

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE IBN KHALDOUN DE TIARET
INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES



Laboratoire de santé et pathologie animale

**Mémoire en vue de l'Obtention du Diplôme de
Magister**

Option: Hygiène et Qualité des Aliments D'origine Animale

Sujet

**Etude de l'activité antimicrobienne de bactéries lactiques vis à
vis des bactéries pathogènes**

Présenté par :
M^r Nahal Amir

Devant le jury :

Président : M ^r KIHAL. M	Professeur	Université Es Senia d'Oran
Rapporteur : M ^r AGGAD .H	Professeur	Université de Tiaret
Co-rapporteur : M ^r HAMMOUDI .A	Professeur	Université de Tiaret
Examineur :		
M ^r BEGHALIA.M	Maitre de conférences A	C. Universitaire de Tissemsilt
M ^r SASSI. M	Maitre de conférences A	Université de Tiaret
M ^{me} GHAZI .K	Maitre de conférences A	Université de Tiaret

Année universitaire : 2015-2016

Remerciements

Mes remerciements vont tout d'abord à mon encadreur Monsieur Aggad Hibib, Professeur Université de Tiaret pour son encadrement rigoureux et méthodique. Je lui adresse également ma gratitude pour son aide précieuse, par ses conseils fructueux, son soutien continu et ses encouragements permanents.

Je remercie aussi mon co-encadreur Monsieur Hammoudi Abdelhamid Maître de conférences, Université de Tiaret pour son encadrement rigoureux et par ses conseils.

Mes vives remerciements vont également à Monsieur KIHAL Mabrouk, Professeur, Université Es Senia d'Oran, de m'avoir fait le grand honneur d'accepter de présider ce jury.

Je tiens aussi à remercier vivement à Monsieur BEGHALIA Mohamed, Maître de conférences, Centre universitaire de Tissemsilt, Monsieur SASSI Mohamed, Maître de conférences, Université de Tiaret, Madame GHAZI Kheira,, Maître de conférences, Université de Tiaret, qui m'ont fait un grand honneur en acceptant d'être membres du jury de ce travail et de m'avoir accordé de leur temps si précieux pour apprécier et juger ce travail.

Je remercie Madame Moulay Meriem Maître de conférences, Université de Tiaret de m'avoir apporté tout l'aide possible pendant toute la durée de mon travail.

Je remercie Monsieur Mostafa ingénieur de laboratoire hygiène et pathologie animale et son équipe pour leur aide et leur disponibilité.

Je remercie l'équipe du laboratoire LMA de l'université Es Senia d'ORAN, en particulier le chef de laboratoire de m'avoir apporté tout l'aide possible pour arriver à réaliser ce travail.

J'exprime un remerciement particulier à toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin, encouragé, soutenu tout au long de toutes ces années, qu'elles se reconnaissent.

Dédicace

A mon père et ma mère

A mon frère

A mes grandes mères

A mes amis de promotions de magister HIDAOA et reproduction animale

A mes amis d'enfance Abdelkader , Abdelrahmen, Sabri

A tous ceux qui sont absents sur les lignes mais présents dans le cœur

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Résumé

Introduction1

Partie bibliographique

1-Les bactéries lactiques	2
1.1-Caractéristiques morphologiques et biochimiques	2
1.2-Principales voies fermentaires des bactéries lactiques	3
1.3-Classification	5
1.3.1- <i>Streptocoques et autres coques lactiques</i>	6
1.3.1.1- <i>Streptococcus</i>	7
1.3.1.2- <i>Lactococcus</i>	7
1.3.1.3- <i>Enterococcus</i>	7
1.3.2- <i>Pediococcus</i> et <i>Tetragenococcus</i>	8
1.3.2.1- <i>Pediococcus</i>	8
1.3.2.2- <i>Tetragenococcus</i>	8
1.3.3- <i>Leuconostoc</i> et <i>Weissella</i>	8
1.3.3.1- <i>Leuconostoc</i>	9
1.3.3.2- <i>Weissella</i>	9
1.3.4- <i>Lactobacilles</i>	9
2-Applications industrielles des bactéries lactiques	11
3-Les bactéries pathogènes	12
3.1- <i>Bacillus cereus</i>	12
3.2- <i>Escherichia coli</i>	14
3.3- <i>Salmonella</i>	14
3.4- <i>Staphylococcus aureus</i>	15
4- Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques	15
4.1-Acides organiques	16
4.2-Peroxydase	17
4.3-Dioxyde de carbone	17
4.4-Diacétyl	18
4.5-Les bactériocines	18
4.5.1-Définition et caractéristiques principales	18
4.5.2-Caractéristiques	19

4.5.3-Propriétés.....	19
4.5.4-Classification	20
4.5.5-Synthèse et régulation.....	22
4.5.6-Synthèse des bactériocines	22
4.5.7-Conditions de production.....	24
4.5.8-Facteurs influençant la production des bactériocines.....	24
4.5.9-Mode d'action	26
4.5.10-Les applications des bactériocines	27

Partie expérimentale

1-Matériel32

1.1-Appareillages.....	32
1.2-Milieus de culture	32
1.3-produits chimiques.....	32
1.4-bactéries utilisées dans cette étude	32
1.4.1-bactéries lactiques	32
1.4.2-Bactéries pathogènes	33

2-Méthodologies

2.1-Isolement de la souche S2a.....	33
2.2-Identification de la souche S2a.....	33
2.2.1-Critères morphologiques	33
2.2.1.1-Caractérisation macroscopique.....	33
2.2.1.2-Caractérisation microscopique	33
2.2.2-Test de catalase	34
2.2.3-Croissance à différentes températures.....	34
2.2.4-La thermorésistance.....	34
2.2.5- culture sur milieu hypersalé	34
2.2.6-Test au lait de Sherman.....	35
2.2.7-Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH).....	35
2.3-Revivification des souches lactiques.....	35
2.4-Etude de l'activité antibactérienne des souches.....	35
2.4.1-Méthode de double couche (méthode de Fleming <i>et al.</i> , 1975)	35
2.4.2-Méthode des puits (méthode de Barefoot et Kaenhammer, 1983).....	36
2.5-Production de l'acide lactique et pouvoir acidifiant	37
2.6-Etude de l'évolution de la croissance en culture mixte	37
2.7-La détermination des profils de sensibilité aux antibiotiques.....	39
2.8-Traitement statistique des résultats.....	39

Résultats et discussion

1-Isolement et purification de la souche <i>Streptococcus thermophilus</i>	40
2-Activité inhibitrice des souches lactiques	42
2.1-Interaction entre les bactéries lactiques.....	42
2.2-Interaction entre les souches lactiques et pathogènes.....	44

2.3-Inhibition due à l'acide lactique.....	47
2.4-Interaction par la méthode de puits ou de Barefoot et Kaenhammer (1983).....	49
3-Pouvoir acidifiant des souches lactiques.....	52
4-Etude de l'évolution de la croissance en culture mixte.....	54
4.1-Dénombrement de E.coli culture pure et mixte.....	54
4.2-Dénombrement de S.aureus culture pure et mixte	56
5-Détermination des profils de sensibilité aux antibiotiques des souches lactiques.....	59
Conclusion.....	62

Annexe

Référence

Liste des Abréviations

°C : Degré Celsius

°D : Degré dornic

ADH : Arginine Dihydrolase

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARNr : Acide Ribonucléique Ribosomique

ATCC : American Type Culture Collection

ATP : Adénosine triphosphate

B : Bacillus

E: Escherichia

En. : Enterococcus

g :gramme

h :heure

l,ml, µl : litre millilitre, microlitre

La. : Lactococcus

Lb. : Lactobacillus

Ln. : Leuconostoc

mm :millimètre

Pe : Pediococcus

pH : Potentiel d'Hydrogène

S : Staphylococcus

sp. : Espèce non précisée

ssp. : Sous espèce

St. : Streptococcus

Te : *Tetragenococcus*

UFC : Unité Formant Colonie

V/V : volume sur volume

Liste de tableaux

Tableau 01: Nouvelle classification de <i>B.cereus</i>	13
Tableau 02: Bactériocines des bactéries lactique impliqué dans la sécurité des fromages...	29
Tableau 03: Caractéristique de souche <i>S2a</i>	40
Tableau04 : Interaction entre les bactéries lactiques par la méthode de double couche à pH6.2, le diamètre de zone d'inhibition est mesuré en (mm).....	42
Tableau 05: Interaction entre les souches lactiques et pathogène par la méthode de double à pH 6,2. le diamètre de zone d'inhibition est mesuré en (mm).....	44
Tableau 06: Interaction par la méthode de Fleming <i>et al.</i> , (1975) sur milieu tamponnée pH 7, le diamètre de zone d'inhibition est mesuré en (mm).....	47
Tableau07 : Analyse de corrélation entre la croissance de souche <i>E. coli</i> en culture mixte et le pH de milieu.....	56
Tableau 08: Analyse de corrélation entre croissance de la <i>S.aureus</i> en culture mixte et la pH de milieu.....	58
Tableau09: Profils antibiorésistance des souches lactiques.....	59

Liste de figures

Figure 01: Illustration de la voie homofermentaire des bactéries lactiques.....	4
Figure 02: Illustration de la voie hétérofermentaire des bactéries lactiques.....	5
Figure03 : Arbre phylogénétique consensus, basé sur l'analyse comparative des séquences du gène16S rRNA, montrant la majorité de groupe phylogénétique des bactéries lactiques à faible pourcentage molaire dans leurs ADN en Guanine et Cytosine (mol% G+C) et les genres Gram positif non reliés <i>Bifidobacterium</i> et <i>Propionibacterium</i>	6
Figure 04 : Séquence et structure de lantibiotiques de type A (Nisine), B (Mersacidine) et d'un lantibiotique « two-peptides » (Lacticine 3147 A1 et A2) — Sequence and structure of a type A lantibiotic (Nisin), a type B lantibiotic (Mersacidin) and a « two-peptides » lantibiotic (Lacticin 3147 A1 and A2).....	21
Figure 05: Schéma de biosynthèse, de sa régulation et d'immunité de la souche productrice pour la <i>nisine</i>	23
Figure06 : Mode d'action des bactériocines de bactéries lactiques	27

Figure07 : Méthodes utilisées pour la recherche des substances antimicrobienne. (a) méthode de la double couche, (b) méthode de diffusion en puits.....	36
Figure08 : Les différentes étapes de la cinétique de croissance et d'acidification.....	38
Figure 09: Aspect microscopique de la souche S2a après la coloration du gram.....	41
Figure 10 : Croissance de la souche S2a dans le bouillon et la gélose.....	41
Figure 11 : Interaction entre les bactéries lactiques par la méthode de double couche à pH6(A) <i>St.thermophilus</i> ; (B) <i>lc.lactis</i> Ma1.....	43
Figure 12 : Interaction par la méthode de Fleming <i>et al.</i> , (1975) à pH 6,2. (A) <i>S.aureus</i> ATCC25923 ; (B) <i>Pseudomonas aerogenosa</i> ATCC27853.....	45
Figure 13: Interaction par la méthode de Fleming <i>et al.</i> , (1975) sur milieu tamponnée à pH 7. (A) <i>S.aureus</i> ATCC25923 ; (B) <i>Pseudomonas</i> ATCC27853.....	48
Figure 14 : Interaction par la méthode de Barefoot et Klaenhammer (1983) (A) : <i>E.coli</i> ATCC1053 et (B) : <i>S.aureus</i> ATCC25923.....	51
Figure 15 : Cinétique d'acidification par les souches lactiques.....	52
Figure16 : Cinétique de la production d'acide lactique par les souches lactiques.....	53
Figure 17: Cinétique de croissance en culture pure et mixte de E.coli et Rs6 : <i>leuconostoc mesenteroides</i> ;Ma1 : <i>lactococcus lactis</i> ; D17 : <i>lactococcus lactis</i> biovar diacetylactis.....	55
Figure 18 : Pouvoir acidifiant en culture pure et mixte de E.coli et Rs6 : <i>leuconostoc mesenteroides</i> ;Ma1 : <i>lactococcus lactis</i> ; D17 : <i>lactococcus lactis</i> biovar diacetylactis.....	55
Figure19 : Cinétique de croissance en culture pure et mixte de <i>S.aureus</i> et Rs6 : <i>leuconostoc mesenteroides</i> ;Ma1 : <i>lactococcus lactis</i> ; D17 : <i>lactococcus lactis</i> biovar diacetylactis.....	57
Figure 20: Pouvoir acidifiant en culture pure et mixte de <i>S.aureus</i> et Rs6 : <i>leuconostoc mesenteroides</i> ;Ma1 : <i>lactococcus lactis</i> ; D17 : <i>lactococcus lactis</i> biovar diacetylactis.....	57
Figure 21: Profil antibiorésistance de la souche <i>streptococcus thermophilus</i>	61

Résumé

L'effet de six souches lactiques, deux souches *Lactococcus lactis*, une souche de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* biovar *diacetylactis*, *Leuconostoc méserteroides*, *Leuconostoc méserteroides* subsp *dextranicum* et *Streptococcus thermophilus* ont été testées contre douze souches pathogènes. Les essais de l'activité antibactérienne par la méthode de double couche ont montré que les souches lactiques sont actives contre les souches pathogènes. Cependant, la méthode des puits n'ont montré aucune zone malgré de nombreuses répétitions.

Nous avons remarqué que les bactéries lactiques présentent une production progressive en acide lactique, cette dernière est accompagnée d'un abaissement du pH du milieu.

L'étude de l'évolution de la croissance en culture mixte a été réalisée dans du lait écrémé ; après 48h, le dénombrement de *E.coli ATCC10536* atteint 5,50 ; 4,95 et 0 log ufc/ml avec les souches lactiques *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus lactis* , *Lactococcus lactis* subsp *lactis* biovar *diacetylactis* respectivement. En culture mixte après 48h, le dénombrement de *S.aureus ATCC25923* atteint 4.67 ;3.49 et 0 log ufc/ml avec les souches lactiques *Leuconostoc mesenteroides* , *Lactococcus lactis* ,*Lactococcus lactis* subsp *lactis* biovar *diacetylactis* respectivement.

En tenant compte de leur activité et de leur large spectre d'activité contre les bactéries indésirables, ces souches lactiques pourraient être des candidats potentiels utilisables dans la bio-conservation des produits alimentaires .

Mots clés : bactéries lactiques, activité antibactérienne, bactériocinogène, culture mixte.

