



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

**BENANTEUR HOUDA IBTISSEM**

**MEKHATRIA ZINEB ZAHIA**

Pour l'obtention du diplôme de

**MASTER EN BIOLOGIE**

**Spécialité: Nutrition et Santé**

THÈME

Evaluation de quelques aptitudes  
technologiques et probiotiques des bactéries  
lactiques isolées localement

Soutenue publiquement le 30 /05/2016

DEVANT LE JURY

Président	<b>CHAALEL Abdelmalek</b>	<b>M.C.B</b>	<b>U. Mostaganem</b>
Encadreur	<b>BENBOUZIANE Bouasria</b>	<b>M.C.B</b>	<b>U. Mostaganem</b>
Examineurs	<b>ZERROUKI Kheira</b>	<b>M.A.A</b>	<b>U. Mostaganem</b>

*Thème réalisé au de Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques et Aliment Fonctionnel –  
LMBAFS*

## DÉDICACES

Dans la vie, en cas de réussite, on a tendance à attribuer le mérite à sois- même. Mais aujourd'hui et après tant d'effort je dédie cette réussite :

A mes **chers parents** qui m'ont soutenue et encouragée le long de mes études, avec leurs moyens matériels et morales, ainsi que leurs prières, de ma première année de l'enseignement primaire jusqu'à la rédaction de ces mots.

A mes *frères et sœurs*, ma très cher jumelle *Imene*

Et particulièrement mon cher fiancé *Djamel-Eddine*

A mes amies *Soumia, Célia* et mon binôme *Zinouba*

A tous ce qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

*Benanteur houda Iblissem*

## DÉDICACES

Je dédie ce modeste travail présent entre vos mains, et qui est le fruit de plusieurs années d'effort et de travail continu :

A mes **chers parents** qui m'ont soutenue et encouragée le long de mes études, avec leurs moyens matériels et morales, ainsi que leurs prières, de ma première année de l'enseignement primaire jusqu'à la rédaction de ces mots.

A ma cher sœur « *Meriem El Batoul* »

A mon binôme « *Ibtissem* »

A ma *promo* et mes amies *Asma* ;

*Zineb ; Nadia ; Sihem ; Fatima.*

Aux deux familles de *Mekhatria* ET *Dahah.*

A tous ce qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

*Mekhatria zineb zahia*

## **REMERCIEMENTS**

*Nos profonds remerciements vont à notre promoteur Monsieur **B. BENBOUZIANE** pour la proposition de ce thème ainsi que pour sa compréhension et pour l'aide qu'il nous a prodigué et on remercie également les membres du laboratoire des Microorganismes*

*Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé (LMBAFS) de l'Université Abdelhamid Ibn*

*Badis Mostaganem.*

*On exprime notre profonde gratitude à Melle **Zerrouki kheira** et **Chaael Abdelmalek** qui*

*Nous on fait l'honneur de juger ce travail.*

*On tient également à remercier vivement le professeur **A. RIAZI** de nous avoir accueillis*

*dans son laboratoire*

*Nos remerciements s'adressent enfin à tous nos collègues et toute personne ayant*

*participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

## Abstract

Our study has led to the isolation and identification of twenty-eight (28) lactic acid bacterial strains from cow's milk, butter and ben native of Mostaganem region. Phenotypic characterization based on gram positive and catalase negative selections has allowed us to count (21) lactobacilli and (09) Lactococcus.

Furthermore, our strains (BML1b3; BML43M11; BMLR1; BML39; BML1127) have demonstrated an inhibitory effect on *Escherichia. coli* ATCC 10536; *salmonella* ATCC13311; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, giving respectively diameter zones (13mm, 17mm, 20mm, 11mm, 15mm) (18mm, 15mm, 20mm, 15mm, 14mm) (28mm, 20mm, 23mm; 20mm, 18mm).

These have good functional properties (Acid) that can be exploited. Probiotics skills (tolerance to acidity, NaCl) have also proved interesting. The strains used especially BML1b3 BML43M11 and BML39 resist and develop normally even at acidic pH (4) and moderately low (2) in the presence of a high concentration of NaCl (0.3%) and (0, 9 %). The results presented in this work was used to provide a clearer line of thinking on the potential of isolates that represent a way forward for possible candidates probiotic strains used in the fermentation and bio-food preservation.

**Keywords:** Lactic bacteria, antagonism, probiotic, Tolerance acidity.

## Résumé

Notre étude a conduit à l'isolement et l'identification de vingt-huit (28) souches de bactéries lactiques à partir de lait de vache, beurre et ben originaire de la région de Mostaganem. La caractérisation phénotypique basée sur les critères Gram positive et catalase négative nous a permis de dénombrer (21) lactobacilles et (09) Cocci.

Par ailleurs, nos souches (BMLlb3 ; BML43M11 ; BMLR1 ; BML39 ; BML1127) ont démontrées un effet inhibiteur sur *Escherichia. Coli* ATCC 10536 ; *salmonella* ATCC13311 ; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, donnant respectivement des zones de diamètre (13mm ; 17mm ; 20mm ; 11mm ; 15mm), (18mm ; 15mm ; 20mm ; 15mm ; 14mm), (28mm ; 20mm ; 23mm ; 20mm ; 18mm).

Ces derniers présentent de bonnes propriétés fonctionnelles (acidifiantes) qui peuvent être exploitées. Les aptitudes probiotiques (tolérance à l'acidité, aux NaCl) sont aussi révélées intéressantes. Les souches utilisées, surtout, BMLlb3 BML43M11 et BML39 résistent et se développent normalement même à pH acide (4) et moyennement bas (2) en présence d'une forte concentration de NaCl (0.3 %) et (0,9 %). Les résultats présentés dans ce travail permettent de fournir un ordre d'idée plus clair sur le potentiel des souches isolées qui représentent une voie d'avenir pour d'éventuels candidates de souches probiotiques utilisées dans la fermentation et la bio-conservation des aliments.

**Mots clés :** Bactéries lactiques, antagonismes, probiotique, Tolérance acidité.

## Abstract

Our study has led to the isolation and identification of twenty-eight (28) lactic acid bacterial strains from cow's milk, butter and ben native of Mostaganem region. Phenotypic characterization based on gram positive and catalase negative selections has allowed us to count (21) lactobacilli and (09) Lactococcus.

Furthermore, our strains (BMLlb3; BML43M11; BMLR1; BML39; BML1127) have demonstrated an inhibitory effect on *Escherichia. coli* ATCC 10536; *salmonella* ATCC13311; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, giving respectively diameter zones (13mm, 17mm, 20mm, 11mm, 15mm) (18mm, 15mm, 2mm, 15mm, 14mm) (28mm, 20mm, 23mm; 20mm, 18mm).

These have good functional properties (Acid) that can be exploited. Probiotics skills (tolerance to acidity, NaCl) have also proved interesting. The strains used especially BMLlb3 BML43M11 and BML39 resist and develop normally even at acidic pH (4) and moderately low (2) in the presence of a high concentration of NaCl (0.3%) and (0, 9 %). The results presented in this work was used to provide a clearer line of thinking on the potential of isolates that represent a way forward for possible candidates probiotic strains used in the fermentation and bio-food preservation.

**Keywords:** Lactic bacteria, antagonism, probiotic, Tolerance acidity.

## Tableau de matière

Remerciement

Dédicace

Résumé

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction

### **Chapitre I : Bactéries lactiques**

**I.1.** Présentation des bactéries lactiques **P01**

**I.2.** Habitat et origine des bactéries lactiques **P01**

**I.3.** Taxonomie des bactéries lactiques **P01**

**I.4.** Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques

**I.4.1.** Le genre *Lactobacillus* **P04**

**I.4.2.** Le genre *Lactococcus* **P04**

**I.4.3.** Le genre *Streptococcus* **P05**

**I.4.4.** Le genre *Enterococcus* **P05**

**I.4.5.** Les genres *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella* **P06**

**I.4.6.** Les genres *Pediococcus* et *Tetragenococcus* **P06**

**I.4.7.** Le genre *Bifidobacterium* **P07**

**I.5.** Principales voies fermentaires des bactéries lactique **P07**

**I.5.1.** Voie homofermentaire ou EMP **P09**

**I.5.2.** Voie hétérofermentaire ou voient des pentoses phosphate **P09**

**I.6.** Métabolisme azoté des bactéries lactiques **P09**

**I.7.** Aptitudes technologiques **P10**

**I.8.** Applications industrielles des bactéries lactiques **P12**

### **Chapitre II : Les probiotiques**

**II.1.** Historique de la définition des probiotiques **P13**

**II.2.** Les principales espèces des bactéries lactiques à potentiel probiotique **P13**

**II.3.** Propriétés et critères de sélection des souches probiotiques **P14**

**II.4.** Applications industrielles des bactéries lactiques **P15**

**II.5.** Définition de l'activité antagoniste **P15**

**II.6.** Nature des substances antagonistes **P16**

<b>I.6.1. Substances non protéiques</b>	<b>P16</b>
<b>II.6.1.1. Les acides organiques</b>	<b>P16</b>
<b>II.6.1.2. Les acides antibiotiques</b>	<b>P17</b>
<b>II.6.1.3. Le peroxyde d'hydrogène et l'ion superoxyde</b>	<b>P17</b>
<b>II.6.1.4. Le dioxyde de carbone CO<sub>2</sub></b>	<b>P17</b>
<b>II.6.1.5. Le diacétyle et l'acétaldéhyde</b>	<b>P18</b>
<b>II.6.1.6. Spectre d'action antagoniste des substances non protéiques</b>	<b>P18</b>
<b>II.6.2. Les substances protéiques (bactériocines)</b>	<b>P18</b>
<b>II.7. La résistance à l'acidité gastrique</b>	<b>P19</b>
<b>II.7.1. La résistance aux sels biliaires</b>	<b>P19</b>
<b>II.7.2. L'adhésion aux cellules épithéliales</b>	<b>P19</b>
<b>II.7.3. Résistance aux antibiotiques</b>	<b>P20</b>
<b>II.7.4. Critères technologiques</b>	<b>P20</b>
<b>Chapitre III : Matériels et méthodes</b>	
<b>III .1. Matériels</b>	
<b>III .1.1. Présentation du lieu de l'étude expérimental</b>	<b>P21</b>
<b>III .1.2. Matériels expérimentales</b>	<b>P21</b>
<b>III .1.2.1. Les souches bactériennes</b>	<b>P21</b>
<b>III .1.2.1.1.les souches lactiques</b>	<b>P21</b>
<b>III .1.2.1.2. Les souches pathogènes</b>	<b>P25</b>
<b>III.1.3. Les milieux de culture</b>	<b>P25</b>
<b>III .1.4. Appareillage</b>	<b>P25</b>
<b>III .1.5. Réactifs et solutions</b>	<b>P26</b>
<b>III .1.6. Verrerie et petit matériel</b>	<b>P26</b>
<b>III .2. Méthodologie utilisée</b>	
<b>III .2.1. Isolement et identification des souches lactiques</b>	<b>P27</b>
<b>III .2.2. Identification des isolats</b>	
<b>III .2.2.1. Caractérisation Phénotypique</b>	<b>P27</b>
<b>III .2.2.1.1. Caractérisation morphologique</b>	<b>P27</b>
<b>III .2.2.1.1.1. Examen macroscopique</b>	<b>P28</b>
<b>III .2.2.1.1.2. Examen microscopique</b>	<b>P28</b>
<b>III .2.2.2. Technique de préparation des frottis</b>	<b>P29</b>
<b>III .2.2.2.1. Caractérisation biochimique et physiologique</b>	<b>P31</b>

<b>III .2.2.2.1.1.</b> Recherche de la catalase	<b>P31</b>
<b>III .2.3.</b> Conservation des souches	<b>P31</b>
<b>III.2.4.</b> La cinétique de croissance des souches expérimentales	<b>P32</b>
<b>III.2.5.</b> Pouvoir antibactérien des souches	<b>P32</b>
<b>III .2.5.1.</b> Préparation de l'inoculum	<b>P32</b>
<b>III .2 .6.</b> Méthode des puits ADT (Agar well Diffusion Test)	<b>P32</b>
<b>III.2.7.</b> Croissance sur milieu NaCl	<b>P34</b>
<b>III .2.8.</b> Croissance au milieu pH	<b>P34</b>
<b>Chapitre IV : Résultats et discussion</b>	
<b>IV.1.</b> Isolement des bactéries lactiques	<b>P35</b>
<b>IV.2.</b> Identification des genres	<b>P35</b>
<b>IV.2.1.</b> Examen macroscopique	<b>P35</b>
<b>IV.2.2.</b> Examen microscopique	<b>P37</b>
<b>IV.3.</b> Les Courbes de croissances pour les souches lactiques	<b>P42</b>
<b>IV.4.</b> Résultats d'antagonisme	<b>P45</b>
<b>IV.4.1.</b> Méthode des puits ADT (Agar Well Diffusion Test)	<b>P45</b>
<b>IV.4.2.</b> Méthode des puits ADT (Agar Well Diffusion Test) (Surnageant non neutralisé)	<b>P47</b>
<b>IV.4.3.</b> Méthode des puits ADT (Agar Well Diffusion Test) (Surnageant neutralisé)	<b>P50</b>
<b>IV.5.</b> Survie des bactéries dans les conditions extrêmes	
<b>IV.5.1.</b> Résistance à l'acidité	<b>P51</b>
<b>IV.5.2.</b> Résultats de Nacl	<b>P53</b>
Conclusion	<b>P54</b>
Références bibliographique	
Annexe	

## *Liste des abréviations*

### **Noms de genres bactériens**

*B.* : *Bacillus*

*Bf.* *Bifidobacterium*

*E.*: *Escherichia*

*En.* : *Enterococcus*

### **Autres abréviations**

**ADH** : Arginine Dihydrolase

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique

**ARN** : Acide RiboNucléique

**ARNr** : Acide Ribonucléique Ribosomique

**ATCC**: American Type Culture Collection

**ATP**: Adénosine triphosphate

**BI** : bacterie lactique

**DO** : Densité Optique

**EPS**: Exopolysaccharides

**FAO**: Food and Agriculture Organization

**FAO**: Food and Agriculture Organization

**G+C**: Guanine + Cytosine

**GRAS**: Generally Regarded As Safe

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**: eau oxygénée.

**MRS** : de Man-Rogosa et Sharp

**OGA** : Gélose glucose à l'oxytétracyclique

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**PH** : Potentiel d'Hydrogène

**sp.** : Espèce non précisée

**ssp.** : Sous espèce

**TCA** : Acide Trichloroacétique

**UFC** : Unité Formant Colonie

**UFC** : Unité formant Colonies

### *Liste des tableaux*

**Tableau 01.** Les principales espèces de bactéries lactiques à activité probiotique **P14**

**Tableau 02.** La nature et l'origine de différentes souches lactiques utilisées **P21**

**Tableau 03.** Les différentes souches pathogènes utilisées **P25**

**Tableau 04.** Aspects macroscopiques et milieux d'isolement des souches **P36**

**Tableau05.** Résultats des tests catalase, coloration de Gram et aspects microscopiques de nos souches isolées. **P41**

**Tableau 06.** La croissance de nos cinq souches sur un milieu acidifié **P52**

**Tableau 07.** La résistance de nos cinq souches sur un milieu NaCl **P53**

### *Listes des figures*

**Figure 01.** Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des associés, obtenu par analyse des ARNr 16S **P03**

**Figure 02 .**Voies fermentaires de la dégradation du glucose **P08**

**Figure 03.** Schéma du système protéolytique de *Lactococcus lactis* **P10**

**Figure 04.** Dénombrement de la flore lactique sur le milieu MRS à 37°C **P35**

**Figure 05 :** répartition des souches lactiques isolées **P41**

**Figure 06.** Courbes de croissances pour nos vingt-huit souches lactiques **P44**

**Figure 07.** Résultats de l'effet antagoniste des bactéries lactiques vis-à-vis des bactéries pathogènes comme des indicateurs selon la méthode des puits **P46**

**Figure 08.** Variation des diamètres des zones d'inhibition de trois souches lactiques et de témoin positif Vis-à-vis de quelques bactéries pathogènes selon la méthode des puits **P47**

**Figure 09 .**Variation des diamètres des zones d'inhibition de cinq souches lactiques et de témoin positif Vis-à-Vis de quelques bactéries pathogènes selon la méthode des puits (Surnageant non neutralisé). **P48**

**Figure 10 :** Résultats de l'effet antagoniste des bactéries lactiques vis-à-vis des bactéries pathogènes comme des indicateurs selon la méthode des puits (Surnageant non neutralisé). **P49**

**Figure11.** Variation des diamètres des zones d'inhibition de cinq souches lactiques positif Vis-à-vis de quelques bactéries pathogènes selon la méthode des puits (Surnageant neutraliser).

**P50**

**Figure 12.** Courbes de résistances en ph pour nos cinq souches lactiques

**P52**

### Introduction

Les bactéries lactiques (BL) sont des bactéries à Gram positif qui produisent de l'acide lactique comme produit principal de leur métabolisme. Elles regroupent 12 genres bactériens dont les plus étudiés sont *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* et *Bifidobacterium* (Stackebrandt et Teuber, 1988). Les BL sont largement utilisées dans des procédés industriels de fermentation agro-alimentaire et certains genres comme les lactobacilles ou les bifidobactéries sont des bactéries commensales qui font partie du microbiote intestinal (Mater et Corthier, 2004).

Les BL sont généralement reconnues comme étant sans danger par les autorités (microorganismes Generally Recognized As Safe) (Gilliland, 1990). Lorsqu'elles sont ingérées vivantes en grandes quantités, elles peuvent survivre dans le tractus digestif de l'hôte, où elles sont susceptibles d'exercer diverses actions bénéfiques sur l'hôte après leur ingestion (ex. amélioration de la digestion des fibres, stimulation du système immunitaire et prévention ou traitement des diarrhées) (Ljungh et Wadström, 2006).

Du fait de leur parfaite innocuité et de leurs effets probiotiques (pour certaines). Notre présente étude répond à la nécessité d'avoir une banque de données sur un des patrimoines nationale, les bactéries lactiques isolées a partir de produit naturels. A travers cette étude, nous allons mettre en place une collection de souches de bactéries lactiques indigènes ayant une application dans l'industrie alimentaire et, déterminer alors leurs propriétés technologiques et probiotiques.

## **Chapitre I : Bactéries lactiques**

### **I.1. Présentation des bactéries lactiques**

Décrites pour la première fois par Orla-Jensen au début du XXe siècle, les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène, qui n'est pas clairement défini du point de vue taxonomique.

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, CO<sub>2</sub> ...etc.) (Leveau et Bouix, 1993 ; Pilet et al., 2005).

