant 15 min.

➤ **Milieu hypersalée (6.5% NaCl) :**

Peptone	15g
Extrait de viande	5g
Glucose	5g
NaCl.....	65g
Agar	15g
Eau distillée.....	1000ml
PH.....	6.5

Stérilisation à 120°C pendant 20min.

➤ Milieu Clark et Lubs :

Peptone.....	7g
Phosphate di potassique	5g
Glucose	5g
Eau distillée.....	1000ml
PH.....	7

Stérilisation à 120°C pendant 20min.

➤ Milieu moëller à arginine :

Peptone	5g
Extrait de viande	5g
Glucose	0.5g
Poupre de bromocrésol	0.1g
Pyridoxal	5mg
Rouge de crésol	5mg
Eau distillée	1000ml
L'arginine	10g
PH.....	6.5

Stérilisation 120°C pendant 20 min.

➤ Milieu MRS BCP :

MRS (milieu liquide) sans glucose et extrait de viande

Eau distillé.....	1000ml
Bromocrésol poupre	0.025mg
PH.....	7

Stérilisation à 120°C pendant 20min.

➤ Bouillon azide de sodium :

200ml de MRS bouillon → 0.03g d'azide de sodium.

Annexe B

➤ Coloration de Gram

La coloration de Gram a été réalisée selon la technique suivante :

- ✓ Sur une lame, fixer à la chaleur une culture bactérienne ;
- ✓ Recouvrir la lame avec la solution de violet de gentiane pendant une minute ;
- ✓ Ajouter du lugol pendant 30 secondes ;
- ✓ Décolorer avec de l'alcool, puis rincer à l'eau
- ✓ Faire une contre coloration en utilisant la fuschine et laisser agir 20 à 30 secondes ;
- ✓ Laver à l'eau ;
- ✓ Après séchage, soumettre la lame a une observation microscopique à immersion (x100).

{Les bactéries a Gram positif apparaissent en violet et les bactéries Gram négatif en rose}.

Annexes C

➤ Milieu MRS tamponné :

La solution tampon est obtenue par le mélange de deux solutions A et B

Solution A

KH₂ PO₄ 5.44g

Eau distillée 200ml

Solution B

Na₂P₄..... 11.36g

Eau distillée 400ml

PH..... 7.3

Stérilisation à 120°C pendant 20min.

Références bibliographiques

Bibliographie

A

Alais, C., (1984). Les Bactéries Lactiques Et Les Levains. In Science Du Lait-Principes Des Techniques Laitières. 4ème Edition , Paris : Sepaic, P. 345-387.

Axelsson L., 2004. Classification And Physiology. *In* : Lactic Acid Bacteria: Microbiological And Functional Aspects ((Salminen S., Wright A.V. Et Ouwehand A.). *3e Ed., Marcel Dekker, Inc.* New York. 1-66.

Ammor, M.S., Et Mayo, B., (2007) Selection Criteria For Lactic Acid Bacteria To Be Used As Functional Starter Cultures In Dry Sausage Production. *Meat. Science.* 76 : 138-146.

ADAMS M.R. Et HALL C.J. 1988. Growth Inhibition Of Food Borne Pathogens By Lactic Acid And Aceticacids And Their Mixtures. *Int. J. Food Sci. Technol.* 23: 287-292.

Axelsson L.T., Chung T.C., Dobrogosz W.J. Et Lindgren S.E. 1989. Production Of A Broad Spectrum Antimicrobial Substance By *Lactobacillus Reuteri*. *Microbiol. Ecol. Health Dis.* 2:131-136.

B

Bourgeois C.M. Et Larpent J.P., 1996. Microbiologie Alimentaire : Aliments Fermentés Et Fermentations Alimentaires. *Tec & Doc, Lavoisier.* Paris. 432-704.

Bekhouche, F., Boulahrouf, A. (2005). Etude Quantitative Et Qualitative Des Bactéries Lactiques De Lait Cru Produits Par Des Vaches Locales Appartenant A Six Stations D'Elevage De Constantine. *Science & Technologie.* Vol. 23, Pp. 38-45.

Badis, A., Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M., Ouzrout, R., (2005): Caractérisation Phénotypique Des Bactéries Lactiques Isolées A Partir Du Lait Cru De Chèvre De Deux Populations Caprines Locales (Arabia Et Kabile). *In Science.Tech.* 23 : 30-37.

C

Collins, M.D., Samelis, J., Metaxopoulos, J., Et Wallbanks, S., (1993). Taxonomic Studies Of Some Leuconostoc Like Organisms From Fermented Sausages, Description Of A New Genus Weissella For The Leuconostoc Paramesenteroides Group Of Species. *J. Appl.*

Chafai S. 2006 : Effet De L'addition Des Probiotiques Dans Les Régimes Alimentaires Sur Les Performances Zootechniques Du Poulet Hair, Mémoire De Magister En Sciences Vétérinaires. *Université El-Hadj-Lakhdar De Batna.*

Carr, F. J., Chill, D. Et Maida, N. (2002). The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey *Critical Rev. Microbiol.* 28: 281-370.