Abstract

Six strains of lactic acid bacteria, two strains of *Lactococcus lactis*, a *Lactococcus lactis* *supb lactis* biovar *diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides* *supb dextranicum* and *Streptococcus thermophilus* were tested against twelve pathogenic strains. The tests of antibacterial activity by the spot-on-lawn method showed activity of lactic acid bacteria strains against the pathogenic strains. However, an agar well diffusion method on the supernatant did not reveal a bacteriocinogene activity.

We noticed, the lactic acid bacteria have a progressive production of lactic acid. The latter is accompanied by a lowering of the pH of the medium.

The study of the evolution of growth in co-culture; after 48 hours, the enumeration of *E.coli* ATCC10536 reached 5.50; 4.95 and 0 log cfu / ml with lactic strains *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis* respectively, and After 48 hours, in mixed culture enumeration of *S. aureus* ATCC25923 reached 4.67; 3.49 and 0 log cfu / ml with lactic acid bacteria strains *leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis* respectively.

Considering their activity and their broad spectrum of activity against unwanted bacteria, these lactic strains could be potential candidates for use in the bioconservation food .

Keywords: lactic acid bacteria, antibacterial, bacteriocinogene, mixed culture.

أظهر اختبار النشاط يريدي *lactococcus lactis*, *lactococcus lactis subsp lactis biovar diacetylactis*, *leuconostoc mesenteroides*, *leuconostoc mesenteroides subsp dextranicum* ضد اثنا عشرة عزلة ممرضة. أوضحت التجارب بطريقة طبقتين للجلاتين قدرة البكتيرية اللبنية على نشاطية تثبيطية للعزلة ممرضة؛ لكن بطريقة الأبيار المغروزة لم تظهر أي تثبيط للعزلة ممرضة.

لبكتيري ية قدرة كبيرة على مما يؤدي pH .
دراسة ظاهرة الـ 48 ساعة من التحضين تناقص نمو البكتيرية *E.coli ATCC10536*
leuconostoc mesenteroides, *lactococcus lactis* , البكتيرية اللبني 0 ; 4.95 et 5.50 log ufc/ml
lactococcus lactis biovar diacetylactis بالترتيب.

دراسة ظاهرة التضاد في 48 ساعة من التحضين تناقص نمو البكتيرية *S.aureus ATCC 25923*
leuconostoc mesenteroides, *lactococcus lactis* البكتيرية اللبني 0 ; 3.49 et 4.67 log ufc/ml
lactis , *lactococcus lactis biovar diacetylactis* بالترتيب.

نظرا لقدرتها التثبيطية العالية للعزلة ممرضة ، البكتيري اللبنية المستعملة في هذه الدراسة قد يكون لها دور فعال في الحيوي للمواد الغذائية .

الكلمات المفاتيح : يريدي لبني، نشاطية تثبيطية, الحيوي.

Introduction

Introduction

Actuellement le phénomène de l'antibiorésistance représente un problème pour certaines maladies ou intoxications alimentaires d'origine bactériennes.

Pour faire face à ce problème, les études récentes se sont orientées vers la recherche de substances naturelles comme les bactériocines produites par les bactéries lactiques.

De plus, les bactéries lactiques sont largement utilisées dans l'industrie alimentaire, en tant que starters dans les procédés de fermentations afin de répondre aux exigences croissantes des consommateurs en produits alimentaires moins traités et exempts de conservateurs chimiques.

Leur apports bénéfiques consistent à en l'amélioration de la qualité des produits fermentés en y développant certaines caractéristiques organoleptiques, sans altérer ni le goût ni l'odeur, et en augmentant leur durée de conservation. Cette préservation est conférée par la production de plusieurs métabolites ayant une activité antimicrobienne tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, la reutéline, le diacétyl et les bactériocines (Dortu et Thonart, 2009; Moraes *et al.*, 2010).

Les bactériocines sont des peptides ou protéines produites par des genres bactériens possédant des activités antimicrobiennes, habituellement spécifiques et contre les bactéries des espèces apparentées, sans être létales à la souche productrice (Bayoub *et al.*, 2006).

Aujourd'hui les bactériocines des bactéries lactiques sont utilisés pour le bio-control de divers agents responsables de toxi-infectieux alimentaires démontrée par plusieurs auteurs, après expression vis-à-vis d'une bactérie cible appartenant le souvent aux genres suivants *Staphylococcus aureus*, *listéria monocytogène*, *Escherichia coli*, *salmonella spp*, *clostridium botulinum*, *bacillus cereus* (Hampikyan *et al.*, 2009 ; Gao *et al.*, 2008).

L'objectif de ce travail vise la sélection de certaines bactéries lactiques en vue d'étudier les interactions contre des germes pathogènes dans le but de sélectionner des souches inhibitrices ayant un pouvoir inhibiteur et éventuellement déterminer la nature des substances inhibitrices.

Partie bibliographique

Introduction

Actuellement le phénomène de l'antibiorésistance représente un problème pour certaines maladies ou intoxications alimentaires d'origine bactériennes.

Pour faire face à ce problème, les études récentes se sont orientées vers la recherche de substances naturelles comme les bactériocines produites par les bactéries lactiques.

De plus, les bactéries lactiques sont largement utilisées dans l'industrie alimentaire, en tant que starters dans les procédés de fermentations afin de répondre aux exigences croissantes des consommateurs en produits alimentaires moins traités et exempts de conservateurs chimiques.

Leur apports bénéfiques consistent à en l'amélioration de la qualité des produits fermentés en y développant certaines caractéristiques organoleptiques, sans altérer ni le goût ni l'odeur, et en augmentant leur durée de conservation. Cette préservation est conférée par la production de plusieurs métabolites ayant une activité antimicrobienne tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, la reutéline, le diacétyl et les bactériocines (Dortu et Thonart, 2009; Moraes *et al.*, 2010).

Les bactériocines sont des peptides ou protéines produites par des genres bactériens possédant des activités antimicrobiennes, habituellement spécifiques et contre les bactéries des espèces apparentées, sans être létales à la souche productrice (Bayoub *et al.*, 2006).

Aujourd'hui les bactériocines des bactéries lactiques sont utilisés pour le bio-control de divers agents responsables de toxi-infectieux alimentaires démontrée par plusieurs auteurs, après expression vis-à-vis d'une bactérie cible appartenant le souvent aux genres suivants *Staphylococcus aureus*, *listéria monocytogène*, *Escherichia coli*, *salmonella spp*, *clostridium botulinum*, *bacillus cereus* (Hampikyan *et al.*,2009 ; Gao *et al.*,2008).

L'objectif de ce travail vise la sélection de certaines bactéries lactiques en vue d'étudier les interactions contre des germes pathogènes dans le but de sélectionner des souches inhibitrices ayant un pouvoir inhibiteur et éventuellement déterminer la nature des substances inhibitrices.

1-Les bactéries lactiques

Le terme de bactéries lactiques est intimement associé aux bactéries impliquées dans la fermentation des aliments pour l'homme et l'animal. La première culture pure était des *Bacterium lactis* – probablement des *Lactococcus lactis*, obtenue par Lister en 1873.

Historiquement, les genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus* ont été les premiers à être décrits (Axelsson, 2004).

1.1- Caractéristiques morphologiques et biochimiques

Le groupe des bactéries lactiques a été défini par Orla-Jensen (1919) et réunit plusieurs genres caractérisés par leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique. Ce sont des coques ou bâtonnets Gram positif, généralement immobiles et non sporulés. Il existe d'autres bactéries produisant de l'acide lactique mais qui ne sont pas considérées comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques. C'est le cas, par exemple, de *Bacillus* et *Sporolactobacillus* qui sont des bactéries Gram (+) sporulées (Axelsson, 2004).

Les bactéries lactiques ne possèdent ni nitrate réductase, ni catalase, ni cytochrome oxydase mais elles peuvent survivre en présence d'oxygène. L'absence de catalase est caractéristique, mais certaines espèces acquièrent cette activité sur des milieux riches en hème (Larpen *et al.*, 1997 ; Bourgeois *et al.*, 1996).

Le manganèse joue un rôle important pour les bactéries lactiques en les protégeant de la toxicité de l'oxygène, accumulé dans la cellule, cet élément est comparable au superoxyde dismutase qui décompose les superoxydes.

Le manganèse composant des épices stimule la production d'acide lactique par les cultures starters (Hagen *et al.*, 2000) . Le métabolisme des bactéries lactiques dépend des quantités du Mn^{2+} présent dans le milieu de culture et le besoin en Mn^{2+} diffère d'une espèce lactique à l'autre. Dans la viande, le taux en manganèse est faible et l'addition de Mn^{2+} peut stimuler considérablement la croissance des lactobacilles durant la fermentation (Leroy *et al.*, 2004).

1.2-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 . Il s'agit des voies homofermentaire (Embden- Meyerhof-Parnas, EMP) et hétérofermentaire (voie des pentoses-phosphate) (Atlan *et al.*, 2008).

➤ Voie homofermentaire ou EMP

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

Le pyruvate est dans une dernière étape réduit en acide lactique qui est le produit unique: c'est la fermentation homolactique. Dans les conditions défavorables telles la limitation du glucose, ces bactéries produisent également l'acide formique, l'acide acétique, l'éthanol et/ou le CO₂ par la voie de fermentation des acides mixtes (Mozzi et al., 2010) .

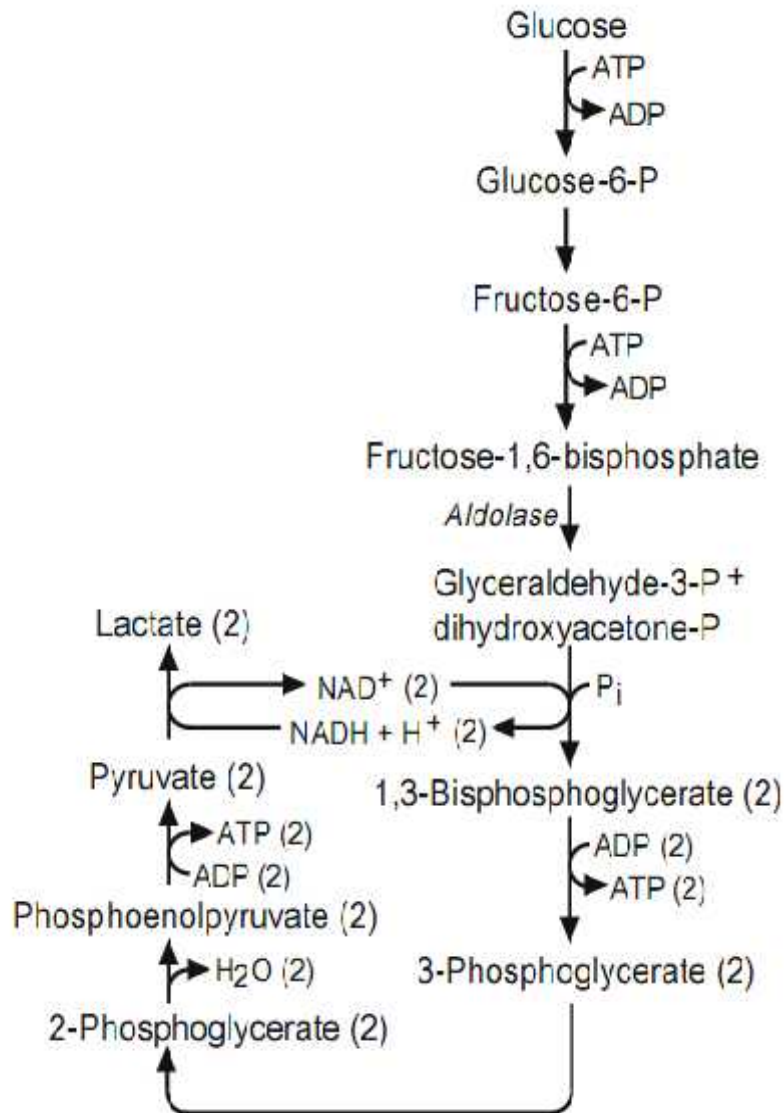


Figure 01: illustration de la voie homofermentaire des bactéries lactiques

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_2 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 (Thompson et Gentry- Weeks, 1994).

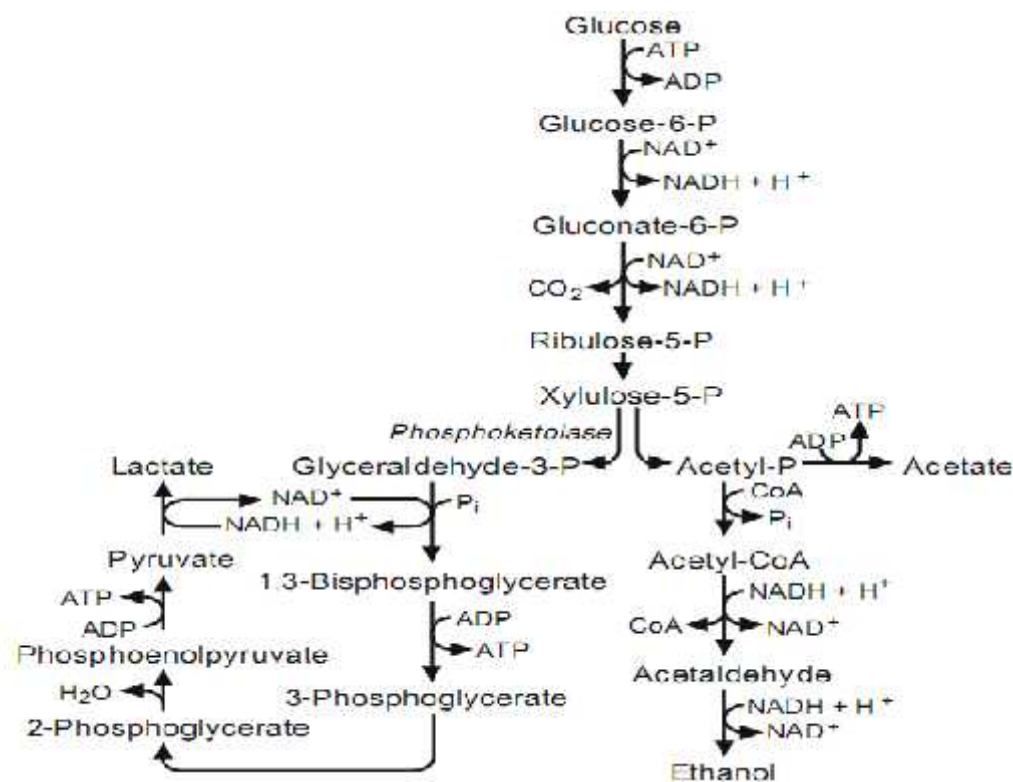


Figure 02: illustration de la voie hétérofermentaire des bactéries lactiques.