Elles sont à Gram positif, généralement immobiles, asporulées, catalase négatives, oxydase négatives 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).

### **I.2. Habitat et origine des bactéries lactiques**

Les bactéries lactiques sont très fréquentes dans la nature. Elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples. Elles peuvent être isolées du lait, du fromage, de la viande, des végétaux ou des alimentsensemencés par les végétaux. Elles se développent avec la levure dans le vin, la bière et le pain. Quelques espèces colonisent le tube digestif de l'homme et des animaux (Leveau et Bouix, 1993 ; Hassan et Frank, 2001).

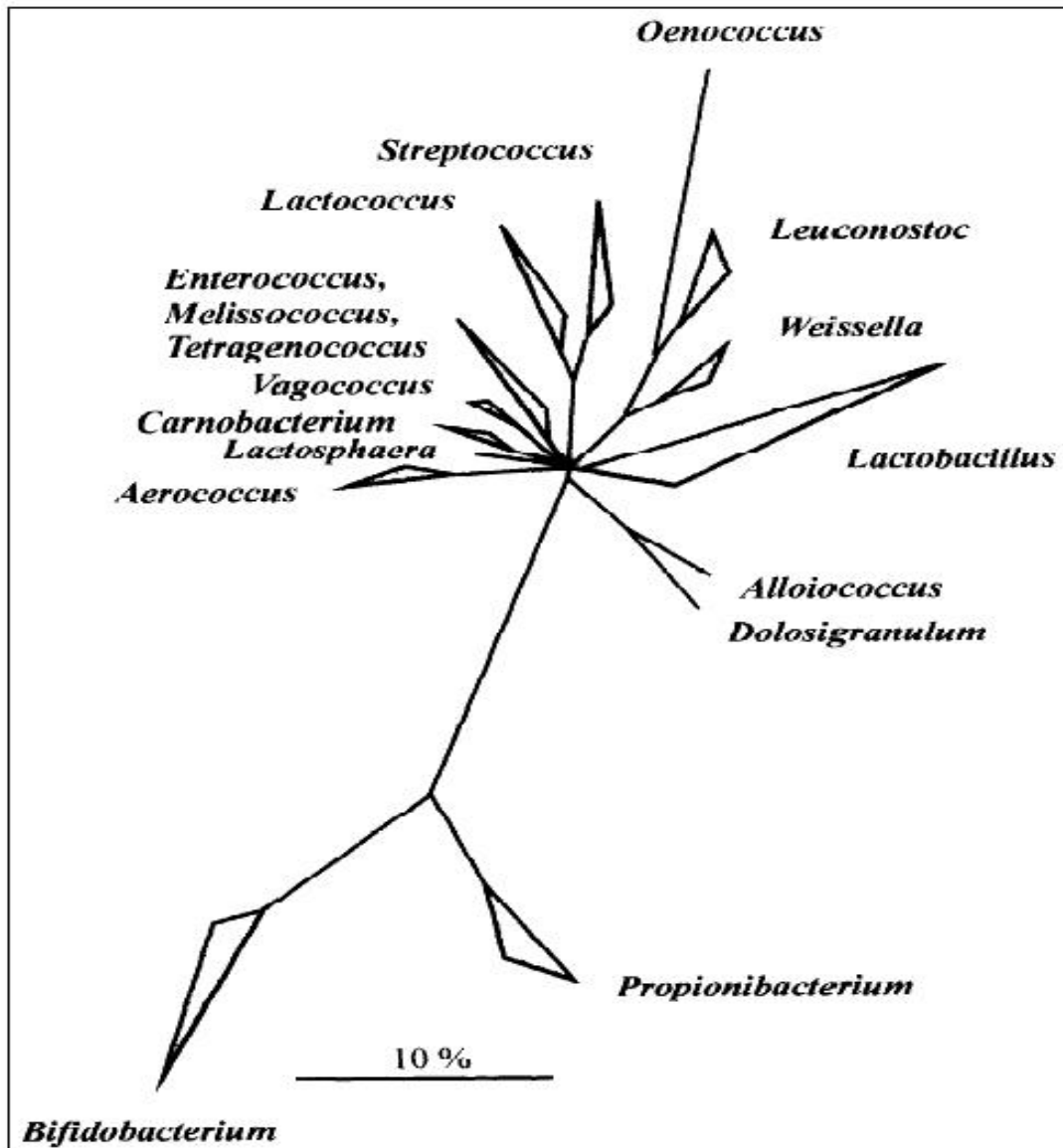
### **I.3. Taxonomie des bactéries lactiques**

Depuis la description du *Bacterium lactis* (actuellement *Lactococcus 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. Les réorganisations effectuées ont contribué à fusionner des espèces en une seule, ou identifier une espèce comme un nouveau genre (Pot, 2008).

La classification des bactéries lactiques peut se faire selon des critères phylogénétiques par l'utilisation des méthodes moléculaires. Cependant, la caractérisation phénotypique /biochimique classique demeure pratique dans l'identification préliminaire des microorganismes. Certaines caractéristiques phénotypiques sont utilisées pour identifier les espèces à l'intérieur des genres comme la capacité à : fermenter les hydrates de carbone, tolérer différentes concentrations en bile, produire des polysaccharides extracellulaires, exiger des facteurs de croissance, produire de l'acétoïne et synthétiser certaines enzymes. La composition en G+C de l'ADN, la composition en acides gras, la mobilité électrophorétique de la lactate déshydrogénase sont également d'autres critères qui peuvent être étudiés pour l'identification des espèces lactiques (Vandamme, 1996 ; Stiles et Holzopfel, 1997 ; Ho et al., 2007).

A ce groupe de bactéries lactiques, appartient plusieurs genres comme *Aerococcus*, *Atopobium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella*. (Stiles et Holzopfel, 1997 ; Pot, 2008). Des genres nouveaux, par exemple *Alloiococcus*, *Dolosicoccus*, *Dolosigranulum*, *Eremococcus*, *Facklamia*, *Globicatella*, *Helococcus*, *Ignavigranum* et *Lactosphaera*, ont également été décrits, comportant des souches qui montrent des liens physiologiques et phylogénétiques avec les groupe des bactéries lactiques (Broadbent, 2001 ; Axelsson, 2004).

Le genre *Bifidobacterium* est actuellement considéré par plusieurs auteurs comme genre de bactéries lactiques, bien qu'il se distingue par un pourcentage en G+C de 55%, largement supérieur à celui des autres genres et par une voie métabolique de fermentation des sucres particulière. Les études phylogénétiques basées sur l'analyse des séquences des ARN ribosomiques ont confirmé l'appartenance de ces différents genres à un même groupe qui inclut également *Clostridium*, *Bacillus* et *Propionibacterium* (figure 01) (Stiles et Holzopfel, 1997 ; Pilet et al., 2005).



**Figure 01** : Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres associés, obtenu par analyse des ARNr 16S (Stiles et Holzapfel, 1997).

## **I.4. Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques**

### **I.4.1. Le 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 nucléotides, en glucides et en minéraux (Khalid et Marth, 1990 ; Leclerc et al., 1994).

Le genre Lactobacillus a été subdivisé par Orla-Jensen en trois groupes et cette classification est encore utilisée en milieu industriel (Tamime, 2002 ; Guiraud et Rosec, 2004) :

**Groupe I** « Thermobacterium » : comprend les lactobacilles homofermentaires thermophiles qui se développent à 45°C mais pas à 15°C. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation (lait, yaourt, fromage) sont *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. acidophilus*.

**Groupe II** « Streptobacterium » : regroupe les lactobacilles homofermentaires mésophiles et peuvent être occasionnellement hétérofermentaires en fonction du substrat. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation sont *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. sake* et *Lb. plantarum*.

**Groupe III** « Betabacterium » : ce sont des lactobacilles hétérofermentaires. Il comporte les espèces *Lb. fermentum*, *Lb. brevis* et *Lb. sanfransisco*.

### **I.4.2. Le genre Lactococcus**

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

Les lactocoques se présentent sous forme de coques en paire ou en chaînes de longueur variable. Ce sont des bactéries anaérobies facultatives homofermentaires ne produisant que de l'acide lactique L(+), seul *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* produit le diacétyle. Leur température optimale de croissance est proche de 30°C, capable de se développer à 10°C mais pas à 45°C.

Quelques espèces produisent des exopolysaccharides et des bactériocines. Elles sont capables de se développer à 3% de bleu de méthylène et d'hydrolyser l'arginine (Tamime, 2002).

Actuellement, le genre *Lactococcus* comprend cinq espèces, *Lactococcus lactis* est l'espèce la plus connue avec ses trois sous-espèces : *Lc. lactis ssp. lactis*, *Lc. lactis ssp. cremoris* et *Lc. lactis ssp. hordniae* (Pot et al., 1996 ; Pot, 2008).

#### **I.4.3. Le genre *Streptococcus***

Le genre *Streptococcus* est toujours large et la classification est très mouvementée. Ce genre est généralement divisé en trois groupes : pyogène (la plus part des espèces pathogènes et hémolytiques), oral (tel que *St. salivarius*, *St. bovis*) et les autres streptocoques (Scheilfer, 1987).

La seule espèce de streptocoques qui soit utilisée en technologie alimentaire est *Streptococcus thermophilus* qui a été incluse dans le groupe des « autres streptocoques », mais ensuite transféré au groupe des streptocoques oraux à cause de leur degré d'homologie avec l'ADN de *Streptococcus salivarius* (Stiles et Holzapfel, 1997).

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

#### **I.4.4. Le genre *Enterococcus***

Ce genre regroupe les streptocoques fécaux qui représentent une hémolyse de type  $\lambda$  et  $\beta$  et qui appartiennent au groupe D. Ce sont des commensaux de l'intestin. Les espèces rencontrées dans l'alimentation sont essentiellement *En. faecalis* et les espèces proches. Les entérocoques sont des coques qui peuvent être mobiles, homofermentaires, généralement différenciés par la fermentation de l'arabinose et le sorbitol, ils croissent entre 10°C et 45°C (Tamime, 2002 ; Ho et al., 2007).

#### **I.4.5. Les genres *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella***

Ils ressemblent les coques lenticulaires en paires ou en chainettes mésophiles, qui possèdent un caractère hétérofermentaire marqué, avec production d'acide lactique (isomère D), de CO<sub>2</sub> et d'éthanol. Les caractéristiques telles que l'hydrolyse de l'esculine, la formation de dextrane, les conditions de croissance, la capacité à croître à différents pH et température, l'assimilation de citrate et/ou malate permettent la différenciation entre les genres *Leuconostoc* et *Weissella* (Pilet et al., 1998 ; Ho et al., 2007).

Actuellement, le genre *Leuconostoc* comprend quatorze espèces, ils sont également anaérobies facultatifs et exigeants au point de vue nutritionnel et leur croissance est toujours lente. Le développement des leuconostoc entraîne souvent l'apparition d'une viscosité dans le milieu grâce à la production des 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 CO<sub>2</sub>, des substances aromatiques telles que le diacétyle et l'acétoïne à partir des citrates du lait (Hassan et Frank, 2001 ; Guiraud, 2003 ; 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).

#### **I.4.6. Les genres *Pediococcus* et *Tetragenococcus***

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

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

#### **I.4.7. Le genre Bifidobacterium**

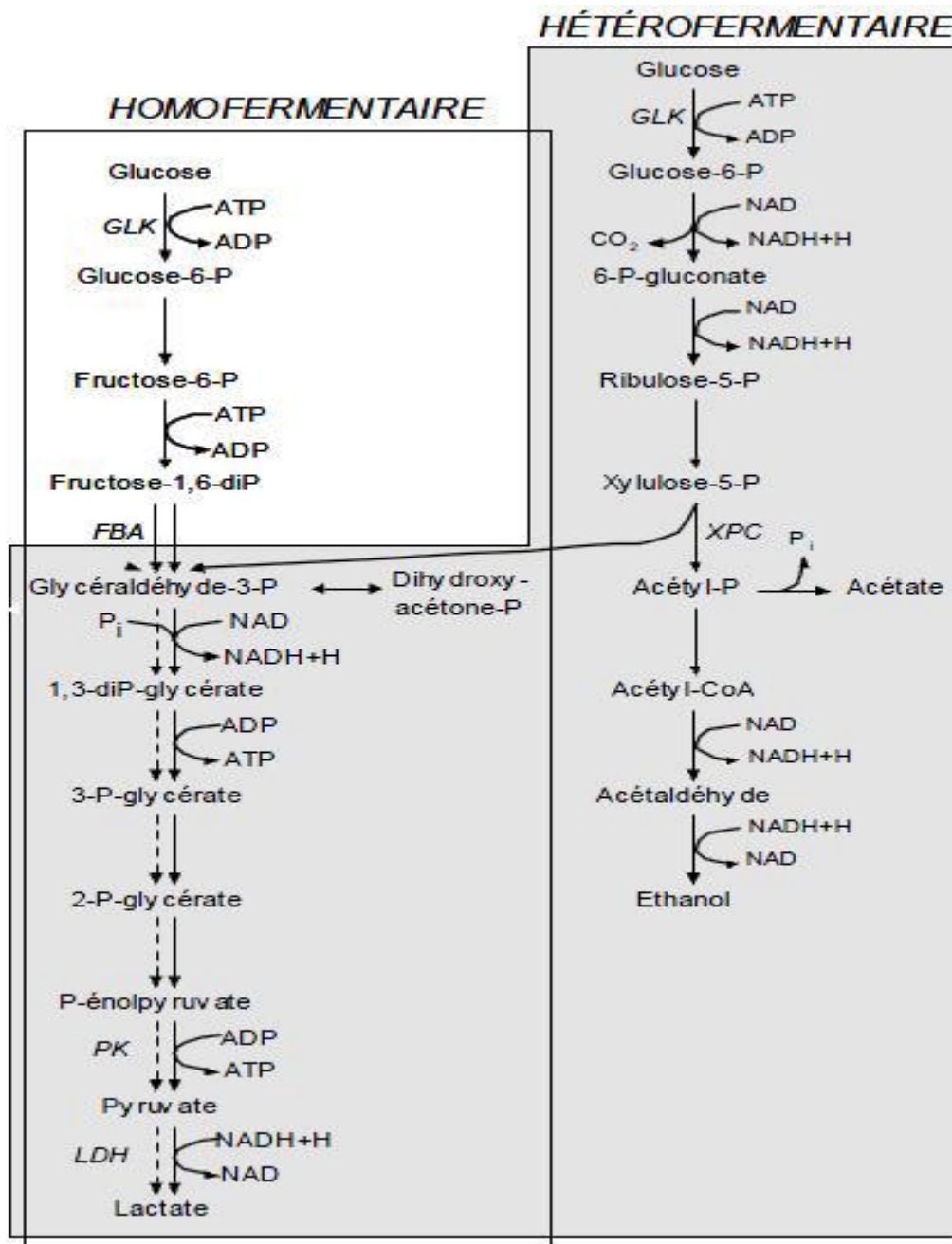
Le genre Bifidobacterium est considéré comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques grâce à la similarité de ses propriétés physiologiques et biochimiques et à sa présence dans le même habitat écologique, tel que le tube gastro-intestinal. Ces microorganismes sont phylogénétiquement sans rapport avec ces dernières. Ils sont davantage liés au phylum Actinobacteria (anciennement Actinomycètes) des bactéries Gram positif dont l'ADN est à haut pourcentage de G +C. Les bifidobactéries se caractérisent par leur forme très irrégulière souvent en forme V mais pouvant être coccoïdes, la présence d'une enzyme, la fructose-6-phosphate phosphocétolase, celle-ci leur permet de fermenter les hexoses en produisant de l'acide acétique et de l'acide lactique. Leur température de croissance varie de 36°C à 43°C (Axelsson *et al.*, 2004 ; Pilet *et al.*, 2005 ; Ho *et al.*, 2007).

#### **I.5. Principales voies fermentaires des bactéries lactiques**

Toute croissance nécessite la production d'énergie et les bactéries lactiques ne font pas exception à la règle. Hétérotrophes, elles tirent leur énergie de la fermentation de substrats carbonés. Les carbohydrates fermentés en acide lactique par les bactéries lactiques peuvent être des monosaccharides tels que des hexoses (glucose, galactose), des pentoses (xylose, ribose, arabinose), hexitols et pentitols (mannitol, sorbitol, xylitol) ou des disaccarides (lactose, saccharose, cellobiose, tréhalose). La fermentation des sucres s'effectue essentiellement en trois étapes (Atlan *et al.*, 2008) :

- le transport du sucre à travers la membrane cellulaire ;
- le catabolisme intracellulaire du sucre ;
- formation et expulsion extracellulaire des métabolites terminaux.

Selon les genres ou espèces, les bactéries lactiques utilisent principalement l'une des deux voies majeures du métabolisme des sucres (figure 02). Il s'agit des voies homofermentaire (Embden- Meyerhof-Parnas, EMP) et hétérofermentaire (voie des pentoses-phosphate) (Atlan *et al.*, 2008).



**Figure 02 :** Voies fermentaires de la dégradation du glucose (Atlan et al., 2008).

[GLK : glucokinase, FBA : fructose-1,6- biphosphate aldolase, XPC : xylulose-5-phosphate phosphocétolase, PK : pyruvate kinase, LDH : lactate déshydrogénase].

### **I.5.1. Voie homofermentaire ou EMP**

Les bactéries lactiques homofermentaires comprennent les espèces de lactocoques, pedicocoques, ainsi que certains lactobacilles. Cette voie conduit dans des conditions optimales de croissance à la production de deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP par molécule de glucose consommée. La fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBA) est une enzyme clé indispensable au fonctionnement de la voie EMP (Thompson et Gentry-Weeks, 1994).