D

Dellaglio, F., De Roissart, H., Torriani, S., Curk, M. Et Janssens, C. 1994. Bactéries Lactiques Aspects Fondamentaux Et Technologiques, 1 : 25-114.

Desmazeaud, M. 1996. L'Etat Des Connaissances En Matériel De Nutrition De Bactéries Lactiques. *Le Lait*, 63 : 267-16.

Desmazeaud M.J (1998) - Bactéries Lactiques Et Qualité Des Fromages. Qualité Sanitaire Des Produits Alimentaires. Laboratoire De Recherches Laitières. INRA Paris.

Dortu, C., Et Thonart, P., (2009). Les Bactériocines Des Bactéries Lactiques :Caractéristiques Et Intérêt Pour.

E

El-Ziney M.G., Jakobsen M. Et Debevere J.M. 1998. Reuterin. *Nat. Food Antimicrobial Systems.* 24: 17-25.

Ennahar S., Sonomoto K. Et Ishizaki A. 1999. Class Iia Bacteriocins From Lactic Acid Bacteria:Antibacterial Activity And Food Preservation. *J. Biosci. Bioeng.* 87: 705-716.

F

FAO/WHO.2002.Report Of A Joint FAO/WHO Working Group On Drafting Guidelines For The Evaluation Of Probiotics In Food. In Guidelines For The Evaluation Of Probiotics In Food. London, Ontario, Canada, Pp.1-11.

G

Gevers.D. 2002.Tetracycline Resistance In Lactic Acid Bacteria Isolated From Fermented Drysausages.Thèse Doc. Univ. Gent. Fac. Sci. Gent. Belgium

Galvez, A., Abriouel, H., Lopez, R.L., Ben Oma, N. (2007) - Bacteriocin-Based Strategies For Food Biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* 120(1-2), 51-70.

Gerrit S., Bart A.S. Et Wim J.M.E., 2005. Flavour Formation By Lactic Acid Bacteria And Biochemical Flavour Profiling Of Cheese Products. *FEMS. Microbiol. Rev.* 29 : 591-610.

Gould G.W. 1991. Antimicrobial Compound. In: Biotechnology And Food Ingredientseds. Goldberg I. Et Williams R. *Van Nostrand Reinhold*, New York. Pp. 461-483.

Gonzalez-Rodriguez, M. N., Sanz, J. J., Santos, J. A., Otero, A. And Garcia-Lopez, M. L. (2002) - Numbers And Types Of Microorganisms In Vacuum-Packed Cold-Smoked Freshwater Fish At The Retail Level. *International Journal Of Food Microbiology* 77, 161-168.

Guiraud, J.P. (1998). Microbiologie Des Principaux Produits Alimentaires, Microbiologie Alimentaire. Ed ©Dunod, Paris.

Guiraud j.p. 2003. Microbiologie Alimentaire. Edition DUNOD. P.

H

Haddie J.M., 1986. Other Streptococci. *In : Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology* (Sneathp.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G.W. Et Baltimore W.). 1 : 1070.

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

Hariri A., Ouis N., Sahnouni F. Et Bouhadi D., 2009. Mise En Oeuvre De La Fermentation De Certains Ferments Lactiques Dans Des Milieu A Base Des Extraits De Caroube. *Rev.Microbiol. Ind. San Et Environn. P:* 37-55.

Hammes, W.P., M.J. Brandt, K.L. Francis, J. Rosenheim, M.F.H. Seitter And S.A. Vogelmann. 2005. Microbial Ecology Of Cereal Fermentations. *Trends In Food Science & Technology* 16: 4–11.

K

Khalid n.m. et marth e.h., 1990. Lactobacilli, Their Enzymes And Role. In: Ripening And Spoilage of Cheese. *Rev. Dairy Sci.* 73 : 158-167.

Klaenhammer T.R. (1993) - Genetics Of Bacteriocins Produced By Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12(1-3), 39-85.

Kavashnikov (e. J.) And sudenko(1.) (1967). - Antibiotic Properties Of *Lactobacillus Brevis*. *Mikrobiol. Zn. Kyiv.*, 29, 146.

L

Larrent, J.P. 1997. Mémento Technique De Microbiologie .3eme Ed. Technique Et Documentation Lavoisier. Paris. 910 Pages.

Leroy F. Et Al., 2006. Sugars Relevant For Sourdough Fermentation Stimulate Growth Of And Bacteriocin Production By *L. Amylovorus* DCE 471. *Int. J. Food Microbiol.*, 12, 102-111.