1.3-Classification

La première classification des bactéries lactiques a été établie en 1919 par Orla- Jensen. Elle est basée sur les caractéristiques observables telles que les propriétés morphologiques, biochimiques et physiologiques. Les marqueurs chimio-taxonomiques, comme la composition des acides gras et les constituants de la membrane cellulaire, ont été également utilisés pour la classification (Krieg, 2001).

D'après Ludwig *et al.* (2008), le phylum *Firmicutes* comprend trois classes :

Bacilli, *Clostridia* et *Erysipelotrichi*.

Les bactéries lactiques sont divisées en trois familles :

- Famille des *Lactobacillaceae* comportant: *Lactobacillus*, *Paralactobacillus*
- Famille des *Leuconostocaceae* contenant : *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*.
- Famille des *Streptococcaceae* comprenant : *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Lactovum*.

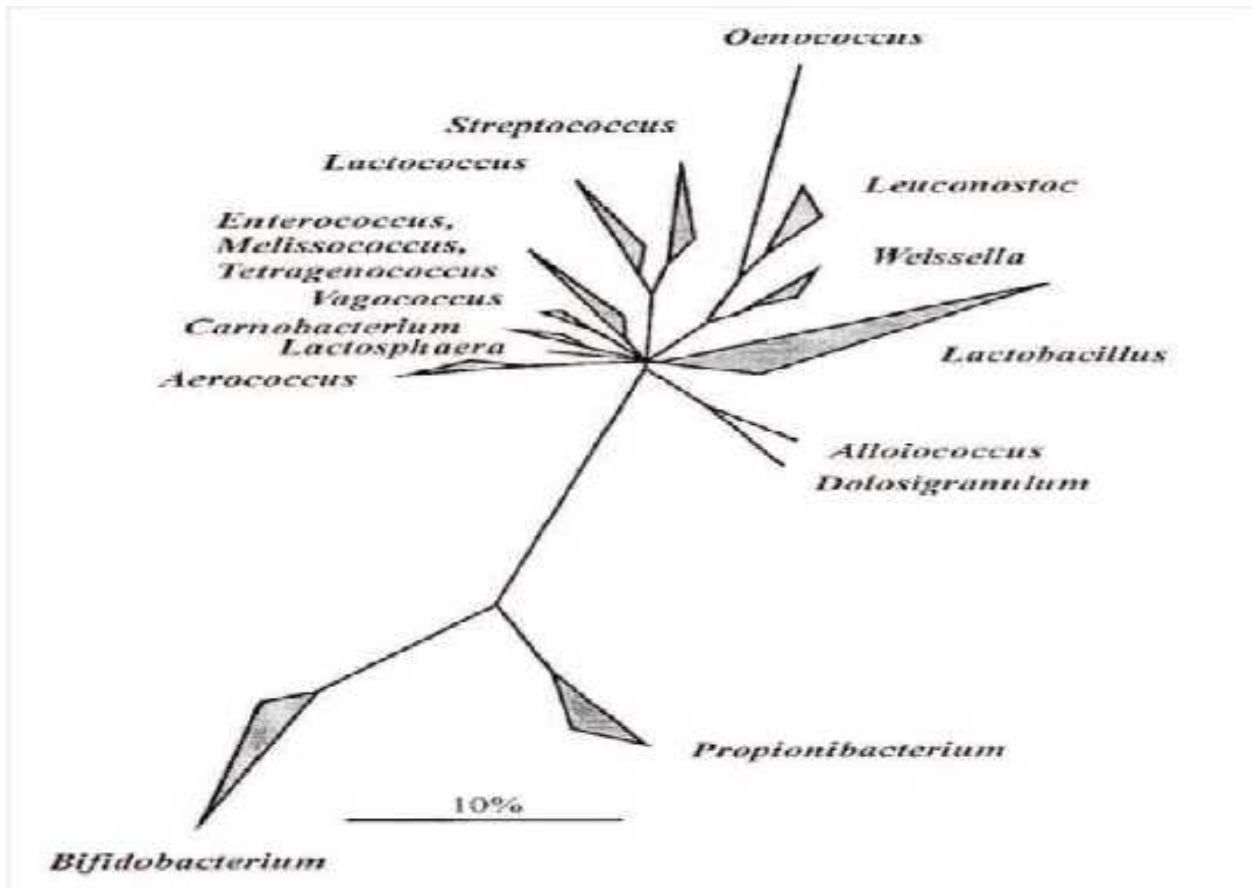


Figure03 : Arbre phylogénétique consensus, basé sur l'analyse comparative des séquences du gène 16S rRNA, montrant la majorité de groupe phylogénétique des bactéries lactiques à faible pourcentage molaire dans leurs ADN en Guanine et Cytosine (mol% G+C) et les genres Gram positif non reliés *Bifidobacterium* et *Propionibacterium* (Holzapfel *et al.*, 2001)

1.3.1-Streptocoques et autres coques lactiques

Les genres *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* et *Vagococcus* étaient précédemment inclus dans un seul genre : *Streptococcus*. Ce sont des coques en paire ou en chaîne, Gram +, catalase (-), non sporulés, immobiles et anaérobies facultatifs.

1.3.1.1- *Streptococcus*

La seule espèce de streptocoques qui soit utilisée en technologie alimentaire est *Streptococcus thermophilus*. Cette espèce est l'un des deux ferments (avec *Lactobacillus delbrückii* ssp *bulgaricus*) impliquée pour la dénomination yaourt en législation françaises et pour certains fromages. Les *St. thermophilus* ont été inclus dans le groupe des « autres streptocoques » (Scheilfer, 1987) mais ensuite, transférés au groupe des streptocoques oraux à cause de leur degré d'homologie avec l'ADN de *St. salivarius* (Haddie *et al.*, 1995).

Cette espèce est caractérisé par la résistance à la température, la capacité à 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 *et al.*, 1986).

1.3.1.2- *Lactococcus*

Les lactocoques sont étroitement associés aux produits laitiers, mais seuls les *Lactococcus lactis* sont actuellement utilisés dans la technologie laitière (Teubet *et al.*, 1995). Trois sous-espèces de *Lc. lactis* peuvent être distinguées : *Lc. lactis* ssp. *lactis*, *Lc. lactis* ssp. *cremoris* et *Lc. lactis* ssp. *hordniae*. Seules les deux premières sont importantes dans la fabrication des produits laitiers. Les *Lc. lactis* ssp. *lactis* incluent les espèces qui étaient autrefois désignées *St. lactis* ssp. *lactis*, *St. lactis* ssp. *diacetylactis* (Schleifer *et al.*, 1987). Le groupe *Lc. lactis* ssp. *cremosis* comporte les espèces précédemment désignées *St. cremoris* ou *St. lactis* ssp. *cremoris* qui se différencient de *Lc. lactis* ssp. *lactis* par l'incapacité à croître à 40 °C mais peuvent se développer dans un milieu à 4 % de *NaCl*, peuvent hydrolyser l'arginine et fermenter le ribose. Les sous-espèces *lactis* et *cremoris* de *Lc. lactis* sont également séparées par les études d'homologie ADN – ADN et de comparaison des séquences des ARNr 16S. Les caractéristiques biochimiques par exemple l'utilisation des sucres peuvent être utilisées pour distinguer les espèces de lactocoques ainsi que les méthodes génétiques (Axelsson *et al.*, 2004).

1.3.1.3- *Enterococcus*

Le genre *Enterococcus* regroupe les streptocoques fécaux qui présentent une hémolyse de type λ , β , et qui appartiennent au groupe sérologique D. Ce sont des commensaux de l'intestin, les espèces rencontré dans alimentation sont essentiellement *En. faecalis* (auparavant *Streptococcus faecalis*), et ses variétés (*En.durans* et *En. bovis*).

Les *Enterococcus* sont les bactéries lactiques les plus controversées. Plusieurs études sur la microflore des fromages traditionnels des pays méditerranéens ont montré que les entérocoques jouaient un rôle important dans la maturation des fromages, probablement au travers de la protéolyse et de la lipolyse d'où leur contribution à la flaveur des produits. Ces bactéries sont également trouvées dans les autres produits fermentés tels que les saucisses et les olives (Franz *et al.*, 2003).

1.3.2- *Pediococcus* et *Tetragenococcus*

1.3.2.1- *Pediococcus*

Sept espèces de *Pediococcus* sont connues : *Pe. acidilactici*, *Pe. damnosus*, *Pe. dextrinicum*, *Pe. inopinatus*, *Pe. parvutus*, *Pe. pentosaceus* et *Pe. urinaeequi*. Collins *et al.* (1990)

Les pédiocoques sont également des bactéries lactiques autochtones qui permettent la maturation des fromages (Gonzalez *et al.*, 2007). Les caractéristiques principales pour distinguer les espèces sont : la gamme des sucres fermentés, l'hydrolyse de l'arginine, la croissance à différents pH (de 4,5 à 7,0), et la conformation de l'acide lactique produit. Les *Pe. pentosaceus* et *Pe. acidilactici* sont difficiles à distinguer entre eux par ces caractéristiques mais peuvent être différenciés par l'ARNr 16S (Benito *et al.*, 2008).

1.3.2.2- *Tetragenococcus*

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

1.3.3- *Leuconostoc* et *Weissella*

Les caractéristiques telles que les modes de fermentation des hydrates de carbone, la formation du dextrane, l'hydrolyse de l'esculine, les conditions de croissance, la capacité à croître à différents pH et températures, l'assimilation du citrate et/ou malate, permettent la différenciation entre les *Leuconostoc* et *Weissella*.

1.3.3.1- *Leuconostoc*

Les *Leuconostoc* sont hétérofermentaires voie des hexoses monophosphate. Ils produisent de l'acide lactique, du CO_2 et de l'éthanol. Ce sont des coques groupés en paires ou en chaînes, catalase (-) (Larpent *et al.*, 1997). Leur température optimale de croissance se situe entre 25 °C et 30 °C. Leur croissance est toujours lente. Le développement des *Leuconostoc* entraîne souvent l'apparition d'une viscosité dans le milieu (Guiraud *et al.*, 2003).

Dans l'industrie laitière, les *Leuconostoc*, principalement les *Ln. mesenteroides* ssp. *cremoris*, sont utilisés pour produire des substances aromatiques telles que diacétyl et acétoïne à partir des citrates du lait. (Budde *et al.*, 2003)

pour la bioconservation des produits carnés emballés sous vide et entreposés au froid, contre les *Listeria monocytogenes*. Ce genre est également important dans les fermentations naturelles des produits d'origine végétale, par exemple la choucroute ou le kimchi (Eom *et al.*, 2007).

1.3.3.2- *Weissella*

les espèces du genre *Weissella* sont constituées de courts bacilles, de coccobacilles ou des coques ovoïdes, à Gram positif, se présentant de manière isolée ou groupés par deux ou en courtes chaînes, non sporulés, immobiles, catalase négative (*Weissella paramesenteroïdes* peut produire une pseudocatalase lorsqu'elle est cultivée sur un milieu pauvre en glucose), oxydase négative, aéro-anaérobies ou micro-aérophiles, chimio-organotrophes, hétérofermentaires stricts, cultivant à 15 °C, ayant des exigences nutritionnelles complexes.

1.3.4-Lactobacilles

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

Il s'agit de bacilles souvent allongés, Gram +, non sporulés, parfois groupés en paires ou en chaînes, généralement immobiles. Ils sont catalase (-) (certains ont une pseudo-catalase mais sont benzidine (-), micro-aérophiles ou anaérobies. Ils ont un métabolisme fermentaire produisant de l'acide lactique. Certaines espèces sont homolactiques, d'autres hétérolactiques produisant des acides volatils, de l'éthanol et du CO_2 en plus de l'acide lactique.

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

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

➤ Groupe I ou *Thermobacterium*

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

➤ Groupe II ou *Streptobacterium*

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

➤ Groupe III

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

Les lactobacilles sont très utilisés dans l'industrie agroalimentaire (en laiterie, fromagerie, charcuterie, dans la fabrication de la choucroute). Dans les yaourts, les *Lb. bulgaricus* forment des peptides utilisés ensuite par les *Streptococcus thermophilus*. L'arôme du yaourt est dû à l'acétaldéhyde formé à partir de la thréonine par l'aldolase de *Lb. bulgaricus*. Divers lactobacilles (*Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*) interviennent pendant l'affinage des fromages. Les *Lb. helveticus*, *Lb. lactis* et *Lb. bulgaricus* agissent avec les *Streptococcus thermophilus* dans les fromages à pâte cuite.

A propos du kéfir, les *Lactobacillus kefir*, *Lb. kefiranofaciens* et les autres lactobacilles mésophiles ont démontrés leur contribution à la fabrication du produit. Le rôle des lactobacilles est également important dans la fermentation des fruits et légumes (raisin, choucroute, cornichon) (Edwards *et al.*, 2000).

2-Applications industrielles des bactéries lactiques

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

➤ Dans le domaine thérapeutique :

étant des probiotiques, les bactéries lactiques apportent des bénéfices à l'hôte en conférant une balance de la microflore intestinale, et en jouant également un rôle important dans la maturation du système immunitaire (Yateem *et al.*, 2008). Différentes études ont démontré le rôle préventif aussi bien que curatif de ces bactéries sur plusieurs types de diarrhées (Mkrтчhyan *et al.*, 2010). D'autres ont cité leur capacité de diminuer les allergies liées aux aliments grâce à leur activité protéolytique (El-Ghaish *et al.*, 2011). Uehara *et al.*, (2006) ont démontré la capacité des souches de *Lactobacillus crispatus*, utilisées sous forme de suppositoires pour empêcher la colonisation du vagin par les bactéries pathogènes et de prévenir ainsi les rechutes chez les femmes qui souffrent d'inflammations fréquentes et répétées de la vessie.

➤ Dans l'industrie alimentaire

Les bactéries lactiques sont impliquées dans la fermentation et la bioconservation de différents aliments. Ainsi, les souches de *Lactobacillus bulgaricus*, *Sterptococcus thermophilus* sont utilisées pour la production du yaourt, des fromages et des laits fermentés (Yateem *et al.*, 2008). Le vin, les poissons, les viandes, les charcuteries, le pain au levain entre autres sont aussi des produits de fermentation par des bactéries lactiques (Badis *et al.*, 2005). L'utilisation de ces dernières a pour but l'amélioration des caractéristiques organoleptiques des produits fermentés et l'augmentation de leur durée de conservation sans l'utilisation de conservateurs chimiques grâce aux substances antimicrobiennes qu'elles secrètent (Dortu et Thonart, 2009). Les souches utilisées en industrie alimentaire doivent répondre à certains critères : absence de pathogénicité ou activitétoxique, capacité d'améliorer les caractéristiques organoleptiques, capacité de dominance, facilité de culture et de conservation, et maintenance des propriétés désirables durant le stockage (Marth et Steele, 2001).