### **I.5.2. Voie hétérofermentaire ou voie des pentoses phosphate**

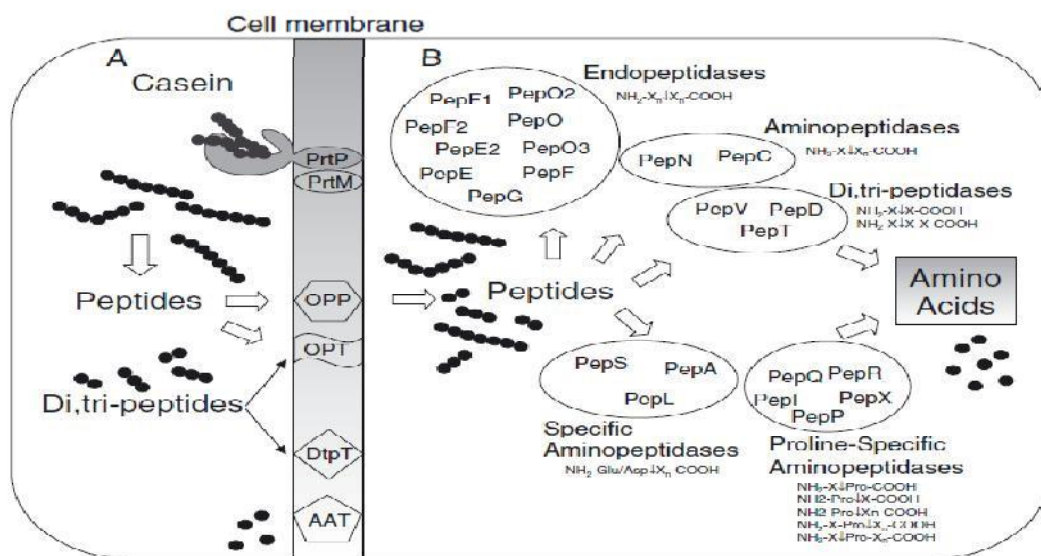
Les bactéries lactiques qui fermentent le glucose en produisant, en plus de l'acide lactique, de l'acétate, de l'éthanol et du CO<sub>2</sub> sont dites hétérofermentaires. Les groupes principaux de bactéries présentant ce type de métabolisme sont les leuconostoc et certains lactobacilles. Ces microorganismes sont dépourvus d'une FBA et le système de transport PTS (Thompson et Gentry-Weeks, 1994).

### **I.6. Métabolisme azoté des bactéries lactiques**

De fait de leurs nombreuses auxotrophies pour les acides aminés, la croissance des bactéries lactiques repose sur leur système protéolytique. Ces systèmes comportent des protéases intracellulaires, des systèmes de transport spécifiques pour les peptides et une multitude de peptidases intracellulaires. Les systèmes protéiques des lactocoques et des lactobacilles sont remarquablement similaires, en ce qui concerne leurs composants et leurs modes d'action (Law et Haandrikman, 1997 ; Savijoki et al., 2006).

Les études du système protéolytique ont été menées essentiellement pour le genre *Lactococcus* et ont permis l'établissement d'un modèle de la protéolyse en trois étapes (figure 03) : la première étape fait intervenir une protéase ancrée à la surface bactérienne, appelée protéase de paroi (ou PrtP). Les peptides sont pris en charge par deux systèmes de transport des oligopeptides (Opp et Opt) pour traverser l'enveloppe bactérienne. Des di et tripeptides peuvent aussi être transportés par deux autres systèmes (DtpT et Opt). Les acides aminés sont transportés par des systèmes de transport spécifiques. Enfin, dans le cytoplasme bactérien un éventail de peptidases concourent à achever l'hydrolyse des peptides en acides aminés (Savijoki et al., 2006 ; Atlan et al., 2008 ; Picon et al., 2010).

Le catabolisme des acides aminés est une voie majeure de formation de molécules aromatiques (alcool, aldéhydes, acides organiques, ...), comme il peut être une source d'énergie pour certaines bactéries lactiques en cas de limitation en nutriments (Williams et al., 2001).



**Figure 03** : Schéma du système protéolytique de *Lactococcus lactis* (Atlan et al., 2008).

## I.7. Aptitudes technologiques

### a. Aptitude acidifiante

La fonction acidifiante constitue la propriété métabolique la plus recherchée des bactéries lactiques utilisées dans les industries alimentaires. Elle se manifeste par la production de l'acide lactique à partir de la fermentation des hydrates de carbone au cours de la croissance bactérienne (Mäyrä- Mäkinen et Bigret, 2004 ; Monnet et al., 2008).

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

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

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

### **b. Aptitude protéolytique**

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

### **c. Aptitude lipolytique**

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

D'une manière générale on distingue les estérases qui hydrolysent de façon préférentielle les esters formés avec les acides gras à chaîne courte (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) et les lipases qui sont actives sur des substrats émulsifiés contenant des acides gras à chaîne longue (>C<sub>8</sub>), ces enzymes sont impliquées dans l'hydrolyse de mono, di, et triglycérides (Béal *et al.*, 2008 ; Serhan *et al.*, 2009).

### **d. 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-butanediol, 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).

### **e. Aptitude texturante**

La capacité des bactéries lactiques à synthétiser des exopolysaccharides (EPS) joue un rôle important pour la consistance et la rhéologie des produits transformés. Les *Lb. delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* produisant des EPS sont utilisés dans la fabrication des yaourts, ceci afin d'améliorer la texture, éviter la synérèse et augmenter la viscosité des produits finis. L'utilisation des EPS produits par les souches *Lc. lactis* ssp. *cremoris* est très prometteuse pour la structure et la viscosité des produits laitiers fermentés (Leroy et De Vuyst, 2004 ; Ho et al., 2007).

### **I.8. Applications industrielles des bactéries lactiques**

Les bactéries lactiques présentent des activités métaboliques assez diversifiées et une capacité d'adaptation à différents environnements. Cette diversité est responsable de leur large gamme d'applications à l'échelle industrielle (Streit et al., 2007).

Dans l'industrie alimentaire, ces microorganismes permettent la conversion d'une grande variété de matières premières, conduisant ainsi à de nombreux produits : les saucissons, les laits fermentés, les fromages, les olives fermentés et certains vins. Parmi ces applications, l'industrie laitière est, sans doute, le plus grand utilisateur de ferments lactiques commerciaux (Axelsson, 2004 ; Streit et al., 2007).

Les bactéries lactiques sont également utilisées dans l'industrie chimique (production d'acide lactique), dans le domaine médical (notamment pour le traitement de dysfonctionnements intestinaux) et dans l'industrie des additifs alimentaires (production d'exopolysaccharides). Elles sont aussi utilisées pour la production de bactériocines et des protéines thérapeutiques (Rodriguez et al., 2003).

## **Chapitre II : Les probiotiques**

### **II.1. Historique de la définition des probiotiques**

Le terme probiotique a bénéficié de plusieurs définitions qui ont évolué dans le temps en fonction des connaissances scientifiques et des avancées technologiques. La notion de probiotiques a été développée principalement grâce aux travaux de Metchnikoff ayant suggéré que l'ingestion de bactéries lactiques vivantes accroît la longévité en réduisant dans le tube digestif la population de bactéries putréfiantes ou produisant des toxines. Une des premières définitions des probiotiques comme « facteurs promoteurs de croissance produits par des microorganismes » a été proposée par Lilly et Stillwell en 1965. Depuis ce temps, la définition du terme probiotique a été modifiée à plusieurs reprises (Lamoureux, 2000 ; Ait-Belgnaoui et al., 2005).

En 1989, **Roy Fuller** a mis l'accent sur la demande de viabilité des probiotiques et introduisit l'idée qu'ils avaient un effet bénéfique sur l'hôte (Guarner et al., 2008). La **FAO** et l'**OMS (2002)**, ont établi récemment des lignes directrices pour l'utilisation du terme « probiotiques » dans les aliments et formulent la définition suivante : « *les probiotiques sont des microorganismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, exercent une action bénéfique sur la santé de l'hôte qui les ingère* ».

### **II.2. Les principales espèces des bactéries lactiques à potentiel probiotique**

Les espèces les plus fréquentes et les plus rapportées dans la littérature sont du genre *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*, mais il faut aussi mentionner des souches du genre *Enterococcus* et *Streptococcus* (Gbassi et al., 2011 ; Rokka et Rantamaki, 2010). Les principales espèces de bactéries lactiques à activité probiotiques sont répertoriées dans le tableau N° 01.

**Tableau 01** : Les principales espèces de bactéries lactiques à activité probiotique (Shah, 2007).

<b>Espèces de Lactobacillus</b>		
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. gasseri</i>	<i>Lb. paracasei</i>
<i>Lb. amylovorus</i>	<i>Lb. johnsonni</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>
<i>Lb. crispatus</i>	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. plantarum</i>
<b>Espèces de Bifidobacterium</b>		
<i>Bf. lactis</i>	<i>Bf. animalis</i>	<i>Bf. infantis</i>
<i>Bf. longum</i>	<i>Bf. bifidum</i>	<i>Bf. Breve</i>
<i>Bf. adolescentis</i>		
<b>Autres bactéries lactiques</b>		
<i>Lc. lactis</i>	<i>St. diacetylactis</i>	<i>En. faecalis</i>
<i>Ln. mesenteroides</i>	<i>St. intermedius</i>	<i>En. faecium</i>
<i>P. acidilactici</i>	<i>St. thermophilus</i>	

### II.3. Propriétés et critères de sélection des souches probiotiques

Les probiotiques présentent des propriétés qui sont variables selon l'espèce ou la souche microbienne. Il est nécessaire de connaître le genre et l'espèce de la souche utilisée car les effets probiotiques sont spécifiques à la souche microbienne.

La non pathogénicité (innocuité) des souches est un critère très important, les souches ayant le statut GRAS (Generally Regarded As Safe) sont d'ailleurs à favoriser. Toutefois, le critère de viabilité ou de survie demeure essentiel dans la sélection des probiotiques qui doivent parvenir vivantes au site de leur action, à savoir l'intestin, et donc résister aux différents mécanismes de défense de l'hôte. Les bactéries étant administrées par voie orale, il faut qu'elles franchissent les obstacles majeurs du transit digestif : le pH acide, les sels biliaires, les enzymes pancréatiques...etc (Percival, 1997 ; Lamoureux, 2000 ; Millette et al., 2008).

## **II.4. Applications industrielles des bactéries lactiques**

Les bactéries lactiques présentent des activités métaboliques assez diversifiées et une capacité d'adaptation à différents environnements. Cette diversité est responsable de leur large gamme d'applications à l'échelle industrielle (Streit *et al.*, 2007).

Dans l'industrie alimentaire, ces microorganismes permettent la conversion d'une grande variété de matières premières, conduisant ainsi à de nombreux produits : les saucissons, les laits fermentés, les fromages, les olives fermentés et certains vins. Parmi ces applications, l'industrie laitière est, sans doute, le plus grand utilisateur de ferments lactiques commerciaux (Axelsson, 2004 ; Streit *et al.*, 2007).

Les bactéries lactiques sont également utilisées dans l'industrie chimique (production d'acide lactique), dans le domaine médical (notamment pour le traitement de dysfonctionnements intestinaux) et dans l'industrie des additifs alimentaires (production d'exopolysaccharides). Elles sont aussi utilisées pour la production de bactériocines et des protéines thérapeutiques (Rodriguez *et al.*, 2003).

## **II.5. Définition de l'activité antagoniste**

Les métabolites bactériens à activité antagoniste représentent un moyen de défense propre aux bactéries qui leur permettent d'inhiber la croissance des autres microorganismes qui se trouvent en compétition avec elle sur le plan nutritionnel et spatial de croissance. Ces métabolites sont des substances issues du métabolisme bactérien, elles sont actives sur certaines bactéries par inhibition de leur croissance ou par destruction totale de leurs cellules. Ces moyens de défense inhibiteurs peuvent être à la fois bénéfiques et nuisibles à la santé de l'hôte, mais ils contribuent à la maintenance de l'équilibre de la flore intestinale (Klaenhammer, 1993).

Les activités antimicrobiennes peuvent être dues à la production de certains métabolites comme (Drider, 2006) :

- Peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- Dioxyde de carbone CO<sub>2</sub>.
- Acides organiques.
- Agents antimicrobiens (antibiotique).

## **II.6. Nature des substances antagonistes**

Elles sont divisées en deux groupes : les substances non protéiques et les substances Protéiques.

### **II.6.1. Substances non protéiques**

Les bactéries peuvent synthétiser des substances antagonistes non protéique pouvant être des acides organiques, du peroxyde d'hydrogène, l'ion superoxyde d'hydrogène ou des antibiotiques (Klaenhammer *et al.*, 1994) .

#### **II.6.1.1. Les acides organiques**

Les acides lactiques et acétique excrétés par ces bactéries sont les principaux accepteurs d'électrons et représentent **les** produits terminaux du métabolisme fermentaire. Ces acides organiques assurent deux importantes fonctions antimicrobiennes.

Sous leur forme indissociée, ils traversent passivement la membrane cytoplasmique et, pour de forte concentration d'acide, le milieu intracellulaire peut s'acidifier à un point tel que les fonctions cellulaires sont inhibées et le potentiel membranaire annulé (Kashet, 1987, cité par Klaenhammer *et al.*, 1994).

Ainsi, l'accumulation d'acides organiques inhibe directement les microorganismes nuisibles ayant un seuil bas de résistance aux changements de pH intracellulaire.

Les acides organiques les plus synthétisées par les bactéries lactiques et les bifidobactéries sont les acides lactique et acétique. C'est la forme moléculaire non dissociée de l'acide lactique qui est le facteur toxique pour les bactéries pathogènes. Cette forme diffuse librement dans la cellule ou elle s'ionise, ce qui entraîne une diminution du pH interne et, par conséquent, le blocage de certains mécanismes de transport (Klaenhammer *et al.*, 1994).

Il faut noter que l'acide acétique est nettement plus toxique, et que les bifidobactéries sont réputées pour leur plus forte production d'acide acétique par rapport à l'acide lactique (Gibson et Roberfroid, 1995).

Par ailleurs, en condition acide, la compétitivité des bactéries lactique et des bifidobactéries se trouve améliorée étant donné leur plus grande tolérance aux bas pH extra et intracellulaires. Les effets antimicrobiens dus à l'acidification du milieu revêtent donc une importance capitale dans le processus de conservation des aliments fermentés par ces bactéries (Klaenhammer *et al.*, 1994).

#### **II.6.1.2. Les acides antibiotiques**

Plusieurs bactéries sont capables de synthétiser des antibiotiques qui représentent un moyen très efficace dans la défense contre les agressions microbiennes.

La production d'antibiotiques constitue un thème courant dans la littérature ayant trait aux bactéries lactiques (Babel, 1977, cité par Klaenhammer *et al.*, 1994). Lorsqu'un antagonisme induit par des cultures bactériennes ne peut être attribué aux acides organiques, au peroxyde d'hydrogène ou aux bactériocines, il est généralement attribué à un antibiotique (Talarico *et al.* 1990).

#### **II.6.1.3. Le peroxyde d'hydrogène et l'ion superoxyde**

Les bactéries lactiques et les bifidobactéries sont catalase-négatives et certaines souches peuvent accumuler du peroxyde d'hydrogène lorsqu'elles sont cultivées en aérobiose ou en microaérobiose. La production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut avoir lieu selon plusieurs modes, mettant en jeu des oxydases (Daeschel, 1989 ; Condon, 1987) et probablement une superoxyde-dismutase (Condon, 1987).

Le niveau d'accumulation d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varie selon la souche bactérienne. L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut être auto-inhibiteur et révéler une activité plus intense des réactions génératrices de peroxyde d'hydrogène par rapport aux réactions peroxydasiques provoquant son élimination (Condon, 1987).

Le peroxyde d'hydrogène est, depuis longtemps, reconnu comme un agent majeur de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques en particulier celle des lactobacilles. (Price et Lee, 1970, cité par Klaenhammer *et al.*, 1994).

#### **II.6.1.4. Le dioxyde de carbone CO<sub>2</sub>**

Le dioxyde de carbone exerce également une action inhibitrice sur plusieurs bactéries, cette action est non spécifique, et en présence des autres substances inhibitrices elle contribue à amplifier l'action inhibitrice globale (Drider, 2006).

### **II.6.1.5. Le diacétyle et l'acétaldéhyde**

Le diacétyle et l'acétaldéhyde sont produits par de nombreuses bactéries lactiques, ce sont des inhibiteurs non spécifiques qui accentuent l'action antagoniste en milieu acide. Les bactéries à gram négatif sont plus sensibles que celles à gram positif (Rama Devi et Polasa, 1985, cités par Bourgeois et Larpent, 1989).

### **II.6.1.6. Spectre d'action antagoniste des substances non protéiques**

Concernant le peroxyde d'hydrogène et le superoxyde, leur action est limitée sur les microorganismes à catalase et peroxydase négatives, et c'est ce qui est généralement le cas des anaérobies stricts. Par contre les antibiotiques agissent à des niveaux différents selon l'antibiotique en question, cette action peut être à spectre large ou étroit.

L'action des acides organiques est exercée surtout sur les microorganismes qui se développent à des pH non acides (Klaenhammer *et al.*, 1994).

### **II.6.2. Les substances protéiques (bactériocines)**

L'homme utilise depuis longtemps, consciemment ou non, les propriétés antibactériennes des bactéries lactiques. Ces propriétés sont avérées être intéressantes pour la conservation des aliments dans lesquels cette flore se développe. Les bactéries lactiques inhibent le développement de certains micro-organismes grâce à la synthèse de molécules antibactériennes parmi lesquelles se trouvent les bactériocines (Jasniewski, 2008).

Le terme « bactériocine » a été proposé par Jacob et collaborateurs en 1953 pour désigner les protéines et peptides antimicrobiens synthétisés selon la voie ribosomique (Morisset, 2003).

Plus précisément, Les bactériocines sont définies comme des molécules sécrétées par les bactéries, de nature protéique ou partiellement protéique et douées d'une activité antagoniste vis-à-vis de souches phylo-génétiquement proches des souches productrices. Leur synthèse par voie ribosomique les différencie des antibiotiques de nature peptidique provenant de l'assemblage enzymatique d'acides aminés libres (Morisset, 2003).

Elles sont inactivées par les protéases et sont thermostables (Labioui *et al.*, 2005). Parmi leurs caractéristiques communes, ces molécules sont synthétisées dans la cellule sous forme de polypeptides ou de précurseurs de polypeptides, qui subiront un processus de maturation au cours de leur transport vers le milieu extérieur. Le spectre d'activité est plus ou moins large, quelques fois limité aux espèces phylo-génétiquement proches des bactéries productrices (Sebti, 2002).

## **II.7. La résistance à l'acidité gastrique**

La survie des bactéries dans le suc gastrique dépend de leur capacité à tolérer les bas pH. Le temps de passage peut être d'une heure à quatre heures selon l'individu et son régime. Par conséquent, quelques auteurs proposent que les souches probiotiques doivent résister à un pH de 2.5 dans un milieu de culture pendant quatre heures (Ammor et Mayo, 2007).

### **II.7.1. La résistance aux sels biliaries**

Dans l'intestin grêle, la tolérance aux sels biliaries est un facteur important qui contribue à la survie des probiotiques. Les bactéries qui survivent aux conditions acides de l'estomac doivent alors faire face à l'action détergente des sels biliaries libérés dans le duodénum après ingestion des repas gras. Les bactéries peuvent réduire l'effet émulsifiant des sels biliaries en les hydrolysant avec des hydrolases, de ce fait diminuant leur solubilité (Ammor et Mayo, 2007 ; Gu *et al.*, 2008).