Leveau, J.Y., Et Bouix, M., (1993). Microbiologie Industrielle : Les Microorganismes D'intérêt Industriel. Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 85-87.

M

Morisset d berjaud j m , frere j et héchard y. (2005). Bacteriones Des Bactéries Lactiques. In : Luquet F-M Et Corrieu G. Bactéries Lactiques Et Brobiotiques. Lavoisier. Paris. Pp113-194.

Mc auliffe o., ross r.p et hill c. 2001. Lantibiotics: Structure, Biosynthesis And Mode Ofaction. *FEMS Microbial. Rev.* 25: 285-308.

Mokhtari, s. 2012. Mémoire De Magister : Effet Protecteur De Certaines Bactéries Lactiques Isolées A Partir De Blé Fermenté Type Hamoum. Université El Senia (Oran, Algérie).

N

Novel, G. 1993. Les Bactéries Lactiques. Dans : Microbiologie Industrielle, Les Microorganismes D'intérêt Industriel. Leveau, J.Y, Bouix, M., Tech. Et Doc. Lavoisier Paris, Pp: 170374.

O

Orla-Jensen S. 1919. The Lactic Acid Bacteria. A.F. Høst and Son, Koenighichen Hof-Boghamdel, Copenhagen.

Ogier j.c., casalta e., farrokh c. Et saïhi a., 2008. Safety Assessment Of Dairy Microorganisms: The *Leuconostoc* Genus. *Int. J. Food Microbiol.* 126 : 286-290.

P

Paul Ross, R., Morgan, S. And Hill, C. 2002. Preservation And Fermentation: Present And Future. *Int. J. Food. Microbiol*, 79: 3 – 16.

Piard J C Et Desmazeaud M. (1991). Inhibiting Factors Produced By Lactic Acid Bacteria. 1.Oxygen Metabolites And Catabolism End-Products. *Lait.* 71,525-541.

Pot B., Devriese L.A., Uris D., Vandamme P., Haesebrouck F. Etkersters K., 1996. Phenotypic identification And Differentiation Of *Lactococcus* Strains Isolated From Animals. *Syst. Appl. Microbiol.* 19 : 213-222.

Pot B., 2008. The Taxonomy Of Lactic Acid Bacteria. *In : Bactéries Lactiques De La Génétique Auxferments (Corrieu G. Et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier.* Paris.1-106.

R

Roissarth. And Luquetf.M. Bactéries Lactiques: Aspects Fondamentaux Et Technologiques

Rao D.R., Reddy A.V., Pulusani S.R. Et Cornwell P.E. 1984. Biosynthesis And Utilisation Of Folic Acid And Vitamin B12 By Lactic Cultures In Skim Milk. *J. Dairy Sci.* 67: 1169-1174.

S

Salminen, S., Ouwehand, A.C, Benno, Y, Lee Y.K .1999 .Probiotics: How Should They Be defined? *Trends Food Sci. Technol.* 10:107-110.

Savadogo, A. Ouattara1, C.A.T. Savadogo, P.W. Ouattara1, A.S. Barro, N.,Traore, A.S. 2004. Microorganisms Involved In Fulani Traditional Fermented Milk In Burkina Faso. *Pakistan Journal Of Nutrition* 3 (2): 134-139.

Stiles M.E. & Holzapfel W.,(1997) - Lactic Acid Bacteria Of Foods And Their Current Taxonomy.*Int. J.Food Microbiol.* 36(1), 1-29.

Smith L. Et Palumbo M. 1983. De Bacterias Lacticas: Novel Approaches For The Development Of Lactic Acid Bacteria Resistant To Phages. Aniverario. *Technologia Lactea Latinoamericana*.7.

Saidi Noureddine. 2007. La Microflore Lactique Du Lait Cru De Chèvre Local Etudes , Microbiologique, Biochimique Et Génétique Des Bactéries Lactiques D'intérêt Bio-Préservateur Thèse De Doctorat. Université D'oran. 216 Pp.

T

Twomey d., ryan m., meaney b. & hill c., 2002. Lantibiotics Produced By Lactic Acid Bacteria: Structure, Function And Applications. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82, 165-185.

Tamime a.y., 2002. Microbiology Of Starter Cultures. In: Dairy Microbiology Handbook (Robinsonr.K.). *3e Ed., John Wiley And Sons, Inc.,* New York. 261-366.

Thomas, t.d., (1973). Agar Medium For Differentiation Of *Streptococcus Cremoris* From The Other Bacteria *N.Z.J.Dairy .Sci. Tech.*8:70-71.

V

Vignolo G. Et Al., 2000. Biodiversity Of Yeasts, Lactic Acid Bacteria And Acetic Acid Bacteria In The Fermentation Of “Shanxi Aged Vinegar”, A Traditional Chinese Vinegar. *Food Microbiology* 30: 289–297.