3-Les bactéries pathogènes

3.1-*Bacillus cereus*

Bacillus cereus est un long bacille de forme régulière et souvent en courte chaîne, Gram + qui est mobile, aéro-anaérobie facultatif et qui forme des spores non déformantes. Les *B. cereus* se développent sur des géloses ordinaires. Les colonies ainsi obtenues sont grisâtres, larges avec des contours irréguliers.

En galerie Api 20 E, les *B. cereus* possèdent les caractères suivants : VP+, citrate+, gélatinase+. Sur gélose au sang de mouton ils possèdent une large hémolyse (Guinebretière *et al.*;2008)

Une étude de Guinebretière en 2008 a permis la réalisation d'une nouvelle classification, cette dernière est basée sur les habitats, les limites de températures et les pouvoirs pathogènes. Ainsi, 7 grands groupes peuvent être définis.

Tableau 01: Classification de *B.cereus* (Guinebretiére *et al* ;2008).

Groupes phylogénétiques	Espèces du groupe <i>Bacillus cereus</i>	Profils thermiques de croissance	Cytotoxicité
Groupe I	<i>B. pseudomycoïdes</i>	Mésophiles (de 10 à 43°C)	Aucune observée
Groupe II	<i>B. thuringiensis</i> II <i>B. cereus</i> II	Psychrotolérantes (de 7 à 40°C)	Toxines diarrhéiques
Groupe III	<i>B. thuringiensis</i> III <i>B. cereus</i> III <i>B. anthracis</i>	Mésophiles (de 15 à 45°C)	Toxines diarrhéiques et émétiques Anthrax
Groupe IV	<i>B. thuringiensis</i> IV <i>B. cereus</i> IV	Mésophiles (de 10 à 45°C)	Toxines diarrhéiques
Groupe V	<i>B. thuringiensis</i> V <i>B. cereus</i> V	Mésophiles intermédiaires (de 8 à 40°C)	Toxines diarrhéiques
Groupe VI	<i>B. weihenstephanensis</i> <i>B. mycoïdes</i> <i>B. thuringiensis</i> VI	Psychrotolérantes (de 5 à 37°C)	Aucune observée
Groupe VII	<i>B. cereus</i> VII	Thermotolérantes modérées (de 20 à 50°C)	Toxines diarrhéiques

B. cereus fait partie des 4 plus importantes causes d'intoxication alimentaire commune (TIAC) en France (Albert *et al.*, 2009).

Il existe trois types de toxines produites par *B. cereus* capables d'induire des syndromes diarrhéiques : la Nhe (entérotoxine non hémolytique), Hbl (Hémolysine BL) et Cyt K (cytotoxine K) (Samapundo *et al* ; 2011). Ces entérotoxines impliquées dans des TIAC sont produites lors de la phase de croissance végétative des *B. cereus* dans le petit intestin de la personne contaminée (Granum *et al* ; 1997).

Les bactéries peuvent contaminer les produits par le biais des matières premières mais aussi lors des processus de fabrication en industrie.

En effet, il a été montré que les spores de *B. cereus* sont très difficiles à éliminer. Les aliments les plus décrits pouvant être altérés sont les œufs et le lait pasteurisé.

Dans le lait, les protéinases vont provoquer un clivage des caséines provoquant une désorganisation des micelles de caséine entraînant une coagulation du lait (Chen *et al* 2003). L'activité protéolytique provoque alors un défaut dans le caillage (De Jonghe *et al* 2010). L'activité des protéinases est maximale lorsque le pH est alcalin (Chen *et al* 2004).

Dans les ovoproduits, les bactéries du groupe *B. cereus* sont également responsables d'altération. Les bactéries produisent des lipases et des protéases qui vont être responsables d'une coagulation et d'une décoloration de ces derniers (Baron *et al.*, 2010).

3.2-*Escherichia coli*

Les souches d'*Escherichia coli* sont rarement pathogènes, à l'exception de certaines souches qui causent des diarrhées dans les pays en voie de développement, où elles touchent surtout les enfants. Ces bactéries infectent également les voyageurs venant de pays industrialisés (Nauciel et Vildé, 2005). *Escherichia coli* est un commensal normal de l'intestin de l'homme et de l'animal. La bactérie se répand dans l'environnement par la voie des excréments, la présence d'*E. coli* dans les eaux et les aliments est le témoin d'une contamination fécale, la transmission se fait par voie féco-orale (Goubau et Pellegrims, 2000).

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

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

3.3-*Salmonella*

La salmonellose (gastro-entérite à *Salmonella*) est causée par plus de 2000 sérovars de *Salmonella*, provoquant des symptômes fréquents, dont les douleurs abdominales, diarrhées, qui durent de quelques jours à quelques semaines.

La salmonellose la plus fréquente est due à *Salmonella Typhimurium* (Prescott *et al.*, 2003) : rencontrée dans tous les pays, elle est isolée chez l'homme, les animaux et dans l'environnement et occupe la première place dans l'étiologie des toxi-infections alimentaires (Avril *et al.*, 1992) .

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

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

3.4-Staphylococcus aureus

Le genre *Staphylococcus* appartient à la famille des *Staphylococcaceae* : ce sont des coques en amas, à coloration de Gram positive, oxydase positive et catalase positive.

Les espèces du genre *Staphylococcus* sont très ubiquitaire. Les espèces de *Staphylococcus* sont présentes sur la peau et les muqueuses des animaux à sang chaud et des humains, le sol, l'air et l'eau. Elles font partie des communautés microbiennes des laits, des produits fermentés, des fromages et des produits de salaison (Nagase *et al.*, 2001 ; Zadoks *et al.*, 2002). Les Toxi-Infections Alimentaires (TIA) peuvent être occasionnées par l'ingestion d'aliments contenant des entérotoxines staphylococciques produites par certaines souches de *S. aureus* (Vernozy-Rozand *et al.*, 1996).

Les symptômes d'intoxication apparaissent très rapidement après l'ingestion (1-6 h) et se traduisent par des vomissements, des diarrhées et des douleurs d'estomac. Une Toxi-infection Alimentaire Collective (TIAC) est suspectée si plus d'une personne présente les symptômes.

La fréquence des TIAC due à *S. aureus* est difficile à évaluer mais certains auteurs (Haeghebaert *et al.*, 2002) estiment que, 16% des TIAC déclarées seraient dues à *S. aureus* sans causer de décès.

4- Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques connues par l'aptitude de synthèse des substance antimicrobiennes, des études ont été porté sur les antimicrobiennes produits par les bactéries lactique et associés des bactéries propioniques et bifidobactéries (Galvez *et al.*, 2010). Parmi les propriétés des bactérie lactiques est l'augmentation de conservation des aliments par la production des métabolites antimicrobiennes tels que les acides organiques, le peroxyde de d'hydrogène, le dioxydes de carbone, le diacétyl et les bactériocines (Dortu *et al.*,2009).

4.1-Acide organique

La production de l'acide lactique et de l'acide acétique et la diminution consécutive du pH sont de loin les plus importants facteurs d'inhibition (Adams *et al.*, 2008). Après la fermentation des hexanes, l'acide lactique est produit par homofermentation, dans le cas d'une hétéro fermentation, des quantités équimolaires d'acide lactique, acétique, éthanol et de CO₂ seront produites (Ouweland *et al.*, 2004).

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

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

Et d'après Salminen *et al.*, 1998 les acides faibles ont une activité antimicrobienne plus importante à pH bas qu'à neutre. La force d'un acide dépend de son degré de dissociation, quand le pH = pKa d'un acide la moitié de l'acide est dissocié, si le pH augmente, la dissociation augmente de même.

A cause de sa constante de dissociation plus élevée, l'acide acétique montre une inhibition plus forte que l'acide lactique à une concentration molaire et à une valeur de pH donnée (Taylor *et al.*, 2005).

La forte activité antimicrobienne des acides acétiques s'explique en partie par le pKa élevé, comparativement à l'acide lactique, respectivement 4.87, 4.75, 3.08. A pH 4, par exemple, seulement 11% de l'acide lactique est indissocié par contre 85% d'acide acétique. En présence d'un mélange d'acides, l'acide lactique contribue principalement à la réduction du pH, alors que l'acide acétique devenu indissocié joue un rôle antimicrobien (Salminen *et al.*, 1998).

Les travaux de Makras *et al.*, 2006 ont montré que l'activité antimicrobienne de la souche de *Lactobacillus* contre *Salmonella* était due à l'effet de l'acide lactique et d'autres substances inhibitrices, dont la proportion s'est élevée avec la diminution du pH (Pelaez *et al.*, 2009).

Alakoni *et al.*,2000 ont étudié l'effet de l'acide lactique sur la perméabilité de la membrane externe de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *salmonella Typhimurium* in vitro et ont observés qu'il perméabilise la membrane externe de ses dernières ainsi, agit comme amplification des d' effet d'autres substance antimicrobiennes (Pelaez *et al.*,2009)

4.2-Peroxyde oxydase

Peroxyde oxydase est produit par de nombreuses espèces de bactéries lactiques ; *Lactococcus Haines et al.*,1973 ; *Ito et al.*,2003), *Streptococcus seki et al.*,2004 et *Lactobacillus* (*Ocana et al.*,1999 ; *Ito et al.*,2003 ; *Otero et al.*,2006 ; *Batdorj et al.*,2007). Sa production est généralement plus importante en culture agitée, elle atteint sa concentration maximale pendant la phase exponentielle de la croissance (*Ocana et al.*, 1999 ; *Otero et al.*,2006) . L' H_2O_2 peuvent être formé par autooxydation des enzymes, par l'activité de la chaîne respiratoire, par autooxydation des flavoenzymes, par l'activité de superoxydation dismutases , et par des diverse oxydase : NADH oxydase, pyruvate oxydase, lactate oxydase glycérophosphate oxydase (*Imlay et al.*,2003 ; *Miyoshi et al.*,2003).

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

H_2O_2 peut oxyder les résidus méthionine et cystéine des protéines entraînant leur inactivation (*Imlay.*,2003). Il peut aussi être réduit en OH par Fe^{++} et Cu^{++} , suite à cette réaction de fronton, le radical hydroxyde OH très réactive, peut modifier la structure de l'ADN. C'est pourquoi la toxicité peut être réduite par la présence de chélateurs du fer (*Cosgrove et al.*,2007).

4.3-Dioxyde de carbone

Celui-ci est principalement formé pendant la fermentation d'acide lactique hétérofermentaire des hexanes, mais aussi de nombreuses autre voies métaboliques produisent du dioxyde de carbone au cours de la fermentation, CO_2 à un double effet anti microbien. Sa formation crée un milieu anaérobie et aussi activité antimicrobienne, cette dernière est mal connu, mais il a été suggéré que les décarboxylations enzymatique sont inhibées et que l'accumulation de Dioxyde de carbone dans la bicouche lipidique provoque un dysfonctionnement de la perméabilité membranaire. En raison de son activité antimicrobienne, CO_2 maintenant

couramment utilisé comme principal composant des emballages sous atmosphère modifiée, les bactéries Gram (-) sont plus sensibles au CO₂ que bactéries Gram (+) (Ouwehund *et al.*, 2004 et Zalan., 2010).

4.4-Diacétyl

Le diacétyl est produit par des bactéries lactique comme *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* par métabolisme des sucre via le pyruvate Molimard *et al.*, 1996. Beaucoup de bactéries lactiques comprenant des souches de *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus* et *Lactobacillus* peuvent produire le diacétyl, bien que la production soit réprimée par la fermentation des hexoses (Cogan *et al.*, 1986). Le diacétyl a des concentrations compris entre 0.5 et 8 mmol/l, il inhibe *Staphylococcus aureus* lorsque le pH du milieu se situe entre 5 et 7 (Jay *et al.*, 1982 ; Bowles *et al.*, 1995) . IL a été trouvé que le diacétyl est plus actifs contre les bactéries à Gram- les moisissures que contre les bactéries Gram(+); les bactéries lactiques ont été moins sensibles (Ouwehand *et al.*, 2004).

4.5-Les bactériocines

4.5.1-Définition et caractéristiques principales

La définition qui était la plus acceptée donnée aux bactériocines est celle de Klaenhammer qui les définit en tant que protéines ou complexes de protéines ayant une activité bactéricide contre les espèces étroitement liées à la souche productrice (Dortu et Thonart, 2009 ; Xie *et al.*, 2011). Cependant, des études récentes ont démontré qu'il existe certaines qui sont actives également contre des bactéries à Gram négatif (Mami *et al.*, 2008 ; Gong *et al.*, 2010).

Ces substances protéiques biologiquement actives sont synthétisées au niveau du ribosome et codées par des gènes, leur sécrétion dans le milieu extracellulaire étant conférée par un système de transfert (Gálvez *et al.*, 2007; Tabasco *et al.*, 2009).

Les bactériocines se différencient par leur poids moléculaire, leurs propriétés biochimiques, leur origine génétique, ainsi que par leur spectre et mode d'action (Dortu et Thonart, 2009)

Nomenclature : La nomination des bactériocines est attachée soit au genre ou à l'espèce de la première souche productrice en ajoutant le suffixe "cine" pour indiquer le pouvoir létal ; par exemple: la plantaricine est la bactériocine produite par *Lactobacillus plantarum* (Karthikeyan et Santhosh, 2009).

Chez les bactéries à Gram positif, une souche peut produire plusieurs bactériocines. En effet les bactériocines qui présentent une légère modification dans les séquences d'acides aminés conservées par rapport à leur pré-peptide n'affectant pas leur structure secondaire ni leur spectre d'action ni l'immunité de la souche productrice sont considérées comme étant des variantes naturelles. A titre d'exemple, les nisines Z, Q et U sont des variantes naturelles de la nisine A découverte en premier lieu (Riley et Chavan, 2007).

Les bactériocines des bactéries lactiques sont des protéines ou des complexes de protéines constituées généralement de 30 à 60 acides aminés. Ces substances peuvent être des protéines simples comme elles peuvent être associées à une partie lipidique ou glucidique. Certaines d'entre elles renferment des acides aminés inhabituels tels la lanthionine et la - méthylelanthionine (Ammor *et al.*, 2006).