### **II.7.2. L'adhésion aux cellules épithéliales**

La capacité d'adhésion à la couche intestinale est un critère de sélection recommandé pour le choix des probiotiques, parce que c'est une condition pour la colonisation des entrailles. L'adhérence constitue le premier mécanisme de défense contre l'invasion des bactéries pathogènes. Elle est basée sur la réalisation d'un ensemble de tests *in vitro* puis *in vivo* en utilisant des cellules d'origine animale et/ou humaine (Palomares *et al.*, 2007 ; Reyes-Gavilan *et al.*, 2011).

En plus du pouvoir d'adhésion aux cellules épithéliales de l'intestin, les probiotiques peuvent se fixer au mucus qui recouvre les entérocytes ou aux divers microorganismes que l'on retrouve dans le tractus gastro-intestinal (Lamoureux, 2000).

### **II.7.3. Résistance aux antibiotiques**

Les bactéries lactiques sont naturellement résistantes à beaucoup d'antibiotiques grâce à leur structure et physiologie. Les travaux de [Temmerman et al. \(2003\)](#) ont montré que 68.4% des probiotiques isolés ont une résistance à un antibiotique ou plus. Des souches de *Lactobacillus* ont été trouvées résistantes à la kanamycine (81%), à la tétracycline (29.5%), à l'érythromycine (12%) et au chloramphénicol (8.5%). 38% des isolats de *Enterococcus faecium* ont été trouvés résistants à la vanomycine.

Dans la plus part des cas la résistance n'est pas transmissible, cependant, il est possible que le plasmide codant pour la résistance aux antibiotiques soit transféré à d'autre espèces et genre. C'est une raison significative pour choisir des souches manquantes du potentiel de transfert de résistance ([Denohue, 2004](#)).

Les autorités européennes ont récemment conclu que quelques bactéries utilisées pour la production d'aliment pourraient poser un risque à la santé humaine et animale en raison d'héberger des souches avec les gènes de résistance transmissibles. Par conséquent, avant de lancer une culture probiotique, il est important de vérifier que les souches bactériennes impliquées ne comportent pas de gènes transmissibles de résistance aux antibiotiques ([Ammor et Mayo, 2007](#)).

### **II.7.4. Critères technologiques**

En plus de l'innocuité et des propriétés fonctionnelles, des critères technologiques sont également pris en considération dans la sélection des souches probiotiques. Selon [Saarela et al. \(2000\)](#), ces critères sont :

- Bonnes propriétés sensorielles ;
- Résistance aux phages ;
- Viabilité durant le traitement technologique.

## Chapitre III : Matériels et méthodes

### III .1. Matériels

#### L'objectif :

Isolements des souches lactiques et l'étude de quelques aptitudes technologiques et leurs antagonismes vis-à-vis de quelques souches pathogènes.

#### III .1.1. Présentation du lieu de l'étude expérimental

Notre étude expérimentale a été réalisée au niveau de laboratoire de sécurité alimentaire et santé (LMBAFS) de Mostaganem

#### III .1.2. Matériels expérimentales

##### III .1.2.1. Les souches bactériennes

##### III .1.2.1.1.les souches lactiques

Les différentes souches utilisées ont été isolées à partir de différents produits laitiers traditionnels et ils sont représentés dans le tableau N°2.

**Tableau N°2 :** La nature et l'origine de différentes souches lactiques utilisées

Souches	Référence	Milieu de culture
<i>BMC3</i>	Laboratoire de sécurité alimentaire et santé (LMBAFS) de Mostaganem	Bouillon M17 & M17 Agar
<i>BML7</i>	(LMBAFS - Mostaganem)	Bouillon MRS & MRS Agar

<b>BML25</b>	(LMBAFS - Mostaganem)	Bouillon MRS & MRS Agar
<b>BML33</b>	(LMBAFS - Mostaganem)	Bouillon MRS & MRS Agar
<b>BML6</b>	(LMBAFS - Mostaganem)	Bouillon MRS & MRS Agar
<b>BMC1</b>	(LMBAFS - Mostaganem)	Bouillon M17 & M17 Agar
<b>BML13</b>	(LMBAFS - Mostaganem)	Bouillon MRS & MRS Agar
<b>BML27</b>	(LMBAFS - Mostaganem)	Bouillon MRS & MRS Agar
<b>BML17</b>	(LMBAFS - Mostaganem)	Bouillon MRS & MRS Agar
<b>BMC47</b>	(LMBAFS - Mostaganem)	Bouillon M17 & M17 Agar
<b>BMC46</b>	(LMBAFS - Mostaganem)	Bouillon M17 & M17 Agar

<b>BML48</b>	(LMBAFS - Mostaganem)	Bouillon MRS & MRS Agar
<b>BML12</b>	(LMBAFS - Mostaganem)	Bouillon MRS & MRS Agar
<b>BML15</b>	(LMBAFS - Mostaganem)	Bouillon MRS & MRS Agar
<b>BMC42</b>	(LMBAFS - Mostaganem)	Bouillon M17 & M17 Agar
<b>BMC45</b>	(LMBAFS - Mostaganem)	Bouillon M17 & M17 Agar
<b>BML9</b>	(LMBAFS - Mostaganem)	Bouillon MRS & MRS Agar
<b>BMC43</b>	(LMBAFS - Mostaganem)	Bouillon M17 & M17 Agar
<b>BMC44</b>	(LMBAFS - Mostaganem)	Bouillon M17 & M17 Agar
<b>BMI lb1</b>	(LMBAFS - Mostaganem)	Bouillon MRS & MRS Agar

<b>BML lb2</b>	(LMBAFS - Mostaganem)	Bouillon MRS & MRS Agar
<b>BMLR1</b>	(LMBAFS - Mostaganem)	Bouillon MRS & MRS Agar
<b>BMLlbth</b>	(LMBAFS - Mostaganem)	Bouillon MRS & MRS Agar
<b>BML lb4</b>	(LMBAFS - Mostaganem)	Bouillon MRS & MRS Agar
<b>BML43M11</b>	(LMBAFS - Mostaganem)	Bouillon MRS & MRS Agar
<b>BML lb3</b>	(LMBAFS - Mostaganem)	Bouillon MRS & MRS Agar
<b>BML lb3</b>	(LMBAFS - Mostaganem)	Bouillon MRS & MRS Agar
<b>BML 1127</b>	(LMBAFS - Mostaganem)	Bouillon MRS & MRS Agar
<b>BML 39</b>	(LMBAFS - Mostaganem)	Bouillon MRS & MRS Agar

\* **B** : Benanteur

\* **M** : Mekhatria

\* **l** : lactobacille

\* **C** : cocci

### III .1.2.1.2. Les souches pathogènes

Les différentes souches pathogènes utilisées dans cette expérimentation sont reportées dans le (Tableau N°3) ; ont été fournies par la société Microbiologie CE, St Cloud MIN, USA.

ATCC, American Type Culture collection ; CECT : Colección Española de Cultivos Tipos and DSM : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen.

**Tableau N°3** : les différentes souches pathogènes utilisées

Souches	Référence	Milieu de culture
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 10536	Bouillon BHI /MH
<i>Salmonella</i>	ATCC13311	Bouillon BHI/MH
<i>Listeria</i>	ATCC13932	Bouillon BHI /MH
<i>Listeria</i>	ATCC 7644	Bouillon BHI /MH
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC27853	Bouillon BHI /MH

### III.1.3. Les milieux de culture

Les différents milieux de culture utilisés sont :

- ❖ **Milieu MRS** (Man, Rogosa, Sharp) bouillon et Gélose : utilisé pour Favoriser la culture des Bactéries lactiques du Genre *Lactobacillus spp* (De Manne et al. 1960)
- ❖ **Milieu M17** (bouillon et Gélose) : utilisé pour Favoriser la culture des bactéries lactiques du Genre *Lactococcus spp* (Terzagui et Sandine, 1975)
- ❖ **Bouillon BHI** (Brain heart infusion) : pour réactivation des bactéries pathogènes
- ❖ **Gélose de MH** (Mueller Hinton) : pour la cultiver des bactéries pathogènes

### III .1.4. Appareillage

- Autoclave
- Etuve bactériologique
- Vortex
- Balance de précision
- Bain marie
- Bec bensen

### **III .1.5. Réactifs et solutions**

- ❖ Eau physiologique,
- ❖ Solution NaCl 9%
- ❖ Réactifs pour coloration du GRAM
- ❖ L'eau oxygénée
- ❖ Solution de NaOH (1N),
- ❖ Solution HCL 1N
- ❖ Huile à immersion

### **III .1.6.Verrerie et petit matériel**

- ❖ Pipettes Pasteur,
- ❖ Flacons en verre (de 250 ml),
- ❖ Tubes à essai, à visse en Verre,
- ❖ Pipettes graduées (1ml, 5ml, 10ml ...),
- ❖ Boîtes de pétri en plastique,
- ❖ Béchers de 200, 500 et 1000 ml,
- ❖ Erlen Myers,
- ❖ Tubes à hémolyse en plastique (5ml),
- ❖ Micropipette (200 µl) et (1000 µl),
- ❖ Burette,
- ❖ Anse de platine,
- ❖ Mortier,
- ❖ Cloches de Durham ...
- ❖ Tubes endorff

## **III .2. Méthodologie utilisée**

### **III .2.1. Isolement et identification des souches lactiques**

Vingt-huit souches de bactéries lactiques ont été isolées à partir de différents échantillons exemple : lben (lait de vache), jus de fruits (banane ; orange ; pomme), lait de vache, saumure d'olives, l'huile d'olive, raïb, lait de chèvres, beure de vache. L'isolement a été réalisé sur les milieux gélosé (MRS, M17) en condition d'anaérobiose (De Man et al. 1960 ; Idoui et al. 2009) :

La méthode de dilution décimale : des tubes contenant 9ml de solution NaCl 0.9%, sont utilisés pour l'isolement des souches ensuite 100 µl de chaque dilution ( $10^{-1}$  à  $10^{-4}$ ) est déposé sur les boites Pétri contenant les milieux solides M17 et MRS et ensemencé par l'anse de platine pour l'obtention de colonies bien isolés.

L'isolement direct par méthode des stries sur la surface des boites Pétri contenant milieu Gélosé (M17 et MRS). L'incubation des boites Pétris est réalisée dans l'incubateur à 37°C pendant 24h, 48h ou 72h en anaérobiose.

La purification des souches a été réalisée par plusieurs repiquages sur milieux solides à partir des colonies bien isolées, à caractère catalase négative et Gram positif :  
Les souches bactériennes sont ensemencées par la méthode des stries sur milieu solide et cultivées à une température de 37°C pendant 24h-48h et 72h. Seules les bactéries à Gram positif et catalase négative ont été retenues.

### **III .2.2. Identification des isolats**

#### **III .2.2.1. Caractérisation Phénotypique**

Cette identification est basée sur une étude des caractères morphologiques et physiologiques des isolats (Sharpe et al. 1966) :

##### **III .2.2.1.1. Caractérisation morphologique**

Cette étude est conçue par des observations macroscopiques et microscopiques des isolats.

### **III .2.2.1.1.1. Examen macroscopique**

Cet examen permet de constater la morphologie des colonies obtenues sur milieux solide. Ainsi, déterminer la forme, taille, couleur et aspect des colonies et sur milieu liquide présentant un trouble du milieu. (Johnson *et al.*, 1980).

### **III .2.2.1.1.2. Examen microscopique**

Basé sur la morphologie des cellules bactériennes et leur mode d'association observés par microscope optique.

#### **➤ Observation microscopique à l'état frais**

Une préparation à l'état frais permet d'examiner la mobilité des bactéries et d'en déceler la forme, bien que ce renseignement soit plus accessible sur des frottis colorés.

#### **➤ Technique de la préparation de l'état frais :**

- Déposer une petite goutte d'eau stérile sur la lame.
- Prélever une fraction de colonies sur gélose
- Faire une suspension homogène dans la goutte d'eau en incorporant progressivement l'inoculum,
- Recouvrir d'une lamelle en évitant d'enfermer des bulles d'air.
- Le liquide ne doit pas déborder (sinon jeter la lame dans une solution désinfectante et recommencer).
- Observer à l'objectif 40
- Après observation, jeter l'état frais dans un bac contenant un désinfectant car les bactéries sont vivantes.

Des bactéries sont considérées comme mobiles lorsque des trajets très différents sont observés (déplacement dans toutes les directions). Une bactérie immobile est animée de mouvements d'agitation normaux appelés mouvements browniens, qu'il ne faut pas confondre avec la mobilité (Canler, 2005).

➤ **Observation microscopique d'un frottis coloré**

La réalisation de frottis de bonne qualité est une condition préalable à toute coloration

**III .2.2.2. Technique de préparation des frottis :**

Avant toute coloration, il faut réaliser un frottis, c'est-à-dire un étalement et fixation des bactéries sur une lame. La technique du frottis est fort simple :

- Déposer sur une lame propre une goutte d'eau stérile si la culture prélevée est solide, puis prélever à l'aide de l'anse de platine une parcelle de la culture.
- Mélanger afin d'obtenir une suspension homogène.

Réaliser le frottis en partant du centre de la lame, en décrivant avec l'anse des mouvements circulaires de façon à obtenir un étalement mince et homogène sur au moins 2/3 de la lame. Sécher et fixer le frottis au-dessus de la flamme du bec Bunsen sans trop le chauffer. Une fois sec, passer dans la flamme le frottis 3 ou 4 fois une demi-seconde, pour le fixer.

Le frottis étant fixé, la lame ne présente plus de danger de contamination. On peut alors effectuer la coloration désirée.

**Remarque :** avant de colorer, attendre que la lame refroidisse sous peine de cristallisation du premier colorant ou de casse de la lame.

➤ **Coloration simple (Bleu de méthylène)**

La coloration la plus informative est la coloration de Gram. Une coloration au bleu de méthylène peut apporter des informations concernant la morphologie des germes (Canler, 2005). Sur le frottis fixé et refroidi :

Faire couler la solution de bleu de méthylène jusqu'à ce que toute la lame soit recouverte.

Laisser agir 1 minute. Rincer abondamment la lame avec le jet d'une pissette d'eau distillée, ou à l'eau du robinet jusqu'à élimination des colorants en excès. Sécher à l'air ou devant le bec bunsen, ou encore sécher délicatement entre deux feuilles de papier filtre fin (ou buvard), sans froter.

Examiner au microscope, objectif 100 avec une goutte d'huile d'immersion.

Les bactéries sont colorées en bleu sombre. Cette coloration est intéressante pour l'observation rapide des frottis mais elle permet seulement l'étude de la morphologie des bactéries. Il est donc souvent nécessaire de la compléter par une coloration de Gram.

### ➤ **Coloration de Gram**

La coloration de Gram est la base de l'identification d'une souche bactérienne. Elle doit être parfaitement maîtrisée car c'est le point de départ du choix des examens complémentaires à effectuer, des milieux à ensemercer ....etc.

Au terme du processus de coloration, les bactéries dites « Gram Négatives » apparaissent roses tandis que les bactéries dites « Gram Positives » sont colorés en bleu foncé/violet (Baldent , 1997).

### ➤ **Principe**

Les bactéries sont imprégnées par une première solution colorante, le violet de gentiane, puis elles sont fixées par un mordant, la solution de Lugol (solution d'iode dans l'iodure de potassium). On fait ensuite agir un décolorant (alcool le plus souvent), suivant la composition de leur paroi : certaines bactéries résistent à cette décoloration et apparaissent colorées en violet elles sont dites Gram positif.

D'autres bactéries ne résistent pas et ne sont plus visibles. On doit donc utiliser un deuxième colorant de teinte contrastante (fuchsine, ou safranine, colorants rouges), ces bactéries apparaissent alors colorées en rose, elles sont dites Gram négatif (Baldent, 1997).

### ➤ **Technique de coloration (Baldent, 1997)**

- ✓ Coloration par le violet : Recouvrir totalement la lame avec le violet de Gentiane
- ✓ Laisser agir 20 secondes à 1 minute selon la force du colorant utilisé ;
- ✓ Mordançage : Prendre la lame avec une pince et l'incliner légèrement. Éliminer le violet de gentiane en faisant couler sur la lame la solution de Lugol ;
- ✓ Reposer la lame et la recouvrir de solution de Lugol. Laisser agir 15 à 20 secondes ;
- ✓ Rejeter et remplacer par la même solution (2 fois en laissant agir chaque fois 20 secondes) ;
- ✓ Le temps de mordançage doit être égal ou légèrement supérieur au " temps de violet ".

- ✓ Décoloration par l'alcool, en laissant couler rapidement l'alcool sur le frottis, tenu verticalement ou en position très inclinée, jusqu'à ce que l'alcool s'écoule non teinté (5 à 10 secondes).
- ✓ Rincer aussitôt à l'eau ;
- ✓ Recoloration par la fuchsine : Recouvrir la lame d'eau et verser quelques gouttes de fuchsine à chaque extrémité du frottis. Ne jamais verser la fuchsine directement sur le frottis (risques de dépôts, de coloration trop intense) ;
- ✓ Laisser la fuchsine 10 à 20 secondes ;
- ✓ Rinçage et séchage : Rincer à l'eau et sécher entre deux feuilles de papier filtre ou à la chaleur du bec bunsen.

### **III .2.2.2.1. Caractérisation biochimique et physiologique**

Cette étude permet la sélection des souches et leurs purifications selon les critères suivants :

#### **III .2.2.2.1.1. Recherche de la catalase**

Ce test est utilisé pour différencier les bactéries catalase positive et catalase négative, la présence d'une catalase se traduit par l'apparition de bulles d'oxygène lors du contact de la bactérie avec l'eau oxygéné ( $H_2O_2$ ) comme suit :  $Inoculum + H_2O_2 = H_2O + \frac{1}{2} O_2$ .

Nous avons déposé sur une lame quelque goutte d'eau oxygénée puis, on a rajouté à l'aide d'une anse notre suspension bactérienne ou notre inoculum bactérien à partir de la colonie isolé et on les mets en contact avec la goutte d' $H_2O_2$ .

L'apparition ou non de bulle de gaz sur la lame témoigne respectivement la présence ou pas de la catalase dans le métabolisme bactérien, (Stiles et holzapfel, 1997).

### **III .2.3.Conservation des souches**

Selon le temps de conservation désiré, les souches pures sont conservées de la manière Suivante :

Conservation à courte durée : les souches purifiées sontensemencées sur Gélose MRS incliné, sont incubées à la température d'isolement pendant 14h en culture jeune et après croissance bactérienne, ces cultures sont conservées à 4°C au réfrigérateur (Kihal, 1996 ; Labioui et al. 2005)

Conservation à long terme : les souches pures sont ensemencées en cultures jeunes sur milieux liquides, après incubation de 14h :

1. Mettre 600 µl de la culture bactérienne dans un micro tube.
2. Ajouter 400 µl de glycérol. Agiter le micro tube, centrifuger brièvement.
3. Sur une étiquette, noter la date et le contenu.
4. Coller cette étiquette et mettre le micro tube à -20°C

### **III.2.4. La cinétique de croissance des souches expérimentales**

Cette méthode consiste à cultiver les souches lactiques et 24 h à 37°C ; et la lecture de densité optique (600nm) pour chaque souche se fait à des intervalles de temps 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12h, 14h, jusqu'à 24 h.

### **III.2.5. Pouvoir antibactérien des souches**

Les nombreuses méthodes décrites pour la détection de souches lactiques productrices de bactériocines sont basées sur le principe que ces substances protéiques peuvent diffuser dans un milieu de culture solide ou semi-solide qu'on inocule préalablement avec une souche cible. La production de bactériocines est détectée par le pouvoir inhibiteur du filtrat du microorganisme testé sur la croissance du germe cible (Labioui, 2005).

#### **III .2.5.1. Préparation de l'inoculum**

La préparation des surnageant s'effectue par la mise en culture des souches lactiques qui seront par la suite centrifugées à 10000 tours/min pendant 10 min. on sépare le culot de la suspension dans des conditions stériles.

#### **III .2 .6. Méthode des puits ADT (Agar well Diffusion Test)**

Les bactéries lactiques synthétisent des molécules à action bactéricide/bactériostatique comme les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyle et les bactériocines. Ces mécanismes antimicrobiens ont été exploités pour améliorer la préservation des aliments (Titiek *et al.*, 1996 ; Labioui *et al.*, 2005).

Pour la mise en évidence de la production de ces molécules par les souches testées, nous avons choisi La méthode de diffusion en puits ADT selon (Cintas *et al.*, 1995) basées sur le principe que ces substances qui peuvent diffuser dans un milieu de culture semi-solide qu'on

inocule préalablement avec une souche cible; le résultat se manifeste alors par l'apparition de zones d'inhibition autour des colonies.

Cette méthode consiste à utiliser le mélange de 1000µl de souche indicatrice avec une charge de  $10^7$  UFC /ml avec 15ml de milieu de culture semi-solide à 45°C à l'aide d'un vortex. Ce mélange a été coulé en boîte de pétrie de 90mm de diamètres sur une épaisseur de 4 mm Les boîtes sont Ensuite mises à sécher pendant 15 mn à la température ambiante ; nous avons aménagé les cavités (puits) de 6 mm de diamètre à l'aide d'une pipette pasteur dans la gélose. Puis nous avons remplis les puits par 50µl de surnageant de bactérie lactique qui a été obtenu par centrifugation à 10000 tr/min pendant 10 min d'une culture bactérienne jeune de la même charge de souche cible.

On a réalisé cette méthode par deux types de surnageant :

- ✓ Surnageant neutralisé à pH 7 par une solution de NaOH 0,1N.
- ✓ Surnageant non neutralisé.

Après 2h d'incubation à 4°C, les boîtes ont été incubées en aérobiose à 37°C pendant 24 heures, les diamètres des zones d'inhibition apparaissant autour des puits ont été mesurés (moyenne de deux diamètres perpendiculaires).

La lecture de l'activité bactériocinogénique se fait par la mesure du diamètre d'inhibition autour du puits, exprimée en mm (Allouche *et al.*, 2010). Une inhibition est considérée positive si le diamètre est supérieur à 2 mm (Thompson *et al.*, 1996) cité par (Doumandji *et al.*, 2010). La mesure de la zone d'inhibition (Zi) est effectuée selon la formule suivante :

$$Zi (mm) = \text{diamètre de la zone d'inhibition obtenue (mm)} - \text{diamètre de puits (6mm)}$$

### **III.2.7. Croissance sur milieu NaCl**

La croissance en présence de différentes concentrations de chlorure de sodium (NaCl) donne des renseignements précieux pour l'identification.

Les cultures à tester ont étéensemencées sur des bouillons hyper salés à 0.9% et 0.3% de NaCl.

Après une incubation à 37°C pendant 24h, l'aptitude à croître sur ces milieux se traduit par l'apparition d'un trouble, (Guiraud, 2003 ; Saidi et al., 2002).

### **III .2.8. Croissance au milieu acidifier**

Elle est testée sur Gélose MRS solide à un pH de 4 et 2 obtenue par addition de hCl. Les souches sontensemencées en touches (spots) et incubé à 37°C pendant 24 à 48h, (Guiraud, 2003).

## **Chapitre IV : Résultats et discussion**

### **IV.1. Isolement des bactéries lactiques**

Les cultures obtenues sur les boîtes de Pétri sont observées à l'œil nu pour caractériser la forme, la taille, l'aspect ainsi que la couleur des colonies (Badis *et al.* 2006). En effet les colonies observées sont les suivantes :

- ❖ Colonies blanches, rondes ou lenticulaires.
- ❖ Colonies transparentes, rondes très petites.
- ❖ Petites colonies blanches, rondes ou lenticulaires.



**Figure 04 :** Dénombrement de la flore lactique sur le milieu MRS à 37°C.

### **IV.2. Identification des genres**

Les 28 souches ont été isolées Gram positives et catalase négatives.

#### **IV.2.1. Examen macroscopique**

Le résultat de l'examen macroscopique est illustré Dans le tableau suivant.

**Tableau 04** : Aspects macroscopiques et milieux d'isolement des souches

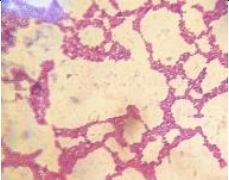


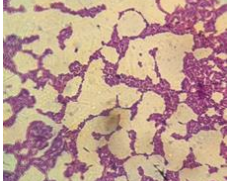
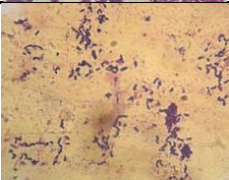
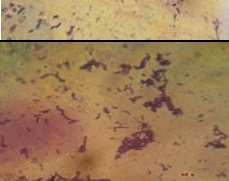
<b>Code de la souche</b>	<b>Milieu</b>	<b>Observation macroscopique</b>
<b>BMC3</b>	MRS 10 <sup>-1</sup> 10 <sup>-4</sup> 37°C	Blanche petite
<b>BMC7</b>	M17 10 <sup>-4</sup> 37°C	Blanche très petite
<b>BML25</b>	MRS 10 <sup>-4</sup> 37°C	Blanche très petite
<b>BML33</b>	M17 10 <sup>-4</sup> 37°C	Blanche très petite
<b>BML6</b>	M17 10 <sup>-4</sup> 37°C	Blanche petite
<b>BMC1</b>	M17 10 <sup>-4</sup> 37°C	Blanche très petite
<b>BML13</b>	M17 10 <sup>-4</sup> 37°C	Blanche petite
<b>BML27</b>	MRS 10 <sup>-4</sup> 37°C	Blanche petite
<b>BML17</b>	MRS 10 <sup>-4</sup> 37°C	Blanche petite
<b>BMC47</b>	MRS 10 <sup>-4</sup> 37°C	Blanche très petite
<b>BMC46</b>	MRS 10 <sup>-4</sup> 37°C	Blanche peu petite
<b>BML48</b>	M17 10 <sup>-4</sup> 37°C	Blanche petite
<b>BML12</b>	MRS 10 <sup>-4</sup> 37°C	Blanche claire et petite
<b>BML15</b>	M17 10 <sup>-4</sup> 37°C	Blanche et très petite
<b>BML42</b>	M17 10 <sup>-4</sup> 37°C	Blanche très petite
<b>BMC45</b>	M17 10 <sup>-4</sup> 37°C	Blanche petite
<b>BML9</b>	M17 10 <sup>-4</sup> 37°C	Blanche très petite
<b>BMC43</b>	M17 10 <sup>-4</sup> 37°C	Blanche peu petite
<b>BMC44</b>	M17 10 <sup>-4</sup> 37°C	Blanche petite
<b>BML lb1</b>	M17 10 <sup>-4</sup> 37°C	Blanche peu petite
<b>BML lb2</b>	M17 10 <sup>-4</sup> 37°C	Blanche petite
<b>BMLR1</b>	M17 10 <sup>-4</sup> 37°C	Blanche claire et très petite
<b>BML lbth</b>	M17 10 <sup>-4</sup> 37°C	Blanche très petite
<b>BML lb4</b>	MRS 10 <sup>-4</sup> 37°C	Blanche très petite
<b>BML43m11</b>	M17 10 <sup>-4</sup> 37°C	Blanche très petite
<b>BML lb3</b>	M17 10 <sup>-4</sup> 37°C	Blanche peu petite
<b>BML1127</b>	M17 10 <sup>-4</sup> 37°C	Blanche petite
<b>BML39</b>	M17 10 <sup>-4</sup> 37°C	Blanche petite

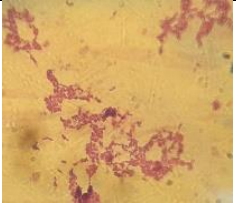
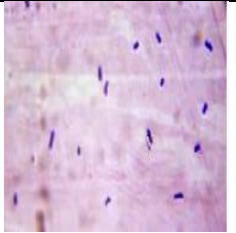

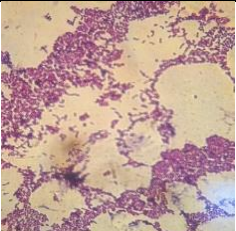
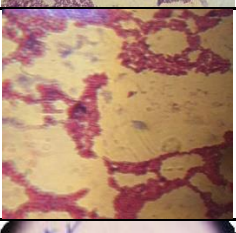

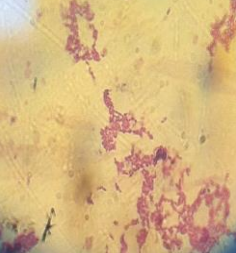
#### IV.2.2. Examen microscopique

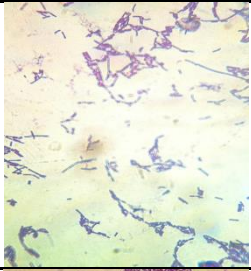
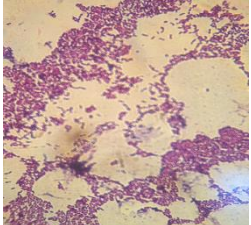
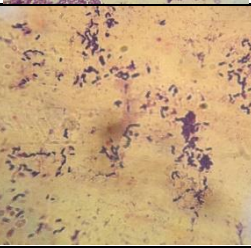

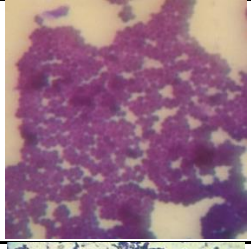
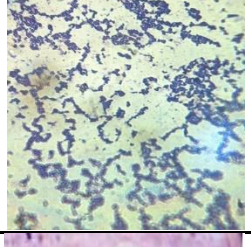
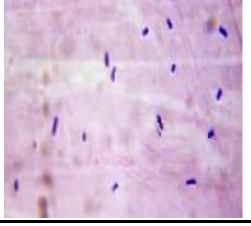
Le résultat de cet examen est résumé dans le tableau.

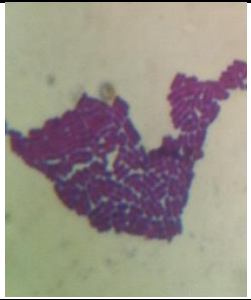

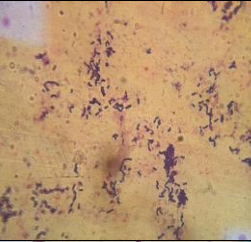


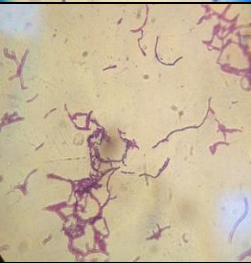

Les tests macroscopiques de la flore lactique nous ont permis d'isoler 28 souches Présentent des caractères similaires aux bactéries lactiques (Gram+, catalase-).


**Tableau 05** : Résultats des tests catalase, coloration de Gram et aspects microscopiques de nos souches isolées.

Date	L'origine	souche	catalase	Gram	observations	Photos
20-12-15	Lben (lait de vache)	BMC3	-	+	cocci	
20-12-15	Jus de fruits	BMC7	-	+	cocci	
20-12-15	Lait de vache	BML25	-	+	Bâtonnets très court	
20-12-15	Saumure des olives	BML33	-	+	Bâtonnets	
27-12-15	Beure de brebis	BML6	-	+	bacille	
27-12-15	L'huile d'olive	BMC1	-	+	Cocci	

<b>27-12-15</b>	Lait de vache	BML13	-	+	Bâtonnets	
<b>27-12-15</b>	Lait de vache	BML27	-	+	coccobacille	
<b>27-12-15</b>	Raïb (lait de vache)	BML17	-	+	Bacille long	
<b>11-02-16</b>	Lait de chèvre	BMC47	-	+	Cocci	
<b>11-02-16</b>	Beure de vache	BMC46	-	+	Cocci	
<b>11-02-16</b>	Lait de vache	BML48	-	+	Bâtonnets court	
<b>16-02-16</b>	Lactosérum (lait de vache)	BML12	-	+	bacille	

<b>16-02-16</b>	Lactosérum (lait de chèvre)	BML15	-	+	Bâtonnets moyens	
<b>16-02-16</b>	Lait de vache	BML42	-	+	Cocci	
<b>25-02-16</b>	lait de chèvre	BMC45	-	+	Cocci	
<b>25-02-16</b>	Lactosérum (lait de chèvre)	BML9	-	+	Bâtonnets court	
<b>25-02-16</b>	Lben (lait de vache)	BMC43	-	+	Cocci	
<b>28-02-16</b>	L'huile d'olive	BMC44	-	+	Cocci	
<b>28-02-16</b>	Lben (lait de vache)	BML lb1	-	+	Coccobacille	

<b>28-02-16</b>	Lben (lait de vache)	BMLlb2	-	+	Bâtonnets	
<b>28-02-16</b>	lait de vache	BMLR1	-	+	Bâtonnets court	
<b>28-02-16</b>	M Benbouziane	BMLlbth	-	+	Bâtonnets court	
<b>28-02-16</b>	Lben (lait de vache)	BML lb4	-	+	Bâtonnets en chaines	
<b>28-02-16</b>	M Benbouziane	BML43m11	-	+	Bacille	
<b>28-02-16</b>	Lben (lait de vache)	BML lb3	-	+	Bâtonnets	
<b>02-03-16</b>	Saumures des olives	BML1127	-	+	Bâtonnets court	

<b>02-03-16</b>	Raïb (lait de vache)	BML39	-	+	Bâtonnets court	
-----------------	----------------------	-------	---	---	-----------------	---

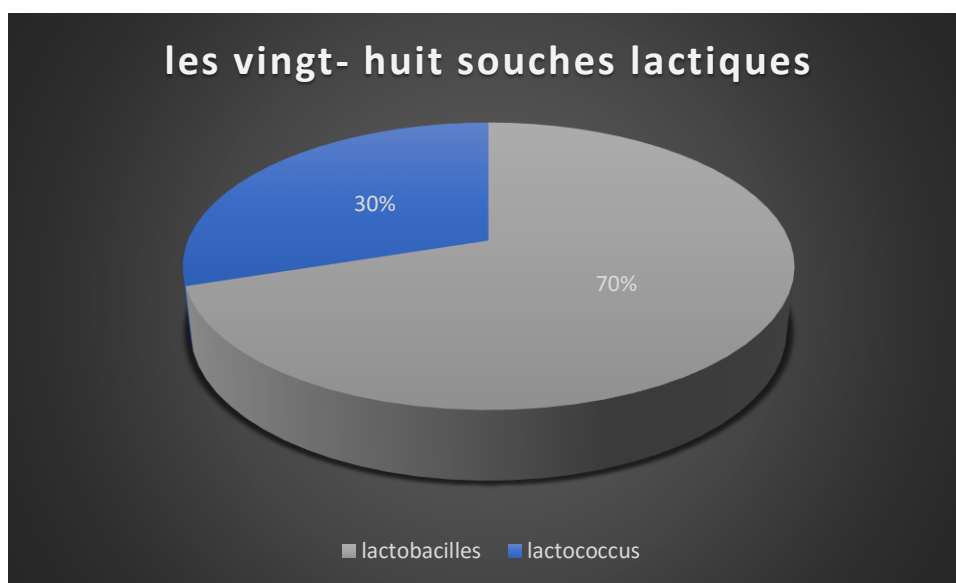
\* **B** : Benanteur

\* **I** : lactobacille

\* **M** : Mekhatria

\* **C** : Cocci

Après la coloration de Gram, nous avons passé à l'observation microscopique aux grossissements (G : 10x10), (G : 10x 40) et (G : 10x 100) avec l'huile à immersion, où nous avons pu observer que les bactéries étaient Gram positif apparaissant sous différentes formes avec différents modes d'associations. L'observation microscopique a montré que les souches étudiées sont des lactobacilles et des Lactococcus de différentes formes, il y a 30% Lactococcus et 70 % lactobacilles. Présenté dans la figure suivante :

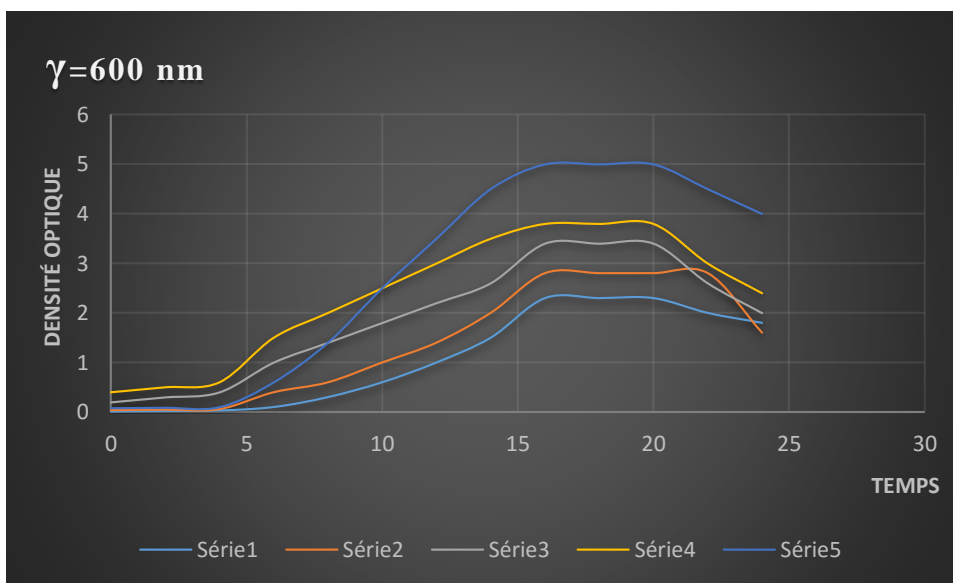


**Figures 05** : Répartition des souches lactiques isolées.

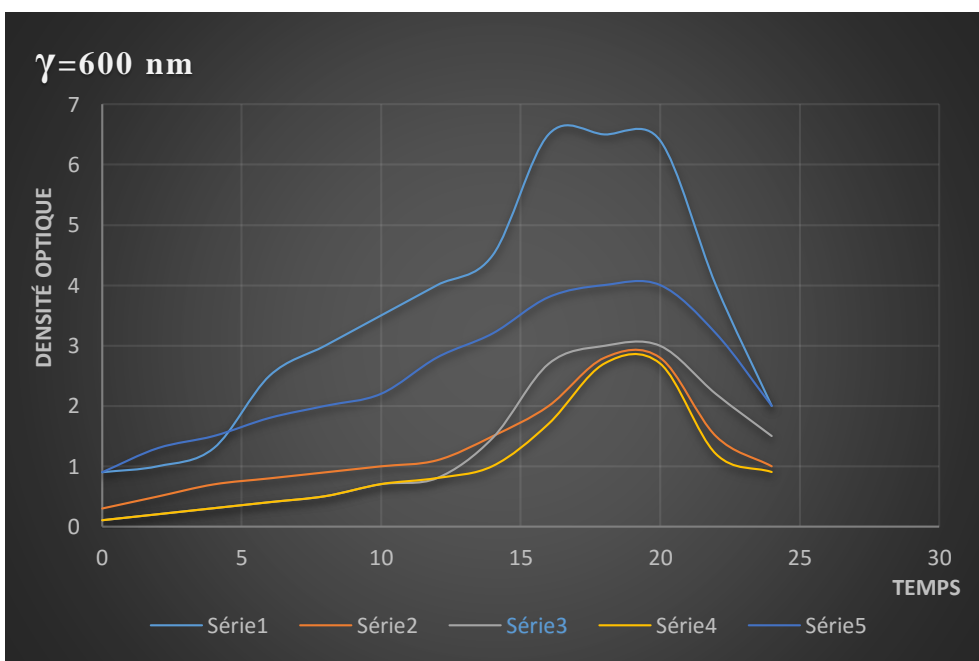
Les 28 souches à Gram positif sont conservées pour l'identification et les tests qui restent.