4.5.2-Caractéristiques

Les bactériocines des bactéries lactiques ressemblent à certains peptides antimicrobiens des eucaryotes (Riley, 2009). Celles-ci sont généralement petites, cationiques (excès en résidus lysyl et arginyl), amphiphiles et thermostables. Leur poids moléculaire est relativement petit (2-6 kDa) ce qui leur permet d'accéder aux cellules cibles et perméabiliser la membrane en se liant à des récepteurs de surface (Gillor *et al.*, 2008; Hartmann *et al.*, 2011).

Ces substances antagonistes, produites par la plupart des bactéries lactiques, se différencient des antibiotiques du fait qu'elles sont synthétisées au niveau du ribosome et leur spectre d'action est relativement étroit, alors que les antibiotiques sont généralement des métabolites secondaires et possèdent un spectre d'action plus large (Ghraiiri *et al.*, 2008).

4.5.3-Propriétés

certaines critères des bactériocines produites par les bactéries lactiques justifient leur choix comme bioconservateurs (Gálvez et al., 2007 ; Thakur et Roy, 2009) :

- Considérées comme 'GRAS' (Generally Recognized As Safe) ;
- inactives et non toxiques contre les cellules eucaryotes ;
- généralement thermostables et tolérantes aux variations du pH ;
- possèdent un spectre d'activité relativement large ;

- mode d'action généralement bactéricide (membrane cytoplasmique) ;
- déterminants génétiques codés par les plasmides ;
- sensibilité aux protéases et digestibilité dans le tractus intestinal.

4.5.4-Classification

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

a- Classe I. Les lantibiotiques : peptides de taille inférieure à 5 kDa, stables à la chaleur et qui contiennent des acides aminés inhabituels soufrés formés post- traductionnellement, c'est-à-dire la lanthionine, la -méthyl lanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine. Ils peuvent être divisés en deux types :

la classe Ia qui comprend des peptides cationiques hydrophobes allongés contenant jusqu'à 34 acides aminés et la classe Ib qui comprend les peptides globulaires chargés négativement ou sans charge nette et contenant jusqu'à 19 acides aminés (Twomey *et al.*, 2002). Certains lantibiotiques sont par ailleurs constitués de deux peptides agissant ensemble pour avoir une activité comme la lacticin 3147.

b-Classe II : Peptides de taille inférieure à 10 kDa, stables à la chaleur, ne contenant pas d'acides aminés modifiés. Leur point isolélectrique varie entre 8 et 10. Cette classe est divisée en trois sous-classes. Les bactériocines de la sous-classe IIa contiennent entre 27 et 48 acides aminés et ont toutes une partie N-terminale hydrophobe contenant la séquence consensus YGNGV ainsi qu'un pont disulfure et une partie C-terminale moins conservée, hydrophobe ou amphiphile qui détermine la spécificité d'action (Fimland *et al.*, 2000 ; Richard *et al.*, 2006). Elles ont toutes une activité contre *Listeria monocytogenes*. Certaines bactériocines de cette sous-classe contiennent également un deuxième pont disulfure dans leur domaine C-terminale qui semble être important dans la stabilisation de la structure tertiaire. Il semble par ailleurs qu'il leur conférerait une meilleure activité antimicrobienne, une meilleure résistance à l'exposition à des hautes températures et un spectre d'action plus large (; Fimland *et al.*, 2000 ; Richard *et al.*, 2006).

La sous-classe IIb comprend les bactériocines ayant besoin de deux peptides pour avoir une activité. Deux types de bactériocines de classe IIb peuvent être distingués : le type E (Enhancing) où la fonction d'un des deux peptides est d'augmenter l'activité de l'autre et le type S (Synergy) où les deux peptides sont complémentaires.

La sous-classe IIc contient les bactériocines ne pouvant pas être classées dans les autres sous-classes.

Classe III. Protéines de taille supérieure à 30 kDa et sensibles à la chaleur. La structure et le mode d'action de ces bactériocines diffèrent complètement des autres bactériocines produites par les bactéries lactiques. Cette classe ne contient que quatre bactériocines : l'helveticin J produite par *Lactobacillus helveticus* A, l'enterolysin A produite par *Enterococcus faecium*, la zoocin A produite par *Spreptococcus zooepidemicus* et la millericin B produite par *Streptococcus milleri* (Nilsen *et al.*, 2003 Nigutova *et al.*, 2007).

Classe IV. Peptides requérant une partie carbohydatée ou lipidique pour avoir une activité. Aucune bactériocine de cette classe n'a été décrite.

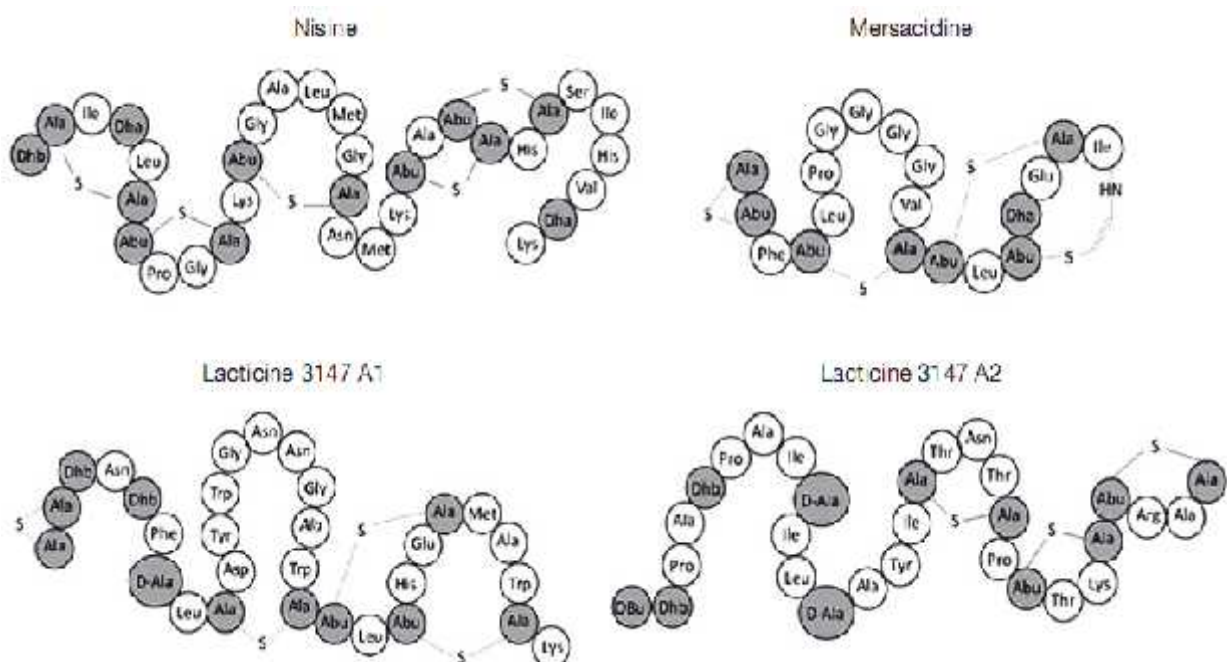


Figure 04 : Séquence et structure de lantibiotiques de type A (Nisine), B (Mersacidine) et d'un lantibiotique « two-peptides » (Lacticine 3147 A1 et A2) — Sequence and structure of a type A lantibiotic (Nisin), a type B lantibiotic (Mersacidin) and a « two-peptides » lantibiotic (Lacticin 3147 A1 and A2). (Dortu C *et al.*, 2009)

4.5.5-Synthèse et régulation

La biosynthèse d'une bactériocine nécessite l'action d'une multitude de gènes dont les produits peuvent interagir selon des mécanismes complexes très peu connus. Ces gènes codent pour des protéines d'induction, de structure, de modification (dans le cas des lantibiotiques), de transport, de clivage et d'immunité.

4.5.6-Synthèse des bactériocines

Chez les deux premier classes, la bactériocine est produite sous forme d'un pré-peptide non-biologiquement actif qui subira des modifications post-traductionnelles pour donner le peptide actif (Dortu et Thonart, 2009).

➤ Les lantibiotiques

Dans le cas de la *nisine*, la biosynthèse est initiée par l'émission d'un signal provoqué par un facteur d'induction. La protéine membranaire, souvent une histidine kinase, effectue la phosphorylation lors de la reconnaissance du peptide inducteur qui interagit avec les promoteurs situés sur l'opéron de la bactériocine.

Il a également été démontré que les biosynthèses de la nisine et de la carnobactériocine B2 sont induites par la bactériocine elle-même (NEVES *et al.*, 2005).

Les gènes impliqués dans la biosynthèse des lantibiotiques (la nisine) sont :

- Gène de structure (LanA) : ce gène code pour le prépeptide contenant la séquence N-terminale de 23 à 30 acides aminés qui sera clivée lors du transport à l'extérieur de la cellule.
- Gènes (LanB et LanC ou LanM) : ces gènes codent pour les enzymes déshydratase (impliquée dans la déshydratation de la sérine et la thréonine pour donner le déhydroalanine et le déhydrobutyrine) et cyclase (responsable de la structure cyclique par formation de liens thioéthers entre ces résidus et les cystéines environnantes).
- Gènes codant le transporteur ABC: il s'agit du gène LanP codant pour le domaine protéasique du transporteur ABC et du gène LanT qui sert à cliver le prépeptide lors de son excrétion à l'extérieur de la cellule sous sa forme active.
- Gènes d'immunité : il s'agit des gènes LanI, LanE, LanF et LanG codant les protéines responsables de l'immunité de la souche vis-à-vis de la bactériocine qu'elle produit.

➤ Les bactériocines de la classe II

la biosynthèse est induite suite au clivage d'un peptide leader inactif et similaire à la bactériocine (Kjos *et al.*, 2011). Le transport des bactériocines à l'extérieur de la cellule est assuré selon deux mécanismes distincts. Des transporteurs de type ABC «ATP-Binding Cassette» identifiés chez *Streptococcus mutans* 286 et 287 sont préférentiellement utilisés lors de la biosynthèse des mutacines non-lantibiotiques (Tagg *et al.*, 2005).

Toutefois, un nombre restreint de bactériocines à l'exemple de l'*acidicine B* et de l'*enterocine P* sont sécrétées via la voie *sec* dépendante (Herranz *et* Driessen, 2005)

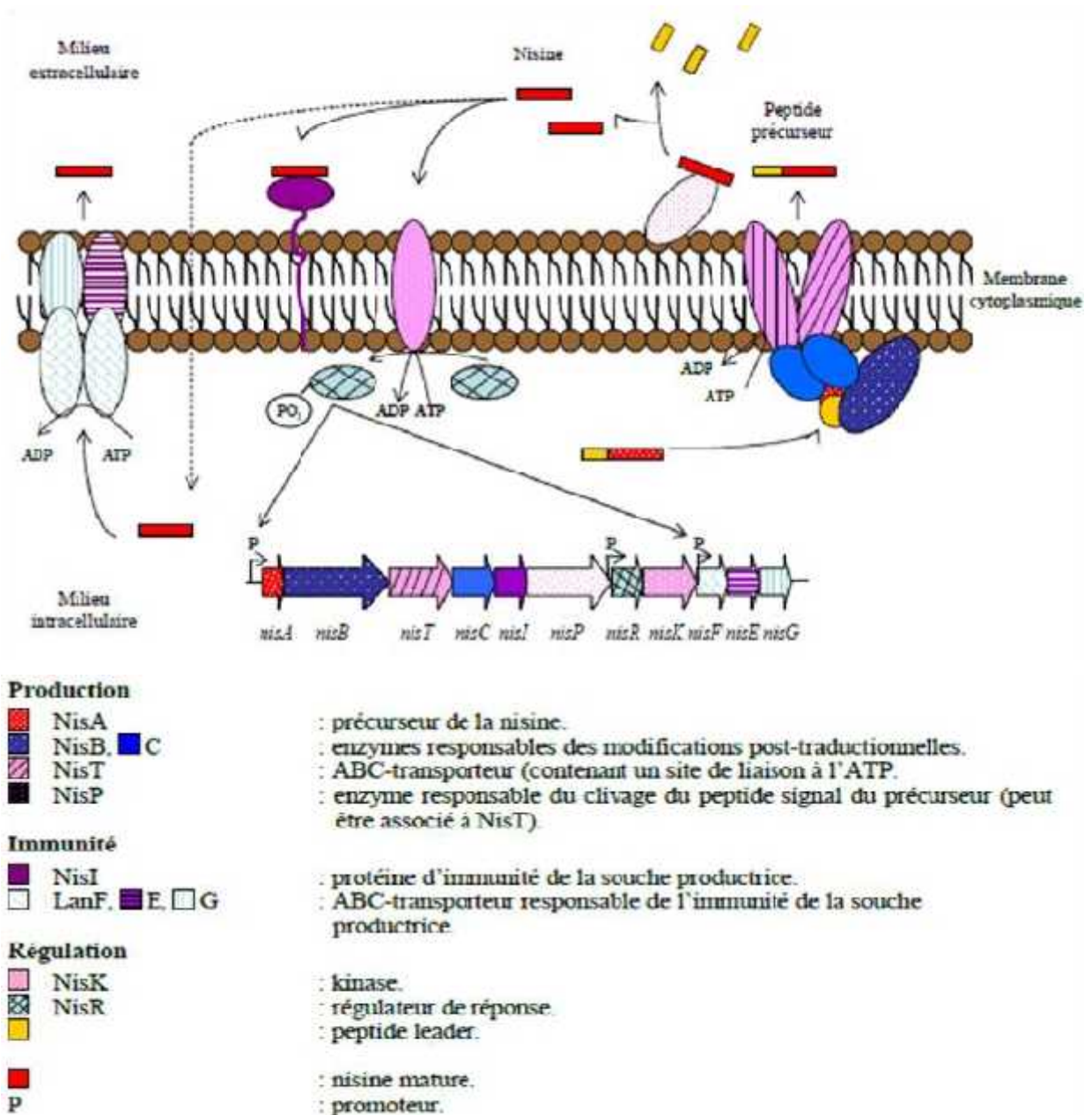


Figure 05: Schéma de biosynthèse, de sa régulation et d'immunité de la souche productrice pour la *nisine* (Widdick *et al.*, 2003).

4.5.7-Conditions de production

Dans leur lutte pour survivre et se nourrir, les bactéries lactiques produisent de nombreuses substances antimicrobiennes entre-autres les bactériocines, qui servent d'armes permettant aux bactéries lactiques de dominer les microorganismes compétitifs. Ces bactériocines peuvent être dégradées sous l'action des protéases de la souche productrice ou être adsorbées à sa surface (Dortu et Thonart, 2009). Les conditions optimales pour la croissance peuvent l'être également pour la production des bactériocines.