### IV.3. Les Courbes de croissances pour les souches lactiques

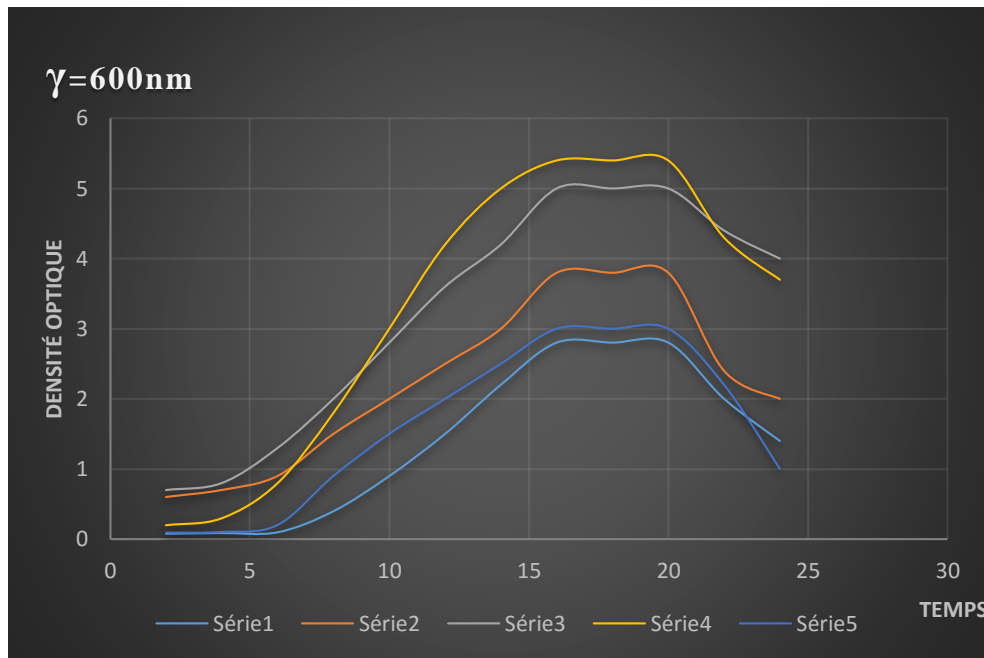
A partir de l'analyse des cinétiques de croissance, il est intéressant de relever que les vingt-huit souches lactiques sélectionnées présentent le même profil cinétique au début de la phase exponentielle, et elles atteignent respectivement leur phase stationnaire au bout de 16 à 20 heures d'incubation avec des densités optiques variables selon l'espèce.



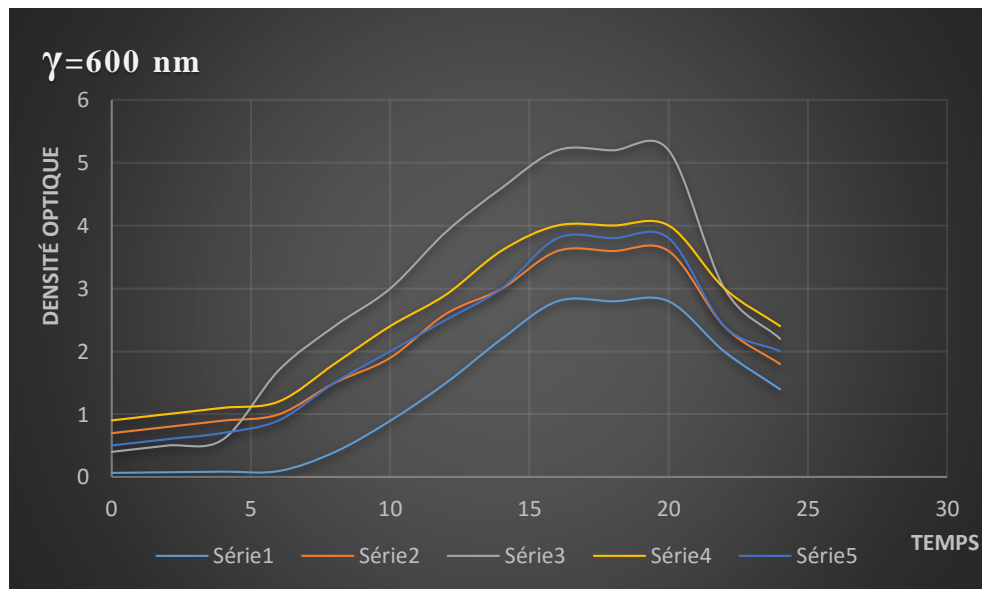
Série1 : BMC3 Série2 : BMC7 Série3 : BML25 Série4 : BML33 Série5 : BML6



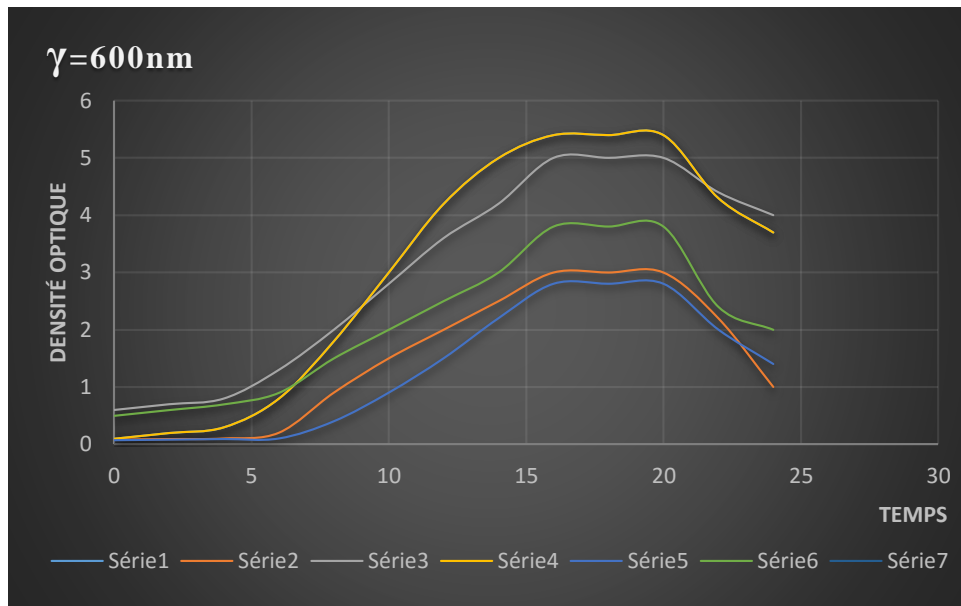
Série1 : BMC1 Série2 : BML13 Série3 : BML27 Série4 : BML17 Série5 : BMC47



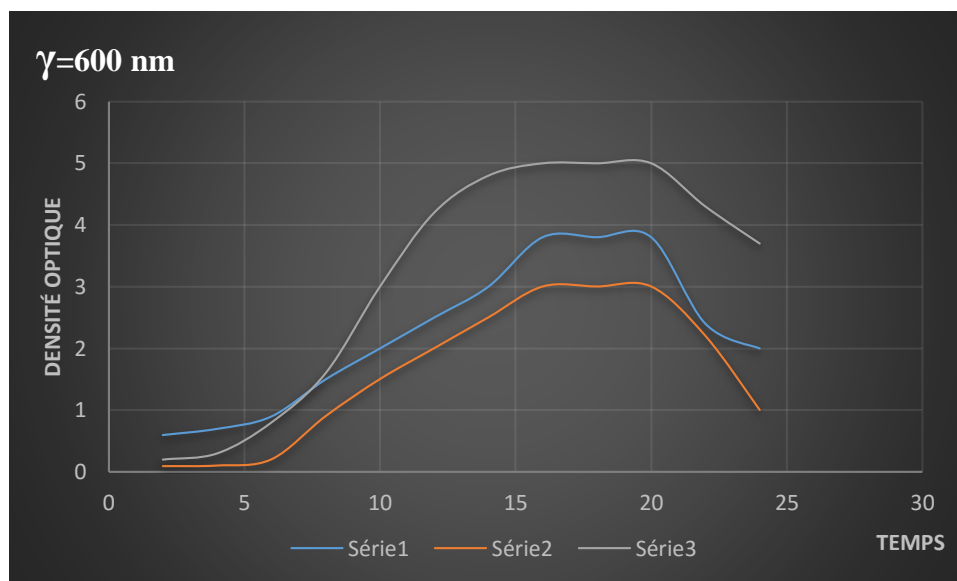
**Série1** :BMC46    **Série2** : BML48    **Série3** : BML12    **Série4** :BML15    **Série5** : BMC42



**Série1** :BMC45    **Série2** : BML9    **Série3** : BML43    **Série4** :BML44    **Série5** : BMCLB1



**Série1** :BMCLB2    **Série2** : BMLR1    **Série3** : BMLLBTH    **Série4** :BMLLB4    **Série5** : BMC43M11



**Série1** :BMClb3    **Série2** : BML1127    **Série3** : BML39

**Figure 06** : courbes de croissances pour nos vingt-huit souches lactiques

## IV.4. Résultats d'antagonisme

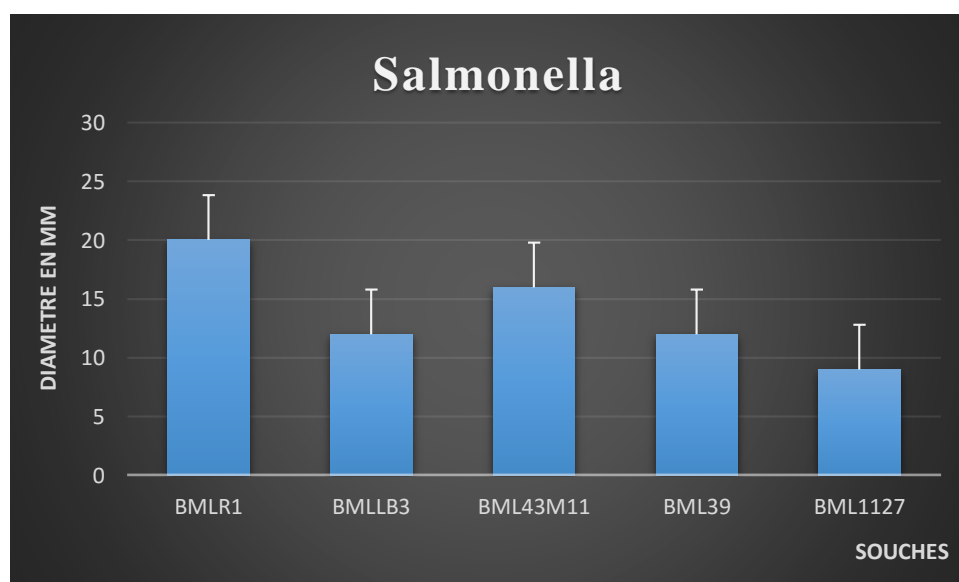
### IV.4.1. Méthode des puits ADT (Agar Well Diffusion Test)

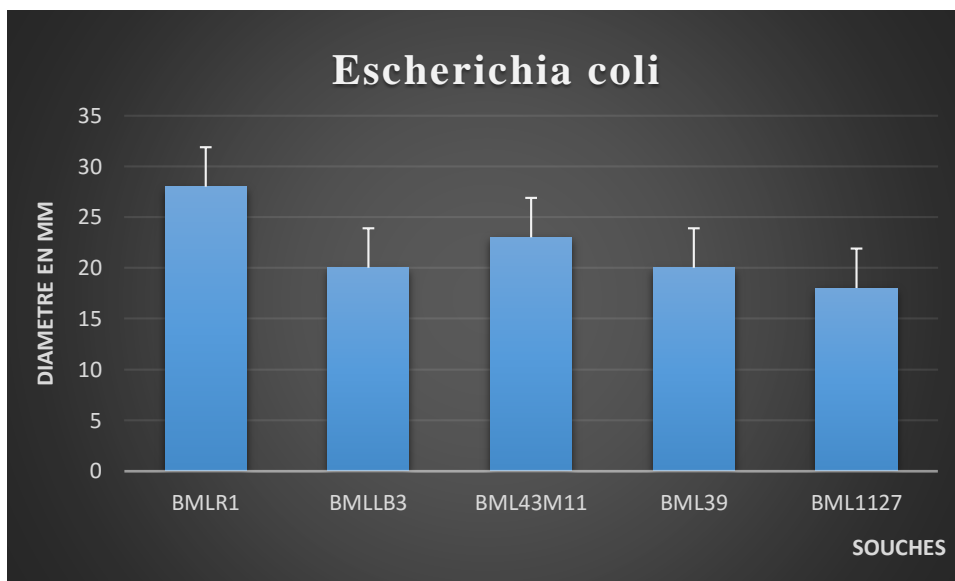
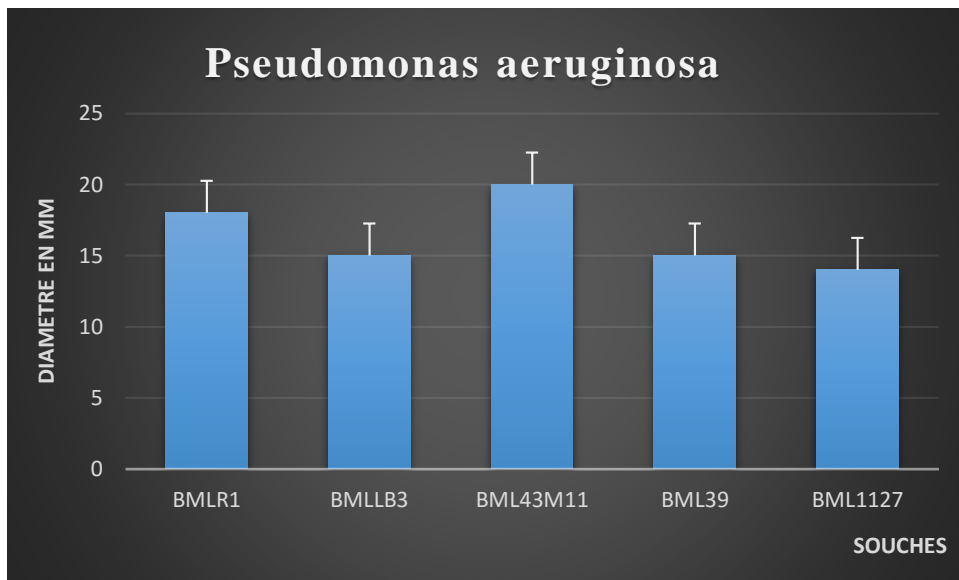
Dans un premier temps de notre étude on a réalisé l'étude d'antagonisme pour toutes nos souches (28 souches) ; par soucis d'objectivité on a sélectionné les cinq souches qui ont donné les meilleures zones d'inhibition durant le premier test préliminaire d'antagonismes.

Les cinq souches lactiques suivantes : (BML1b3 ; BML43M11 ; BMLR1 ; BML39 ; BML1127) ont été testés pour leurs activités antagonistes vis-à-vis de quelques bactéries pathogènes.

Ces résultats d'antagonismes de nos souches isolées sont dus principalement à la diminution du pH provoqué par la production de l'acide lactique (Driessen, 1981). Comme le montre les figures... nos souches (BML1b3 ; BML43M11 ; BMLR1 ; BML39 ; BML1127) ont démontrées un effet inhibiteur su *Escherichia. Coli* ATCC 10536 ; *salmonella* ATCC13311 ; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, donnant respectivement des zones de diamètre (28mm) (17mm) (18mm) les travaux de Nader De Macias et al. (1993), ont démontré que, *in vitro*, la souche *lactobacillus acidophilus* a un effet inhibiteur sur quelques souches pathogènes dont *Escherichia. Coli* ATCC 10536 ; *salmonella* ATCC13311 ; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853.

Dans un deuxième temps de notre étude et afin de mieux connaitre la nature de la substance inhibitrice nous avons travaillé avec le surnageant neutralisé et non-neutralisé de nos souches isolées





**Figure 07** : Résultats de l'effet antagoniste des bactéries lactiques vis-à-vis des bactéries pathogènes comme des indicateurs selon la méthode des puits



**Figure 08 :** Variation des diamètres des zones d'inhibition de trois souches lactiques et de témoin positif Vis-à-Vis de quelques bactéries pathogènes selon la méthode des puits

#### IV.4.2. Méthode des puits ADT (Agar Well Diffusion Test) (Surnageant non neutralisé)

Les surnageant des cinq souches lactiques (BMLib3 ; BML43M11 ; BMLR1 ; BML39 ; BML1127) ont été testés pour leurs activités antagonistes vis-à-vis de quelques bactéries pathogènes. Comme le montre la figure.

Ces résultats de surnageant non neutralisés sont identiques aux résultats obtenues d'antagonismes de nos souches isolées (culot + surnageant), diminution du pH provoqué par la production de l'acide lactique sécrété (surnageant) (Driessen, 1981).

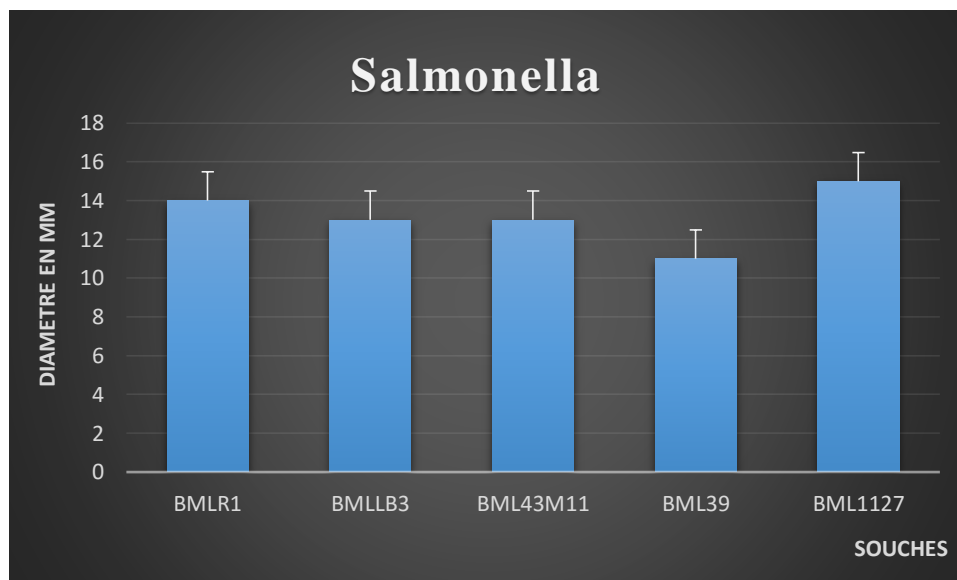
Dans un deuxième temps de notre étude et afin de mieux connaître la nature de la substance inhibitrice nous avons neutralisé notre surnageant pour éliminer l'effet de l'acide lactique. Nos résultats se rapprochent de plusieurs études actuelles qui montrent que les fractions bactériennes cellulaires n'ont aucun effet sur la croissance des souches cibles, par contre les fractions extracellulaires contiennent des substances responsables de cette interaction (Achemchem et Abrini, 1997 ; Labioui et al., 2005) .

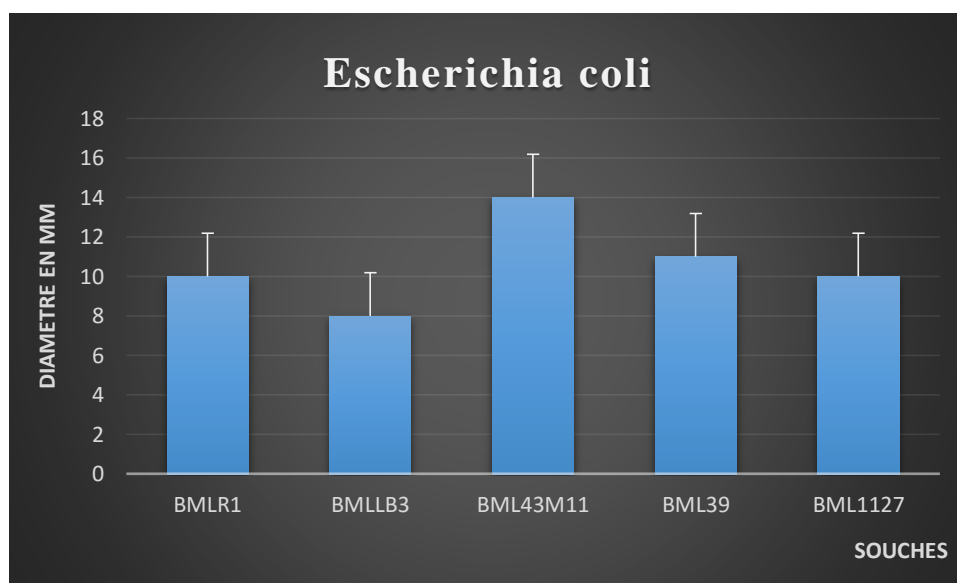
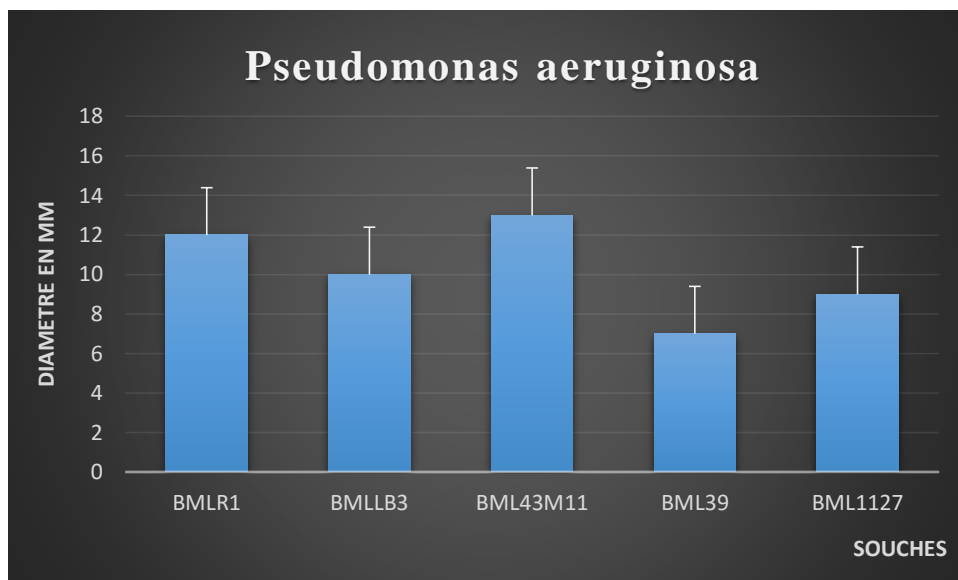
Il est important aussi de noter que l'absence d'inhibition dans les surnageant n'exclue pas le fait qu'il existe des substances antibactériennes (Ammors et al., 2006).



V: BMLR1      Z: BMLlib3      Y: BML43M11      2: BML39      1: BML1127

**Figure 09 :** Variation des diamètres des zones d'inhibition de cinq souches lactiques et de témoin positif Vis-à-Vis de quelques bactéries pathogènes selon la méthode des puits (Surnageant non neutralisé).





**Figure 10 :** Résultats de l'effet antagoniste des bactéries lactiques vis-à-vis des bactéries pathogènes comme des indicateurs selon la méthode des puits (*Surnageant non neutralisé*).

#### **IV.4.3. Méthode des puits ADT (Agar Well Diffusion Test) (Surnageant neutralisé)**

Les surnageant neutralisés de nos cinq souches lactiques (BML1b3 ; BML43M11 ; BMLR1 ; BML39 ; BML1127) ont été testés pour leurs activités antagonistes vis-à-vis les mêmes bactéries pathogènes.

Selon les résultats obtenus, la méthode de mise en évidence d'activité antagoniste exercée par nos bactéries lactiques, dévoilent des résultats négatifs.



V: BMLR1      Z: BML1b3      Y: BML43M11      2: BML39      1: BML1127

**Figure 11 :** Variation des diamètres des zones d'inhibition de cinq souches lactiques positif Vis-à-Vis de quelques bactéries pathogènes selon la méthode des puits (Surnageant neutraliser).

Les résultats obtenus montrent clairement que nos surnageant neutralisé des cinq souches testées ne révèlent aucun effet antagoniste vis-à-vis des souches pathogènes, ce qui confirme que la nature de la substance inhibitrice et l'agent responsable des antagonismes sont les acides organiques dont principalement l'acide lactique.

Certaines Lactobacilles jouent un rôle protecteur par sa production des composés comme peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) acide lactique et les bactériocines qui inhibent la croissance potentielle des pathogènes (Liliana *et al.*,2008).

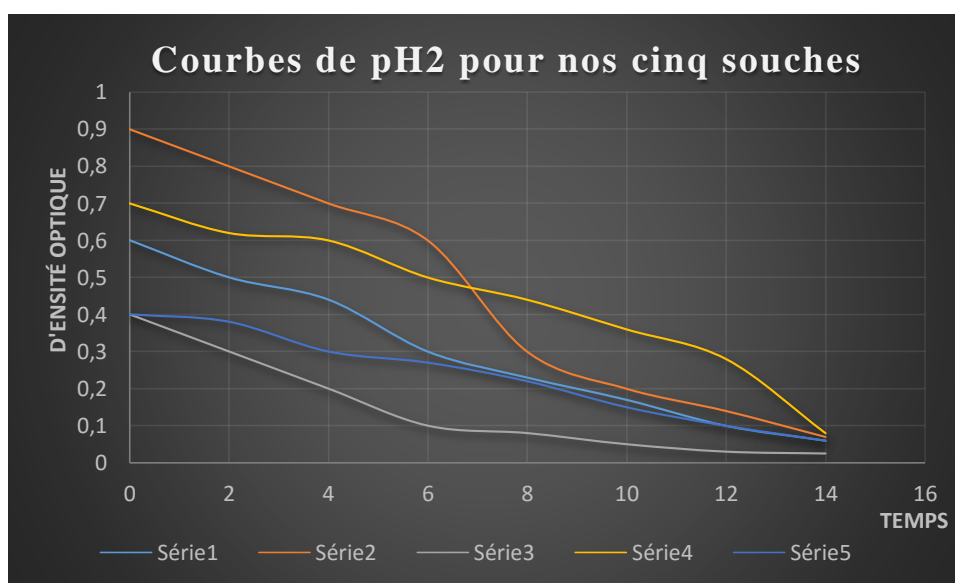
A l'issue du présent travail nous avons constaté que l'allure de l'activité antagoniste des souches lactiques testées vis-à-vis de quelques bactéries pathogènes, diffère selon la souche considérée.

## IV.5. Survie des bactéries dans les conditions extrêmes

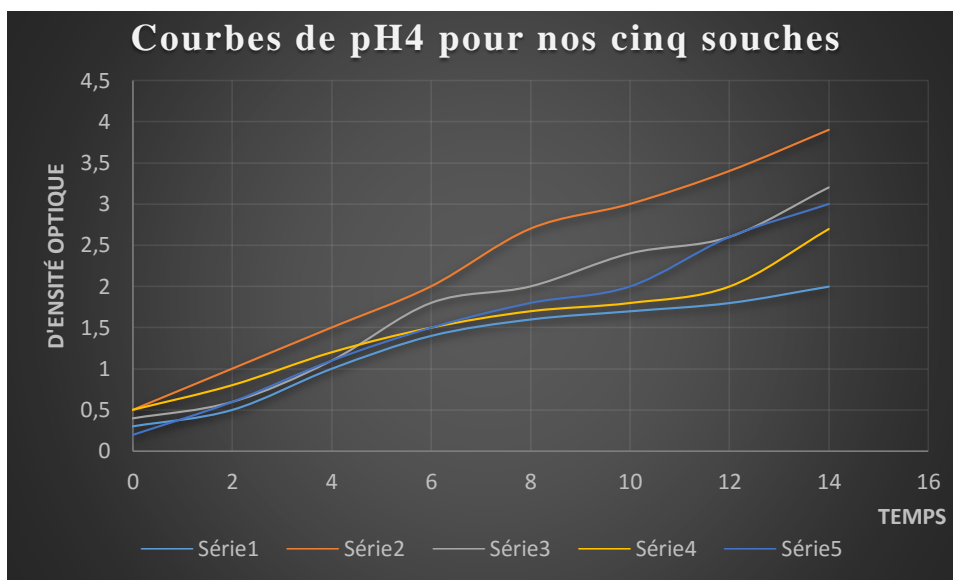
### IV.5.1. Résistance à l'acidité

L'étude de l'exposition prolongée de nos cultures individuellement aux conditions acides similaires à celles de l'estomac a été réalisée par incubation dans le milieu MRS acidifié à différents pH pendant 14h.

Les résultats obtenus illustrés par la figure N°12 montrent l'existence d'une viabilité faible à pH 2 et une viabilité modérée de nos souches à pH 4. Nous avons pu noter des différents taux de survie pour chaque souche.



Série 1 : BML1127    Série 2 : BML1b3    Série 3 : BML39    Série 4 : BML43M11    Série 5 : BMLR1



Série 1 : BML1127    Série 2 : BMLb3    Série 3 : BML39    Série 4 : BML43M11    Série 5 : BMLR1

**Figure 12 :** courbes de résistances en ph pour nos cinq souches lactiques.

**Tableau 06 :** la croissance de nos cinq souches sur un milieu acidifié

Les souches	pH <sub>2</sub>	PH <sub>4</sub>
BMLb3	-/+	+
BML43M11	-/+	+
BMLR1	-/+	+
BML39	-/+	+
BML1127	- /+	+

Une croissance des cinq souches (BMLb3 ; BML43M11 ; BMLR1 ; BML39 ; BML1127) sur le bouillon MRS à pH 2 été remarquée à l’exception. Par contre, seulement les cinq souches de bactéries lactiques possèdent la capacité de croissance à pH 4 ; pH 2. Ces résultats sont conformes à ces trouvés par (Dilmi Bouras et Sadous 2002).

#### **IV.5.2. Résultats de NaCl**

**Tableau 07** : la résistance de nos cinq souches sur un milieu NaCl

<b>Les souches</b>	<b>0,9%</b>	<b>0,3%</b>
BML1b3	+	+
BML43M11	+	+
BMLR1	+	+
BML39	+	+
BML1127	+	+

Les expériences effectuées ont montré que :

Les cinq souches isolées (BML1b3 ; BML43M11 ; BMLR1 ; BML39 ; BML1127) sont capable de se croitre sur le bouillon MRS avec une concentration de NaCl de 0,9% et 0,3%. Ces résultats sont conformes à ces trouvés par *(Dilmi Bouras et Sadous 2002)*.

## Conclusion

Depuis l'antiquité, les bactéries lactiques ont été utilisées pour la fabrication et la conservation d'aliments. La découverte de leur action sur le lait fut probablement accidentelle mais leur utilisation fut perpétuée sous forme de ferments et elle est en développement continu.

Le but de cette étude était de mettre en place une collection de souches de bactéries lactiques indigènes ayant des applications alimentaires et un effet bénéfique sur la santé. A l'issue de ce qui a été réalisé, vingt-huit (28) souches ont été isolées et purifiées et identifiées à partir de produit naturel originaire de la Wilaya de Mostaganem et Oran.

L'identification des souches a été réalisée par la détermination des caractéristiques morphologiques, physiologiques. La totalité était des coques appartenant aux deux genres *Lactococcus* et *lactobacilles*.

Le présent travail permis de la mise en évidence *in vitro* de l'activité antagoniste des souches lactiques isolées : (BML1b3 ; BML43M11 ; BMLR1 ; BML39 ; BML1127) ont démontrées un effet inhibiteur sur *Escherichia. Coli* ATCC 10536 ; *salmonella* ATCC13311 ; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853.

Les aptitudes probiotiques (tolérance à l'acidité, aux NaCl) sont aussi révélées intéressantes. Les souches utilisées, (BML1b3 ; BML43M11 ; BMLR1 ; BML39 ; BML1127) résistent et se développent normalement même à pH acide (4) et moyennement bas (2) en présence d'une forte concentration de Na Cl (0.3 %) et (0,9 %).

Les résultats de notre recherche permettent d'ouvrir de nouvelles perspectives. Donc pour compléter ce travail sur ces souches lactiques, nous proposons :

Sur le plan technique, l'utilisation des techniques moléculaires pour une meilleure précision et signification de la microflore présente.

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

- D'une mesure de leur résistance aux bactériophages, car cette caractéristique est directement reliée à la réussite ou non de la production fromagère.

- D'une étude du comportement vis-à-vis des traitements de conservation, la congélation et la lyophilisation.
- D'une meilleure caractérisation des activités enzymatiques des souches bactériennes, car la qualité des produits fermentés passe par une meilleure connaissance des activités métaboliques des bactéries lactiques.
- D'une étude *in vivo* des propriétés probiotiques des souches possédant des bonnes aptitudes *in vitro* (par exemple l'adhésion aux cellules épithéliales humaines).

## A

- **Achemchem F. et Abrini J., 1997.** Production de bactériocines par des bactéries lactiques à partir du jben de chèvre du Nord du Maroc. *Journal of Applied Microbiology*, 70 : pp 660-669.
- **Ait-Belgnaoui A., Lamine F., Han W., Eutamene H., Fioramonti J., Bueno L. et Theodorou V., 2005.** A probiotic strain (*Lactobacillus farciminis*) prevents stress-induced increase of colonic permeability and visceral sensitivity to distension in rats. *Nutr. Ali. Fonct.* **3**: 59-63.
- **Allouche F.N., Hellal A., Laraba A., 2010.** Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. *Revue Nature et Technologie*. N° 03 : pp 13 -20.
- **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.
- **Ammor S., Tauveron G., Dufor E. et Chevalier I., 2006.** Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 1- Screening and characterization of antibacterial compound. *Food Control.* **17**: 454-461.
- **Atlan D., Béal C., Champonier-Vergès M.C., Chapot-Chartier M.P., Chouayekh H., Cocaign- Bousquet M., Deghorain M., Gadu P., Gilbert C., Goffin P., Guédon E., Guillouard I., Guzzo J., Juillard V., Ladero V., Lindley N., Lortal S., Loubière P., Maguin E., Monnet C., Monnet V., Rul F., Tourdot-Maréchal R. et Yvon M., 2008.** Métabolisme et ingénierie métabolique. *In* : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). *Tec & Doc, Lavoisier*. Paris. 271-447.
- **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.* NewYork. 1-66.