Castro *et al.* (2011) ont démontré que les conditions conduisant à une forte densité cellulaire favorisent la production de bactériocine par *Lactobacillus sakei*. Cependant, il a été noté par Verluysen *et al.* (2004) que des conditions défavorables à la croissance permettent de stimuler la production des bactériocines par *Lactobacillus curvatus*.

La présence des microorganismes compétitifs dans le milieu stimule la production des bactériocines. Tabasco *et al.* (2009) ont démontré que *Lactobacillus acidophilus* augmente la production de lactacine B quand cette souche sent la présence de cellules cibles vivantes ; l'utilisation de ces mêmes cellules cibles après chauffage n'avait aucun impact sur cette production. De même une co-culture de *Lactobacillus plantarum* NC8 avec *Enterococcus faecium* augmente sa production de bactériocine (Ruiz-Barba *et al.*, 2010).

4.5.8-Facteurs influençant la production des bactériocines

L'utilisation des bactériocines à l'échelle industrielle en nécessite de grandes quantités. Ceci ne peut être atteint qu'en connaissant et optimisant les facteurs influençant leur production tels que : la température, le pH, le milieu utilisé, etc. Ces conditions de culture affectent fortement la production de bactériocines.

➤ Température et pH

La température et le pH sont des facteurs importants qu'on doit prendre en considération pour la production de bactériocines. Celle-ci est généralement optimale à des températures et des pH inférieurs à ceux optimaux pour la croissance (Dortu et Thonart, 2009 ; Sharma *et al.*, 2010).

L'effet de ces deux facteurs a fait l'objet de plusieurs études. Ainsi, la production de bactériocine par *Leuconostoc lactis* était optimale à 30°C et à pH variant de 6.5 – 7 ; néanmoins, elle est diminuée d'une façon remarquable à 37°C et à pH 5,5 et 8,0 (Dhakur et Roy, 2009). La production de pédiocine LB-B1 par *Lactobacillus plantarum* LB-B1 était optimale à 37°C et à pH 6 (Xie *et al.* 2011). *Enterococcus faecium* PC4.1 atteint son maximum de production à 30°C et à pH 6 (Hadji- Sfaxi *et al.* 2011).

La production de l'acidocine 8912 par *Lactobacillus acidophilus* était maximisée à 30°C (Ahmed *et al.* 2010).

➤ **Composition du milieu de culture**

La composition du milieu de culture en particulier la source et la teneur de carbone et d'azote influence considérablement la production de bactériocines. Vu leurs exigences nutritionnelles, les bactéries lactiques requièrent plusieurs composants tels que : les facteurs de croissance, les peptones, l'extrait de levure, les hydrolysats de protéines et l'extrait de viande. Ces composants ont un impact positif sur le rendement en bactériocines (Dortu et Thonart, 2009).

De nombreux milieux de culture complexes ont été utilisés pour l'isolement des bactéries lactiques bactériocinogènes tels le MRS (Abrams *et al.*, 2011), le BHI (Ghrairi *et al.*, 2008), et le M17 (Hadji-Sfaxi *et al.*, 2011). Toutefois, l'Elliker constitue le milieu le plus approprié pour améliorer le rendement des bactériocines (Thakur *et al.*, 2009). Il a été signalé que la production des bactériocines peut être maximisée en fortifiant le milieu de culture par l'ajout d'extrait de levure (Sarika *et al.*, 2010). Todorv et Dicks (2005) ont démontré que le taux de bactériocines ST461BZ et ST462BZ produites par *Lactobacillus rhamnosus* significativement augmenté en ajoutant au milieu le K₂HPO₄ et le KH₂PO₄ respectivement.

➤ **Temps d'incubation**

La synthèse des bactériocines prend lieu au cours de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire. Au delà de cette période, une diminution du taux de bactériocines a été observée suite à la digestion de ces dernières par les enzymes protéolytiques libérées par la cellule productrice.

De ce fait, plusieurs études ont été réalisées pour optimiser la période d'incubation; Gong et al. (2010) ont démontré que la production de la plantaricine MG par *Lactobacillus plantarum* atteint sa valeur maximale après 28H d'incubation. La production maximale de bacALP7 par *P. pentosaceus* est observée après 16H d'incubation et diminue de près de la moitié après 21H (Pinto *et al.*, 2009).

4.5.9-Mode d'action

Bien que toutes les bactériocines partagent le même site d'action qui est la membrane cytoplasmique, leur mode d'action semble être différent (Dortu et Thonart, 2009):

Les lantibiotiques tel que la nisine, portant une structure cationique et amphiphile allongée, interagissent avec la membrane des cellules cibles soit en se liant au lipide II (un précurseur de peptidoglycanes) empêchant ainsi la synthèse de la paroi cellulaire conduisant à la mort de la cellule, soit en utilisant ce lipide comme une molécule d'appui pour s'insérer dans la membrane et y former des pores causant la destruction de la cellule suite à la dissipation du potentiel membranaire et l'efflux des petites molécules (ions, ATP, acides aminés, etc). La mersacidine tue la cellule en interférant avec ses réactions enzymatiques comme la synthèse de la paroi (Gillor *et al.*, 2008 ; Dortu et Thonart,2009). L'insertion des bactériocines de la classe II dans la membrane est conférée par la structure -hélice amphiphile, cette insertion induit la perméabilisation de la membrane et par conséquent la mort cellulaire suite à l'écoulement des molécules à faible poids moléculaire.

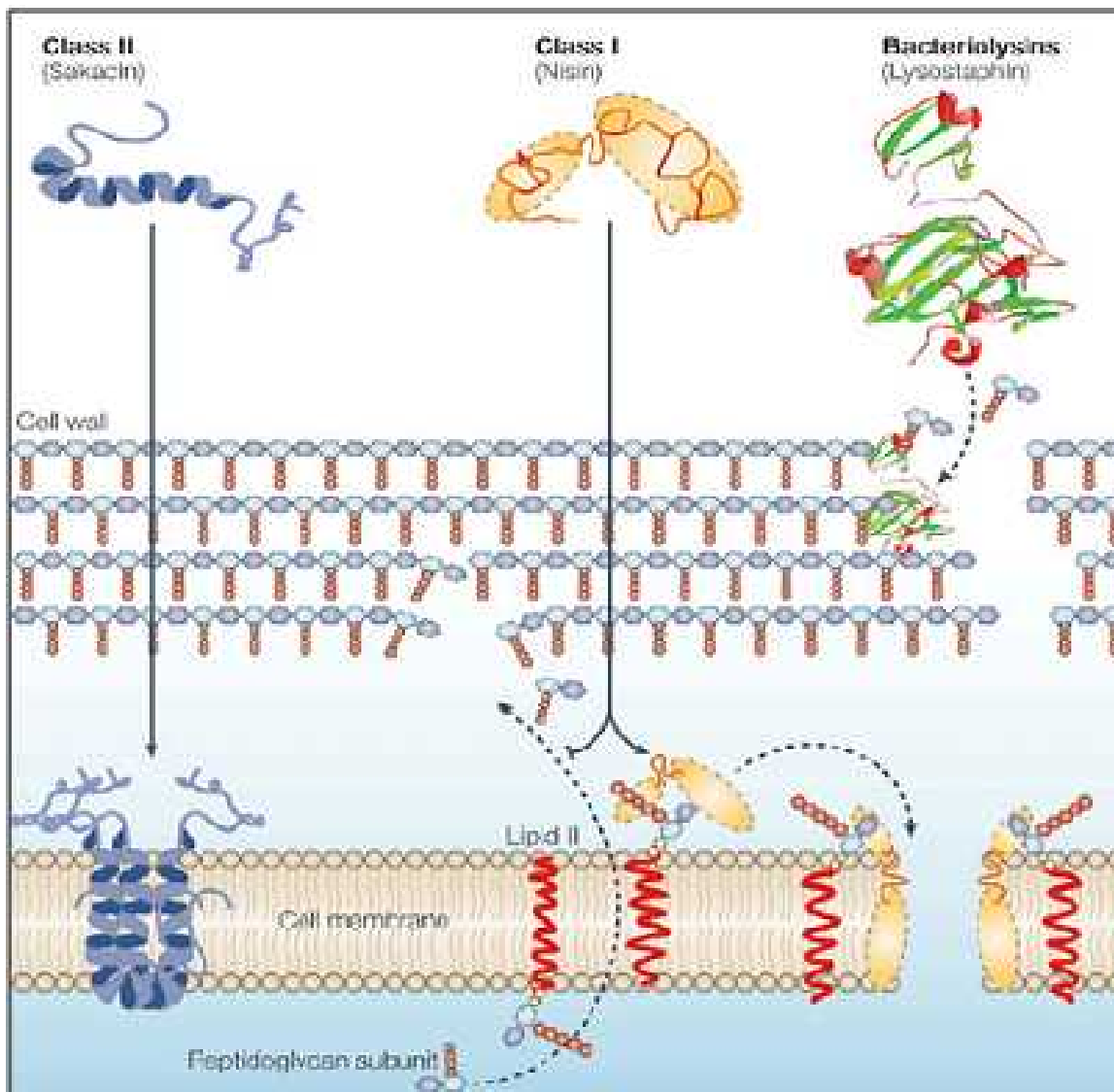


Figure 06 : Mode d'action des bactériocines de bactéries lactiques (Cotter *et al*,2005).

4.5.10-Les applications des bactériocines

Les bactériocines sont employées dans plusieurs domaines, leur spectre antimicrobien peut être large ou étroit, elles peuvent donc cibler sélectivement des bactéries pathogènes ou détériorantes sans inhiber les bactéries indispensables et ont un mode d'action bactéricide (Galvez *et al.*, 2007).

➤ Dans le secteur alimentaire

L'utilisation des bactériocines dans les produits alimentaires a connu une forte progression. Du fait que ces substances sont naturelles, sûres (non toxiques pour les cellules eucaryotes et facilement digestibles dans le tractus intestinal), tolérantes aux traitements thermiques et aux variations du pH et agissant à des faibles concentrations, leur application conduit à une prolongation de la durée de conservation des produits alimentaires (Gautam et Sharma, 2009).

Ces molécules bioactives sont incorporées dans les aliments soit directement sous forme purifiée ou semi-purifiée (nisine) ou sous forme de concentré (pédiocine) soit indirectement en appliquant la souche productrice dans le produit alimentaire, comme elles peuvent être immobilisées par encapsulation ou adsorption.

A l'heure actuelle, seule la nisine est acceptée comme additif (Ghalfi *et al.*, 2006 ; Dortu et Thonart, 2009). Benkerroum *et al.*(2000) ont démontré la capacité des bactériocines produites par *Lactococcus lactis* de diminuer le nombre de *Listeria monocytogene* s'ajoutée expérimentalement au Jben Marocain. Après contamination du Jben avec 10^7 et 10^4 UFC.ml⁻¹ il a été constaté que la bactériocine entraîne une réduction du nombre de contaminants de 2.7log après 30h dans le premier cas et l'a complètement éliminé après 24H dans le deuxième. La nisine produite par *Lactococcus lactis* est utilisée dans la production des fromages pour prévenir la fermentation de l'acide lactique en acide butyrique par le genre *Clostridium*, ce qui affecte la saveur et la texture des produits. La nisine est aussi capable d'inhiber les genres : *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Listeria* et *Clostridium* en particulier *Clostridium tyrobutyricum* responsable de la production de gaz dans les fromages semi solides (Walstra *et al.*., 2006).

Cette bactériocine est utilisée également dans la fabrication des fromages pasteurisés, produits liquides à base d'œuf, sauces, laits frais, bières et conserves (Glazer *etal.*,2007). Etant un milieu riche, la viande est sujette à des contaminations par les microorganismes pathogènes et altérants tels que *Listeria monocytogenes*, *Brochothrix thermosphacta* et *Clostridium estertheticum* (Jones *et al.*, 2008). Héquet *et al.* (2007) ont démontré que la sakacine G produite par *Lactobacillus sakei* a diminué le nombre de *Listeria* de 3 log à moins de 1 log dans les jambons cuits conservés à 4°C.

Ben Hammou *et al.* (2010) ont réussi à appliquer la nisine en combinaison avec le NaCl pour contrôler le développement de *Listeria monocytogenes* dans les saucisses du mouton. Albano *et al.* (2009) ont utilisé *Pediococcus acidilactici* productrice de la bactériocine PA-1 pour inhiber un cocktail de souches de *Listeria innocua* dans les saucisses à base de viande fermentée, ceci ayant permis une réduction remarquable de ces souches. Pinto *et al.* (2009) ont mis en évidence la capacité des bactériocines bacALP7 et bacALP57 produites par *Enterococcus faecium* et *Pediococcus pentosaceus* de réduire le taux de *Listeria monocytogene* et *Listeria innocua* dans les fruits de mer.