## B

- **Babel, D. J. (1997).** Elie Metchnikoff's bacillus of long life. *ASM News* , 54: 661-665.
- **Badis A., Guetarni D., Moussa Boudjema B., Henni D.E., Kihal M., 2004.** Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiology*, 21: 579-588

- **Badis, A., Guetarni, D., Kihal, M. et Ouzrout, R. (2005).**Caractérisation phénotypique des Bactéries lactiques isolées à partir de lait de chèvre de deux populations locales "Arabia et Kabyle». *Scien &Tech*, **23** : 30-37.
- **Baldent., 1997.** Coloration usuelles en Bactériologie. *Revue de Développement et santé. Février(1997).*
- **Béal C., Marin M., Fontaine E., Fonseca F. et Obert J.P., 2008.** Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. *In : Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 661-765.*
- **Bourgeois C.M. et Larpent J.P., 1996.** Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentations alimentaires. *Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 432-704.*
- **Broadbent J.R., 2001.** Genetics of Lactic Acid Bacteria. *In: Applied Dairy Microbiology (Marth E.H. et Steele J.L.). 2e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 243-300.*

## C

- **Canler J-P., 2005.** Dysfonctionnements biologiques des stations d'épuration : Origines et solutions. *Groupe Gis-Biostep. Doc & Tech. FNDAE n°33 : pp 100-104.*
- **Cholet O., 2006.** Etude de l'écosystème fromager par une approche biochimique et moléculaire. *Institut National Agronomique Paris-Grignon. Ecole Doctorale ABIES. UMR de Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires INRA, INA. 16.*
- **Cintas L. M., Rodríguez J. M. Fernandez M. F., Sletten K., Nes I. F., Hernandez P. E. & Holo H, (1995).** Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2643–2648.
- **Condon, J.B., Pradel, P. and Verdier, I. (1987).** Effect of forage type on milk yield, chemical composition and clotting properties of milk. *Lait*, **75**: 513–521
- **Jasniewski J. (2008).** Etude des mécanismes d'action de bactériocines de la sous classe Iia. Thèse présentée pour obtenir le grade de Docteur en Procédés Biotechnologiques et Alimentaires.. Nancy-Université. P 9-10, 15.

## D

- **Daeschel, H. and Winkelmann, G., 1989.** Iron chelation and siderophores. In: *Transition Metals in Microbial Metabolism*, Winkelmann, G. and Carrano, C.J. (eds) Amsterdam: Harwood Academic. pp. 1–49.
- **De Man J.D, Rogosa M, & Sharpe M.E., 1960.** A medium for the cultivation of *Lactobacilli*.
- **Dellaglio F., de Roissard H., Torriani S., Curk M.C. et Janssens D., 1994.** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In : *Bactéries lactiques* (De Roissard H. et Luquet F.M.). *Lorica, Uriage*. **1** : 25-116.
- **Denohue D.C., 2004.** Safety of novel probiotic bacteria. In: *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects* (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). *3e Ed., Marcel Dekker, Inc.* New York. 531-546.
- **Donkor O.N., Henriksson A., Vasiljevic T. et Shaha N.P., 2007.** Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and in vitro angiotensin converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. *INRA, EDP Sciences*. **86**: 21-38.
- **Doumandji A., Hellal A., Saidi N., 2010.** Purification de la bactériocine a partir de *Lactobacillus acidophilus* 11, *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.*, **4**: 25-47.
- **Drider, D., Fimland, G., Héchard, Y., Mc Mullen, L.M., Prevost, H., 2006.** The continuing story of class IIa bacteriocin. *Microbiology; Molecular & Biology Review*. **70** (2): pp 564-582.

## G

- **Gbassi K.G., Vandamme T., Yolou S.F. et Marchioni E., 2011.** In vitro effects of pH, bile salts and enzymes on the release and viability of encapsulated *Lactobacillus plantarum* strains in a gastrointestinal tract model. *Int. Dairy J.* **21**: 97-102.
- **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.
- **Gibson G.R. & Roberfroid M.B. (1995)** Dietary modulation of the human colonic microflora: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* **125**: 1401– 1412.

- **Gilliland SE.** Gilliland SE (1990). Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev.*7(1-2):175-88.
- **Gu, S., Weller, D.M., Sarkar, A. and Cook, R. J.,2008.** Characterization of an antibiotic produced by a strain of *Pseudomonas fluorescens* inhibitory to *Gaeumannomyces graminis var. tritici* and *Pythium* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29:488-495.
- **Guarner F., Khan A.G., Garisch J., Eliakim R., Gangl A., Thomson A., Krabshuis J. et Le Mair T., 2008.** Recommandation Pratique : Probiotiques et Prébiotiques. *WGO Practice Guidelines.* 3.
- **Guiraud J.P. et Rosec J.P., 2004.** Pratique des normes en microbiologie alimentaire. *AFNOR.* 237- 251.
- **Guiraud J.P., 2003.** Microbiologie Alimentaire. *Tec & Doc, Dunod.* Paris. 90-292.

## H

- **Haddie J.M., 1986.** Other streptococci. *In* : Bergey's manual of systematic bacteriology (Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G.W. et Baltimore W.). **1** : 1070.
- **Hassan A.N. et Frank J.F., 2001.** Starter Cultures and their use. *In*: Applied Dairy Microbiology (Marth E.H. et Steele J.L.) *2e Ed., Marcel Dekker, Inc.* New York. 151-205.
- **Ho T.N.T., N. Tuan N., Deschamps A. et Caubet R., 2007.** Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product of Vietnam. *Int. Workshop on Food Safety and Processing Technology.* 134-142.
- **Hogg T., 2005.** Essential microbiology. *John Wiley & Sons, Ltd.* 188-190.

## I

- **Idoui T., Boudjerda J., Leghouchi E. et Karam N.E., 2009.** Lactic acid bacteria from “Sheep’s Dhan”, a traditional butter from sheep’s milk: Isolation, identification and major technological traits. *Grasas Y Aceites*,60(2): pp 177-183.

## J

- **Johnson J. L., Phelps C. F., Cummins C. S., London J et Gasser F., 1980.** Taxonomy of *Lactobacillus acidophilus* group, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 30: pp. 53-68.

## K

- **Kashket, E. R. (1987).** Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS. Microbiol. Rev.* **46**: 233-239.
- **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.
- **Kihal M., 1996.** Etude de la production du dioxyde de carbone par *Leuconostoc mesenteroides*, élément d'application en technologie fromagère type fromage bleu. *Thèse de Doctorat d'état.univesité d'Es-Senia (Oran).*
- **Klaenhammer T.R., Fremaux C., Hechard Y., 1994.** Activité antimicrobienne des bactéries lactiques **In** Bactéries lactiques. De Roissart H., Luquet F.M. Tome 1, *Lorica*. pp: 353-366.
- **Klaenhammer T.R. (1993).** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12(1-3) :39 – 85.

## L

- **Labioui H., Elmoualdi L., El Yachioui M. et Ouhssine M., 2005.** Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.* **144** : 237-250.
- **Lamoureux L., 2000.** Exploitation de l'activité  $\beta$ -galactosidase de cultures de bifidobactéries en vue d'enrichir des produits laitiers en galacto-oligosaccharides. *National Library of Canada.* 23-47.
- **Law J. ET Haandrikman A., 1997.** Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 1-11.
- **Leclerc H., Gaillard F L. et Simonet M., 1994.** Les grands groupes de bactéries. *In* : Microbiologie générale : la bactérie et le monde microbien. *DOIN.* Paris. 445.
- **Leroy F. et De Vuyst L., 2004.** Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Tre.FoodSci. Technol.* **15**: 67-78.
- **Leveau J.Y. et Bouix M., 1993.** Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel. *Tec & Doc, Lavoisier.* Paris. 85-87.
- **Leveau J.Y., Boiux M. et De Roissart H.B., 1991.** La flore lactique : technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires. *2e Ed., Tec & Doc, Lavoisier.* Paris. **3** : 2-40.

- **Liliana M, Pascuala , Maria B. D, Ruiz F, Walter G, Pajaro C & Lucila B. (2008).** *Lactobacillus rhammosus L60*, a potential probiotic islated from the human vagina. *J. Gen.Appl. Microbiol.*,54,141-148.
- **Ljungh A, Wadström T(2006).** Lactic acid bacteria as probiotics. *Curr Issues Intest Microbiol* 2006.7(2):73-89.

### M

- **Mater DD, Corthier G (2004).** Response of lactic acid bacteria to the digestive environment. *J Clin Gastroenterol.***38** (6 Suppl):S64-6.
- **Mäyrä-Mäkinen A. et Bigret M., 2004.** Industrial use and production of lactic acid bacteria. *In: Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects* (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). *3e Ed., Marcel Dekker, Inc.* New York. 73-102.  
*Microbiologie générale : la bactérie et le monde microbien. DOIN.* Paris. 445.
- **Millette M., Luquet F.M. et Ruiz M.T., 2008.** Characterization of probiotic properties of *Lctobacillus* strains. *Dairy Sci. Technol.* **88**: 695-705.
- **Monnet V., Latrille E., Béal C. et Corrieu G., 2008.** Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. *In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments* (Corrieu G. et Luquet F.M.). *Tec & Doc, Lavoisier.* Paris. 512-592.
- **Morisset D, (2003).** Etudz des relation structure /fonction d'une bactériocine anti-*Listeria*, la méésentéricine Y105. Thèse présenté pour obtenir grade de Docteur en Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie. Université de Poitiers. P 20,26

### N

- **Nader, T., Nes, I.F., Holo, H. (1993)** Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG2333. *Appl. Environ. Microbiol*, **69**(5): 2975-2984.

### O

- **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

- **Palomares I.C., Pérez-Morales R. et Acedo-Félix E., 2007.** Evaluation of probiotic properties in *Lactobacillus* isolated from small intestine of piglets. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **49**(3-4) : 46-54.
- **Percival M., 1997.** Choosing a probiotic supplement. *Clin. Nutr. Insights.* **6**(1): 95-100.

- **Picon A., Garcia-Casado M.A. et Nunez M. 2010.** Proteolytic activities, peptide utilization and oligopeptide transport systems of wild *Lactococcus lactis* strains. *Int. Dairy J.* **20**: 156-162.
- **Pilet M.F., Magras C., Federighi M., 2005.** Bactéries lactiques. *In* : bactériologie alimentaire (Federighi M.). *2e Ed., Economica*. Paris. 219-240.
- **Pilet M.F., Magras C., Federighi M., 1998.** Bactéries lactiques. *In* : Manuel de bactériologie alimentaire (Sutra L., Federighi M., Jouve J.L.). *Polytechnica*. Paris. 235-260.
- **Pot B., 2008.** The taxonomy of lactic acid bacteria. *In* : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). *Tec & Doc, Lavoisier*. Paris.1-106.
- **Pot B., Devriese L.A., Uris D., Vandamme P., Haesebrouck F. et Kersters K., 1996.** Phenotypic identification and differentiation of *Lactococcus* strains isolated from animals. *Syst. Appl.Microbiol.* **19** : 213-222.
- **Price, B., Vandamme, P et Kersters, K. (1970).** Analysis of electrophoresis whole-organism protein fingerprints. *In* : Goodfellow et A.G O'Donnell(ed). *Modern microbial methods : chemical methods in bacterial systematics*. Jhon Wiley and sons Ltd, London.

## R

- **Rama Devi.Polasa, Aris B. and Hurst A., 1985.** Nisin: a possible alternative of adjunct to nitrite in the preservation of meats. *Applied Environment & Microbiology.* **41**: pp 375-380.
- **Reyes-Gavilan C.G., Suarez A., Fernandez-Garcia M., Margolles A., Gueimonde M. et Ruas- Madiedo P., 2011.** Adhesion of bile-adapted *Bifidobacterium* strains to the HT29-MTX cell line is modified after sequential gastrointestinal challenge simulated in vitro using human gastric and duodenal juices. *Res. Microbiol.* **162**: 514-519.
- **Rodriguez J.M., Martínez M.I., Horn N. et Dodd H.M., 2003.** Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **80**: 101-116.
- **Rokka S. et Rantamaki P., 2010.** Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. *Eur. Food Res. Technol.* **213**: 1-12.
- **Roudj S., Belkheir K., Zadi-Karam H. et Karam N.E., 2009.** Protéolyse et autolyse chez deux lactobacilles isolés de lait camelin du Sud-Ouest Algérien. *European. J. Sci. Res.* **34** (2) : 218-227.

## S

- **Saarela M., Mogensen G., Fondén R., Matto J., et Mattila-Sandholm T., 2000.** Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.* **84** : 197-215.
- **Saidi N., Guessas B., Bensalah F., Badis A., Hadadji M., Henni D.E, Prevost H. et Kihal M., 2002.** Caractérisation des Bactéries Lactiques Isolées du Lait Cru de Chèvre des Régions Arides d'Algérie. *Journal Algérien des Régions Arides.*, 01: 01-14
- **Savijokie K., Ingmer H. et Varmanen P., 2006.** Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71** : 394-406.
- **Schleifer K.H., 1987.** Recent changes in the taxonomy of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol.Letters.* **46** : 201-203.
- **Sebti I. (2002).** Bio-emballage actif incorporant la nisine, diffusion de cette bactériocine en gel d'agarose. Thèse présenté pour obtenir le grade Docteur en Science des aliments. Université Bordeaux I.P 12.
- **Serhan M., Cailliez-Grimal C., Borges F., Revol-Junelles A.M., Hosri C. et Fanni J., 2009.**Bacterial diversity of Darfiyeh, a Lebanese artisanal raw goat's milk cheese. *Food Microbiol.* **26**: 645-652.
- **Shah N.P., 2007.** Functional cultures and health benefits. *Int. Dairy J.* **17** : 1262-1277.
- **Sharpe M.E., Fryer T.F., Smith D.G.,1966.** Identification of the lactic acid bacteria. In (Eds) Identification methods for microbiologist's, Partie A. *London: Academic Press.*
- **Stackebrandt E, Teuber M (1988).** Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochimie.***70**(3):317-24.
- **Stiles M.E. et Holzapfel W.H., 1997.** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* **36** : 1-29.
- **Streit F., Corrieu G. et Béal C., 2007.** Acidification improves cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* CF11. *J. Biotechnol.* **128** : 659-667.

## T

- **Talariko, M., Nobuhiko, K. and Toshinao, G. (1990).** Milk consumption does not affect body mass index but may have an unfavorable effect on serum total cholesterol in Japanese adults. *Nutr. Res.*, 27: 395–399.

- **Tamime A.Y., 2002.** Microbiology of starter cultures. In: Dairy microbiology handbook (Robinson R.K.). 3e Ed., John Wiley and Sons, Inc., New York. 261-366.
- **Temmerman R., Pot B., Huys G. et Swings J., 2003.** Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int. J. Food Microbiol.* **81** : 1-10.
- **Terzaghi, B et Sandine, W. F. (1975)** . Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl. Microbiol.*, **29**:807-813.
- **Thompson J K, Collins M A & Mercer W D. (1996).** Characterization of a proteinaceous antimicrobial produced by *Lactobacillus helveticus* CNRZ 450. *J. Appl. Bacteriol.*, **80**, 338-348.
- **Thompson J., Gentry-Weeks C.R., 1994.** Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques (De Roissart H. et Luquet F.M.). *Lorica, Uriage.* **1** : 239-290.
- **Titiek F.D., Endang S.R., Djoko W. et Slamet S., 1996.** Antimicrobial substance produced by *Lactobacillus* sp. TGR-2 isolated from *Growol*. *Indonesian. Food Nutr. Prog.* **3**(2) : 29-34.
- **Tosukhowong A., Nakayama J., Mizunoe Y., Sugimoto S., Fukuda D. et Sonomoto K., 2005.** Reconstitution and function of *Tetragenococcus halophila* chaperonin 60 tetradecamer. *J. Biosci. Bioengin.* **99** : 30-37.

#### V

- **Vandamme P., Pot B., Gillis M., De Vos P., Kersters K. et Swings J., 1996.** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. *Microbiol. Rev.* **60** : 407.

#### W

- **Williams A.G., Noble J. et Banks J.M., 2001.** Catabolism of amino acids by lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. *Int. Dairy J.* **11** : 203-215.

## **Annexe**

### Composition des milieux de cultures et solutions

#### **Milieu MRS (pH 6.5)**

Peptone	10g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	5g
Glucose	20g
Tween 80	1ml
Phosphate bipotassique	2g
Acétate de sodium	5g
Citrate d'ammonium	2g
Sulfate de magnésium, 7 H <sub>2</sub> O	0.2g
Sulfate de manganèse, 4 H <sub>2</sub> O	0.5g
Agar	15g
Eau distillée qsp	1000ml

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 15 min.

#### **Milieu M17 (pH 7.2)**

Peptone	10g
Extrait de viande	5g
Extrait de levure	5g
Glucose	20g
Acide ascorbique	0.5g
Sulfate de magnésium, 7 H <sub>2</sub> O	0.25g

## Annexe

---

B Glycérophosphate de sodium	19g
Agar	15g
Eau distillée qsp	1000ml

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 15 min.

### **Solution Nacl 9% :**

Nacl	9g
Eau distillée	1000ml

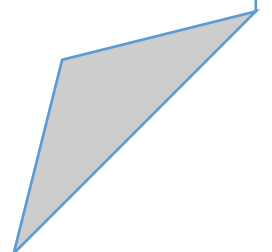
Stérilisation par autoclave à 120°C pendant 15 min.

### **Milieu MH pH (7,3)**

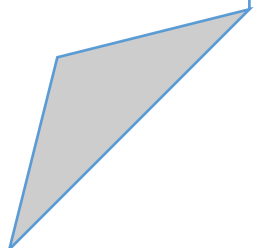
Extrait de viande	3g
Peptone	17,5g
Amidon	1,5g
Agar	16g
Eau distillée qsp	1000ml

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 15 min.

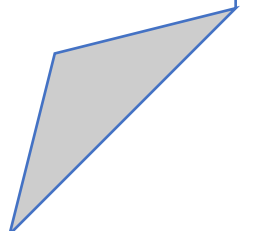
# Revue bibliographique



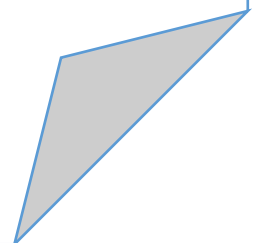
# Annexe



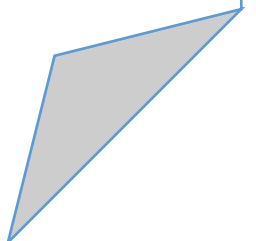
# Conclusion



# Matériels et Méthodes



# Résultats et Discussion



# Introduction