Tableau 02: bactériocines des bactéries lactique impliqué dans la sécurité des fromages.(Medina *et al.*, 2010)

Bacteriocin	BP culture	Pathogen	Application	Product	Reference
Nisin	<i>L. lactis</i> 1881	<i>L. monocytogenes</i>	Starter culture	Camembert cheese	Sulzer and Busse, 1991
Nisin	<i>L. lactis</i> CNRZ 150	<i>L. monocytogenes</i>	Starter culture	Camembert cheese	Maisnier-Patin <i>et al.</i> , 1992
Nisin	<i>L. lactis</i> TAB 50	<i>L. monocytogenes</i>	Starter culture	Semi-hard cheese	Rodriguez <i>et al.</i> , 2001
Lacticin 3147	<i>L. lactis</i> DPC 4275	<i>L. monocytogenes</i>	Starter culture	Cottage cheese	McAuliffe <i>et al.</i> , 1999
Lacticin 3147	<i>L. lactis</i> DPC 4275	<i>L. monocytogenes</i>	Surface sprayed	Smear-ripened cheese	O'Sullivan <i>et al.</i> , 2006
Lacticin 481	<i>L. lactis</i> TAB 24	<i>L. monocytogenes</i>	Starter culture	Semi-hard cheese	Rodriguez <i>et al.</i> , 2001
Enterocin 7C5	<i>E. faecium</i> 7C5	<i>L. monocytogenes</i>	Surface sprayed	Taleggio cheese	Giraffa and Carminati, 1997
Enterocin AS-48	<i>E. faecalis</i> INIA 4	<i>L. monocytogenes</i>	Starter or adjunct	Manchego cheese	Nuñez <i>et al.</i> , 1997
Enterocin AS-48	<i>E. faecalis</i> TAB 28	<i>L. monocytogenes</i>	Starter culture	Semi-hard cheese	Rodriguez <i>et al.</i> , 2001
Enterocin 1146	<i>E. faecium</i> DPC 1146	<i>L. monocytogenes</i>	Adjunct culture	Cheddar cheese	Foulquié Moreno <i>et al.</i> , 2003
Enterocin RZS C5	<i>E. faecium</i> RZS C5	<i>L. monocytogenes</i>	Adjunct culture	Cheddar cheese	Foulquié Moreno <i>et al.</i> , 2003
Pediocin	<i>L. lactis</i> MM217	<i>L. monocytogenes</i>	Starter culture	Cheddar cheese	Buyong <i>et al.</i> , 1998
Pediocin	<i>Lb. plantarum</i> WHE 92	<i>L. monocytogenes</i>	Surface sprayed	Munster cheese	Ennahar <i>et al.</i> , 1998
Pediocin	<i>Lb. plantarum</i> ALC01	<i>L. monocytogenes</i>	With smear culture	Red smear cheese	Loessner <i>et al.</i> , 2003
Pediocin	<i>L. lactis</i> CL1	<i>L. monocytogenes</i>	Adjunct culture	Semi-hard cheese	Rodriguez <i>et al.</i> , 2005a
Nisin	<i>L. lactis</i> TAB 50	<i>S. aureus</i>	Starter culture	Semi-hard cheese	Rodriguez <i>et al.</i> , 2000
Nisin	<i>L. lactis</i> IPLA 729	<i>S. aureus</i>	Adjunct culture	Afuega'l Pitu cheese	Rilla <i>et al.</i> , 2004
Pediocin	<i>L. lactis</i> CL1	<i>S. aureus</i>	Adjunct culture	Semi-hard cheese	Rodriguez <i>et al.</i> , 2005b

➤ Dans le secteur sanitaire

L'usage des bactériocines n'est pas restreint au domaine alimentaire. Celles-ci servent aussi comme agents de thérapie naturelle alternatifs aux antibiotiques (Smaoui *et al.*, 2010). Suite à l'émergence du phénomène d'antibiorésistance manifesté par plusieurs bactéries pathogènes (parmi lesquelles certaines sont résistantes à plusieurs antibiotiques à la fois) qui menace la santé publique, les études sont actuellement orientées vers la recherche de nouvelles substances antibiotiques naturelles pouvant résoudre ce problème (Mkrtchyan *et al.*, 2010).

Les bactériocines de la classe IIa présentent un groupe important de peptides antimicrobiens qui peuvent être utilisés en médecine avec les antibiotiques dans le traitement des maladies infectieuses ou comme des agents antiviraux.

Ces molécules ont une activité inhibitrice contre les bactéries à Gram positif nuisibles et pathogènes comme *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogene* (Drider *et al.*, 2006).

Xie *et al.* (2011) ont rapporté que le Koumiss (produit chinois à base de lait fermenté) est efficace dans le traitement de la tuberculose et des maladies cardiovasculaires et contribue à l'amélioration de l'immunité, et que ces propriétés sont attribuées aux bactériocines produites par les bactéries lactiques indigènes. Dembélé *et al.* (1998) ont démontré que les bactériocines produites par le genre *Lactobacillus* contribuent à la protection du vagin contre différentes bactéries pathogènes telles : *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Shigella boydii*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria innocua* et *Staphylococcus aureus*. Tong *et al.* (2010) ont démontré que la nisine participe dans la prévention et le traitement des caries dentaires en inhibant les microorganismes en cause. La nisine est aussi utilisée dans le traitement des ulcères gastriques vu sa stabilité aux pH acides et son activité contre *Helicobacter pylori*. Les bactériocines LA-1, YIT9029 et DCE471 produites par *Lb. johnsonii*, *Lb. casei* et *Lb. Amylovorus* respectivement manifestent également une activité inhibitrice contre *Helicobacter pylori* (Smaoui, 2010). Des études récentes ont découvert le rôle des bactériocines produites par *Lactobacillus salivarius* dans la réduction de colonisation du caecal des volailles par *Campylobacter* (Nazef *et al.*, 2008).

De nombreuses publications font état de production des bactériocines par les bactéries lactiques. Ces composés inhibent in vivo la croissance des germes pathogènes rencontrés dans les industries agro-alimentaires. Les bactériocines telles que la plantacine (produite de *Lb. plantarum*), la curvacine (de *Lb. curvatus*), la leucocine (de *Leuconostoc*), la pediocine (de *Pediococcus acidilactici*) ou la nisine (de *Lactococcus*) ont démontré leur efficacité vis-à-vis des *Listeria monocytogenes*, *Li. innocua*, *Staphylococcus aureus* ou *Clostridium* ssp (Albano *et al.*, 2007 ; Todorov *et al.*, 2007)

L'utilisation des ferments producteurs de bactériocines a également été étudiée. Dans le domaine des produits carnés, la nisine demeure la seule bactériocine utilisée industriellement et elle reste souvent l'outil de choix pour une action préservatrice "naturelle" (Topisirovic *et al.*, 2006 ; Morisset *et al.*, 2005).

Partie expérimentale

1-Matériel

1.1-Appareillages

- Incubateur (memmert)
- Autoclave (Sano clav)
- Four pasteur (nüver)
- Plaque chauffante agitante (stuart)
- Bain marie (memmert)
- Centrifugeuse (nüver)
- Microscope optique (bentley)
- Spectrophotomètre (libra S6)
- Micropipettes
- Pipettes pasteur
- Compteur de colonies (stuart)
- pH mètre (Hanna)
- vortex tecno kartell

1.2-Milieus de culture

- bouillon et gélose MRS (De Man, Rogosa et Sharpe) (Conda)
- bouillon et gélose M17 (Terzaghi et Sandine) (Conda)
- bouillon et gélose nutritive (Institut pasteur)
- gélose Chapman (Conda)
- gélose Mac Conkey (Fluka)
- gélose Mueller Hinton (Conda)
- lait écrémé

1.3-Produits chimiques

-lactose, Nacl, agar-agar, extrait de levure, kit de coloration du gram, eau oxygéné, NaoH N/9, phénolphtaléine, Moller à arginine, tampon phosphate, try-peptone

1.4-Bactéries utilisées dans cette étude

1.4.1-Bactéries lactiques

Les bactéries lactiques potentiellement bactériocinogènes ont été fourni par le laboratoire de LMA (laboratoire de microbiologie appliqué Es Senia d'Oran), elles ont été isolées du lait de chèvre :

- deux souches *Lactococcus lactis* (Ma1, Ma2)
- une souche *Lactococcus lactis supb lactis biovar diacetylactis* (D17)
- une souche *Leuconostoc mésenteroides* (Rs6)
- une souche *Leuconostoc mésenteroides supb dextranicum* (D19)
- une souche *Streptococcus thermophilus* (S2a) a été isolée à laboratoire d'hygiène et pathologie animal Tiaret.

1.4.2-Bactéries pathogènes

souche	référence	origine
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P14	Laboratoire hygiène et pathologie animal Tiaret
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	Laboratoire de C.A.C.Q.E Tissemsilet
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028	
<i>Klebsciella pneumonea</i>	ATCC 4352	
<i>Bacillus subtilus</i>	ATCC 6633	
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10876	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Université Tiaret faculté SNV
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 10536	
<i>Escherichia coli</i>	E14	
<i>Staphylococcus aureus</i>	SA 14	Hôpital Tiaret
<i>Salmonella spp</i>	SP14	

2-Méthodologies

2.1-Isolement et purification de la souche *Streptococcus thermophilus*

A partir d'un pot de yaourt, Des dilutions décimales (10^{-1} à 10^{-6}) de la suspension mère ont été réalisées à l'aide de milieu de dilution (try-peptone-sel), 1ml de chaque dilution est ensemencé dans des milieux gélosés M17 lactosé.

La purification consiste à réaliser des repiquages successifs sur gélose et bouillon M17L, avec une incubation à 37°C pendant 24h, jusqu'à l'obtention de colonies de même taille, même forme et même couleur et par observation microscopique après la coloration de Gram (Idoui *et al.*, 2009).

2.2-Identification de la souche *Streptococcus thermophilus*

2.2.1-Critères morphologiques

2.2.1.1-Caractérisation macroscopique

L'examen macroscopique est porté sur l'observation de l'aspect des colonies (la forme, taille, pigmentation)

2.2.1.2-Caractérisation microscopique

La coloration de Gram a été utilisée pour classer la bactérie selon leur Gram, leur morphologie et leur mode d'association. Cette méthode est basée sur la différence de structure de la paroi chez les deux groupes Gram + et Gram -.

Quelques gouttes de solution aqueuse de violet de gentiane sont répandues sur le frottis de la bactérie isolée, l'excès de ce dernier est jeté après une minute d'action.

Le frottis est ensuite recouvert de lugol, ce liquide prend une teinte mordorée, on le jette au bout de quelques secondes, la lame est ensuite décolorée à l'alcool, après rinçage à l'eau distillé, le frottis est recoloré à la fuchsine pendant une minute, puis lavé à l'eau, séché et examiné au microscope optique.

2.2.2-Test de catalase

Elle est mise en évidence par contact de la culture avec une solution fraîche d'eau oxygénée à 10 volumes. Une goutte d'eau oxygénée est placée sur une lame et un peu de culture bactérienne. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulles traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de la catalase (Guiraud, 1998).

2.2.3-Croissance à différentes températures

Ce test est important car il permet de distinguer que la bactérie lactique mésophile ou bactérie lactique thermophile L'aptitude à la culture est testée à : 15°C, 37°C, 45°C pendant 24h. La croissance est appréciée par l'apparition de trouble. (Leveau *et al.*, 1991)

2.2.4-La thermo-résistance

La thermo-résistance est réalisée par un chauffage du milieu à une température de 60°C pendant 30 min, pour ce teste en utilisant le milieu M17L liquide ensemencé par la bactérie et incubé pendant 24h à 37°C. (Teuber et Geis, 2006)

2.2.5-Culture sur milieu hypersalé

La culture a été ensemencée sur des bouillons hyper-salés à 4% et à 6.5% 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, 1998)

2.2.6-Test au lait de Sherman

La culture à tester a étéensemencée dans le lait écrémé au bleu de méthylène à 0.1% et 0.3%. Après une incubation à 37°C pendant 24h à 48h, on note les observations relatives à la réduction de bleu de méthylène et la coagulation du lait. Les lactocoques réduisent le bleu de méthylène avec coagulation, en revanche les streptocoques thermophiles sont sensibles à ce colorant (Guiraud, 1998).

2.2.7-Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH)

La recherche de cette enzyme est intéressante pour la caractérisation des bactéries lactiques. Cette enzyme libère l'ammoniac et la citruline à partir de l'arginine. Pour réaliser ce test, le bouillon Møeller à arginine a étéensemencé par la culture à tester. Après une incubation à 37°C pendant 24h, la culture dans le milieu de base se manifeste par le virage du milieu au jaune dû au métabolisme du glucose. La dégradation de l'arginine et la libération de l'ammoniac empêchent le virage au jaune.

2.3-Revivification des souches lactiques

Les bactéries lactiques ont été conservées à -20°C dans 70% le lait écrémé et 30% de glycérol stérile. Afin de revivification, les souches ont étéensemencées dans 5ml bouillon MRS et incubées à 37°C pendant 24h, puis un repiquage sur milieu solide MRS et un autre dans bouillon MRS.

2.4-Etude de l'activité antibactérienne des souches lactique

2.4.1-Méthode de double couches (méthode de Fleming *et al.*, 1975)

Les souches lactiques ont étéensemencées en touche (à l'aide d'une pipette pasteur stérile) à la surface d'un milieu MRS solide à partir d'une culture de 18h. Après 24 h d'incubation, une couche de gélose Mueller Hinton contenant la souche indicatrice pathogène d'une culture de 18h est coulée au-dessus de la première couche de gélose.

La lecture des boîtes s'effectue après 24h d'incubation à 37°C, les souches présentant une zone d'inhibition sont considérées comme productrices de substances antimicrobiennes. La taille des zones d'inhibition a été mesurée en mm.

2.4.2-Méthode des puits (méthode de Barefoot et Kaenhammer, 1983)

Les bactéries lactiques sont repiquées dans du milieu MRS ou M17 liquide et incubées pendant une période de 18h à 30°C. Après incubation, une centrifugation est réalisée à 4000 tr/min pendant 20 min, puis on récupérant le surnageant.

Des puits de 6 mm de diamètre sont creusés à l'aide d'une pipette pasteur sur gélose de Mueller Hinton inoculé par la souche indicatrice (pathogène), les puits sont remplis avec 60 µL du surnageant. Les boîtes de Pétrie sont mises à une température de 4°C/2h pour permettre la bonne diffusion de la substance antibactérienne (Doumandji *et al.*, 2010). Après incubation de 24h à 37°C, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés mm.

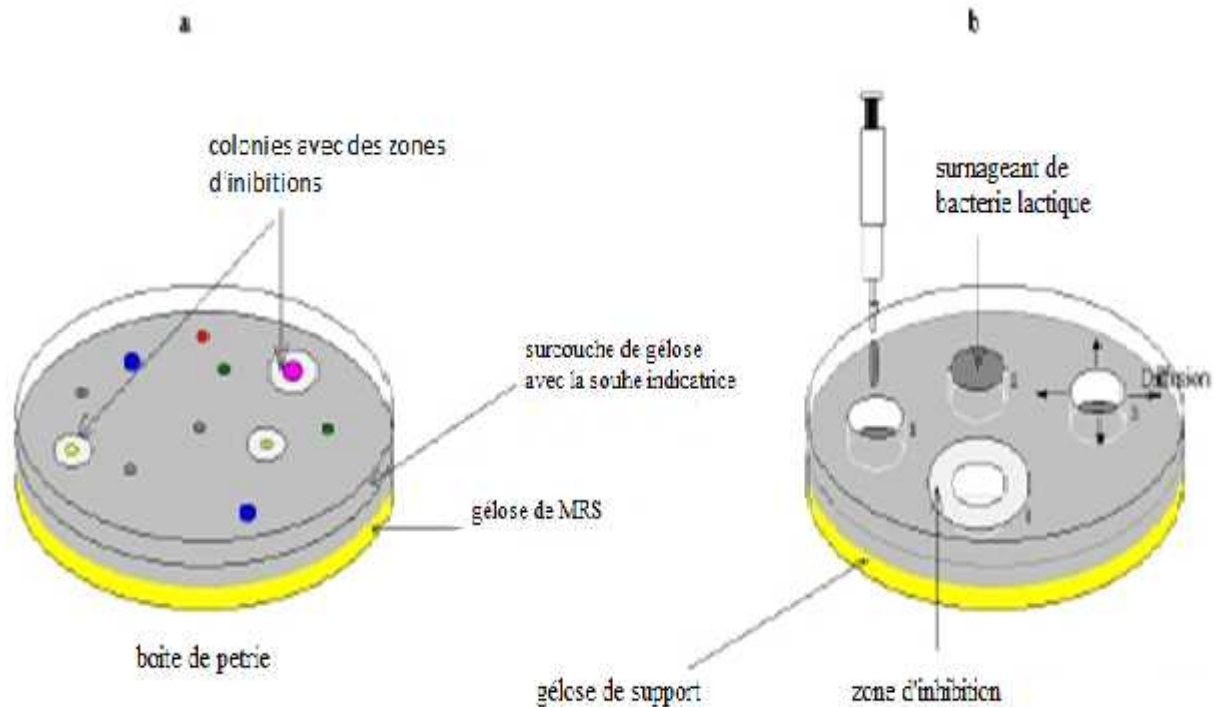


Figure 07 : Méthodes utilisées pour la recherche des substances antimicrobienne. (a) méthode de la double couche, (b) méthode de diffusion en puits (Guessas, 2007)

2.5-Production d'acide lactique et pouvoir acidifiant

La production de l'acide lactique et pouvoir acidifiant a été suivie, selon la méthode recommandée par (Thomas *et* Chamba 2000). après d'une culture jeune de 18h , les souches ont été repiquées et incubées pendant 18h dans du lait écrémé stérile (10% p/v) additionné de (0,5% p/v) d'extrait de levure. Des tubes contenant 10 ml de lait écrémé ont été inoculés avec 1% (v / v) d'inoculum préparé auparavant, et incubés à 37°C dans un intervalle de 0h, 3h, 6h 24h. Le dosage de l'acidité Dornic a été mesuré par titrage de 10ml du lait à l'aide d' une solution de NaOH N/9 et une solution de phénolphtaléine à 1% , jusqu'au virage de la couleur au rose pâle persistant au moins 10 secondes (Larpent, 1997). La concentration est exprimée en Degrés dornic (°D).

L'acidité est déterminée par la formule :

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

La valeur du pH a été mesurée à l'aide d'un pH-mètre numérique.

2.6-Etude de l'évolution de la croissance en culture mixte

Cette étude est réalisée sur milieu lait écrémé (10%). L'évolution de la croissance des bactéries pathogènes a été faite en culture pure et culture mixte avec des souches lactiques. Une culture de 18h de la souche lactique, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* sont d'abord pré-incubés sur milieu lait pendant 18h. Des tubes contenant 10 ml de lait écrémé sontensemencés à raison de 1% à partir de la culture de pré-incubation. La première série reçoit la culture pure de *Staphylococcus aureus*, la deuxième *Escherichia coli* et la troisième représente la culture mixte des souches lactiques et les bactéries pathogènes (*Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*). Ils sont ensuite incubés à une température de 37°C à intervalle de temps suivant : 0h, 3h, 6h, 24h, 48h. (Mami *et al.*,2008)

- *Staphylococcus aureus* : dénombrement sur milieu Chapman, incubation 24 h à 37°C.

- *Escherichia coli* : dénombrement sur milieu gélose Mac Conkey, incubation 24 h à 37°C.

- Les souches lactiques Rs6 : *leuconostoc mesenteroides* ; Ma1 : *lactococcus lactis* ;

D17 : *lactococcus lactis biovar diacetylactis*: dénombrement sur milieu MRS, incubation 24 h à 37°C

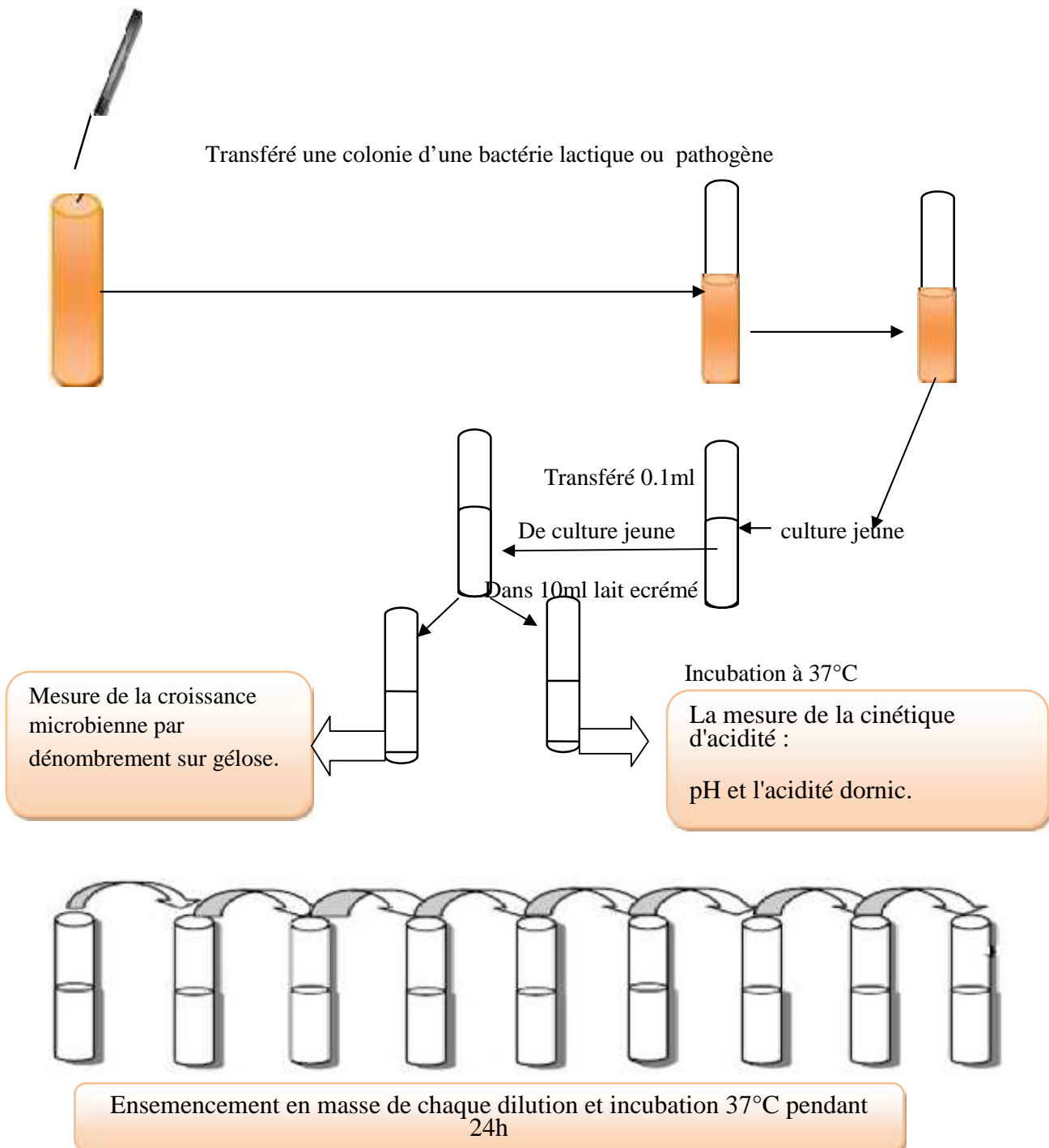


Figure 08 : Les différentes étapes de la cinétique de croissance et d'acidification.

2.7-La détermination des profils de sensibilité aux antibiotiques

Pour chaque souche testée, une colonie de morphologie typique a été sélectionnée et repiquée sur milieu MRS liquide, et incubé pendant 18h. La densité optique des cultures a été aux environs 0.08 à 0.1. Les souches sont étalées sur milieu Mueller Hinton à l'aide d'écouvillon, Dix disques antibiotiques ont été testés : tétracycline 30µg, cefotaxime30µg, gentamicyne10µg, ampilicilline10µg, amoxicilline25µg, penicilline10µg, bacitracine10µg, vancomycine30µg, metronidazole5µg, sulphaméthoxazole23,75µg+trimehtoprime1,25µg.

La gélose avec disques d'antibiotiques ont été ensuite incubées pendant 24 h. Les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés à l'aide d'une pie à coulisse. Les résultats ont été exprimé comme sensibles (S), intermédiaires (I) et résistantes (R) selon les normes recommandées (Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie, 2007).

2.8-Traitement statistique des résultats

Les données expérimentales de l'étude de la culture mixte des bactéries lactiques avec *S.aureus* et *E.coli* sont statistiquement testées par l'analyse de (ANOVA Repeated mesure), le seuil de signification de 0.05 a été retenu, l'analyse de corrélation entre la croissance en culture mixte et le pH été effectué, le seuil de signification de corrélation de 0.1 a été retenu. Le logiciel été graph pad Prism 6 utilisé.

1-Isolement et purification de la souche lactique S2a

la souche lactique a été isolé à partir d’un échantillon de yaourt sur milieu M17 lactosé, la souche lactique a été pré identifiée à ce stade sur la base de son aspect macroscopique et microscopique ainsi que des tests physiologiques tels que la croissance à différentes températures , dans des milieux hyper-salés à différentes concentrations et la capacité de hydrolyse de l’arginine.

L’étude macroscopique consiste en une observation à l’œil nu, l’aspect de culture en milieu gélosé permet de déterminer la forme, la taille, la couleur et l’aspect des colonies.

L’observation macroscopique a montré en effet que toutes les colonies avaient une couleur blanchâtre, bien rondes à bords lisses, laiteuses de forme sphérique plus ou moins allongées , de petite taille avec un diamètre de 0.5 à 1mm disposées par paires, en chaines longues.

Sur bouillant, la souche présente un trouble homogène qui caractérise le groupe des bactéries lactiques.

L'observation microscopique a révélé la forme de cellule qui est la forme cocci à Gram(+),ces coques sont disposées en paires ou en chaînettes plus ou moins longues.

L’identification de la souche basée sur des tests physiologiques et hydrolyse de l’arginine, ces tests indiquent que la souche a était dépourvue de toute activité de catalase, capable de pousser à température élevée. Par ailleurs elle est sensible à la croissance au milieu hypersalé à Nacl 6.5% et au lait de Sherman, de plus elle ne produit plus de l’arginine d’ammonium à partir de l’arginine. Le tableau 03 suivant illustre ses caractéristiques.

Tableau 03: Tableau illustratif des caractéristiques de la souche lactique S2a

Nacl 4%	Nacl 6.5%	10°C	37°C	45°C	Lait sherman 0,1%	Lait sherman 0,3%	Thermorésistance	ADH
+	-	-	+	+	-	-	+	-

(+) croissance de la souche.

(-) pas de croissance de la souche.

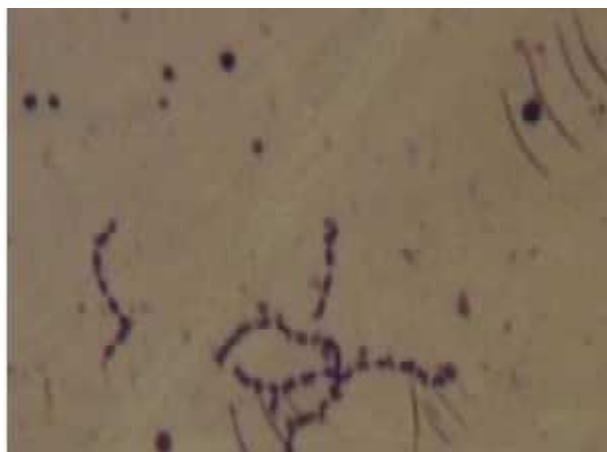


Figure 09: Aspect microscopique de la souche *S2a* après la coloration du gram.



Figure 10 : Croissance de la souche *S2a* dans le bouillon et la gélose.

Plusieurs auteurs ont rapporté des constatations similaires de ces caractères chez les souches de *Streptococcus thermophilus* (Cheriguene *et al.*, 2007 ; Chougrani *et al.*, 2008). De même (Loumani *et al.* ;2010 ; Hafed *et al.* ; 2012) ont isolés des souches à partir de quatre différent yaourt en Algérie ,ainsi qu'à partir de beurre à base de lait de chèvre .

2-Activité inhibitrice des souches lactiques

Les bactéries lactiques jouent un rôle important que se soit dans la bio-conservation des aliments ou dans la biothérapie grâce à leur pouvoir d’inhiber les bactéries pathogènes et altérantes (Dortu *et al*, 2009). Cette inhibition est conférée soit par la diminution du pH suite à la production d’acides organiques ou par la production de différents métabolites tels le peroxyde d’hydrogène, le diacétyl, le dioxyde de carbone, la reutéline et les bactériocines (Albano *et al.*, 2007).

Six souches lactiques ont été utilisées pour évaluer leur potentiel antimicrobien, le spectre d’activité de ces souches a été utilisé entre eux et sur une gamme de souches de bactéries pathogènes à Gram positif et à Gram négatif. La méthode de double couche sur milieu MRS à pH 6,2 et tamponné pH 7 a été choisie pour cet objectif car c’est une méthode simple qui permet de tester l’effet de plusieurs bactéries lactiques à la fois vis-à-vis d’une souche indicatrice .

2.1-Interactions entre les bactéries lactiques par la méthode de double couche

Les résultats de l’interaction obtenue, révèlent la présence des zones claires au tour des souches lactiques. Les résultats de l’interaction entre les souches lactiques sont montrés dans le tableau 04 et la figure 11.

Tableau04 : Interactions entre les bactéries lactiques à pH6.2 par la méthode de double couche, le diamètre de zone d’inhibition est mesuré en (mm).

	<i>Ln. mesenteroides</i> <i>Rs6</i>	<i>Lc.s lactis</i> <i>Ma1</i>	<i>Lc. lactis</i> <i>Ma2</i>	<i>Lc. lactis subsp</i> <i>diacetylactisD17</i>	<i>Ln. mesenteroides</i> <i>dextranicum</i> <i>D19</i>	<i>Streptococcus</i> <i>thermophilus</i> <i>S2a</i>
<i>Ln.mesenteroides</i> <i>Rs6</i>	-	11	11	13	8	8
<i>Lc.lactis Ma1</i>	11	-	12	10	8	8
<i>Lc. lactis Ma2</i>	10	8	-	13	8	11
<i>Lc.lactis subsp</i> <i>diacetylactis D17</i>	8	9	7	-	8	10
<i>Ln mesenteroides</i> <i>dextranicum D19</i>	8	6	10	9	-	10
<i>Streptococcus</i> <i>thermophilus S2a</i>	10	11	8	8	12	-

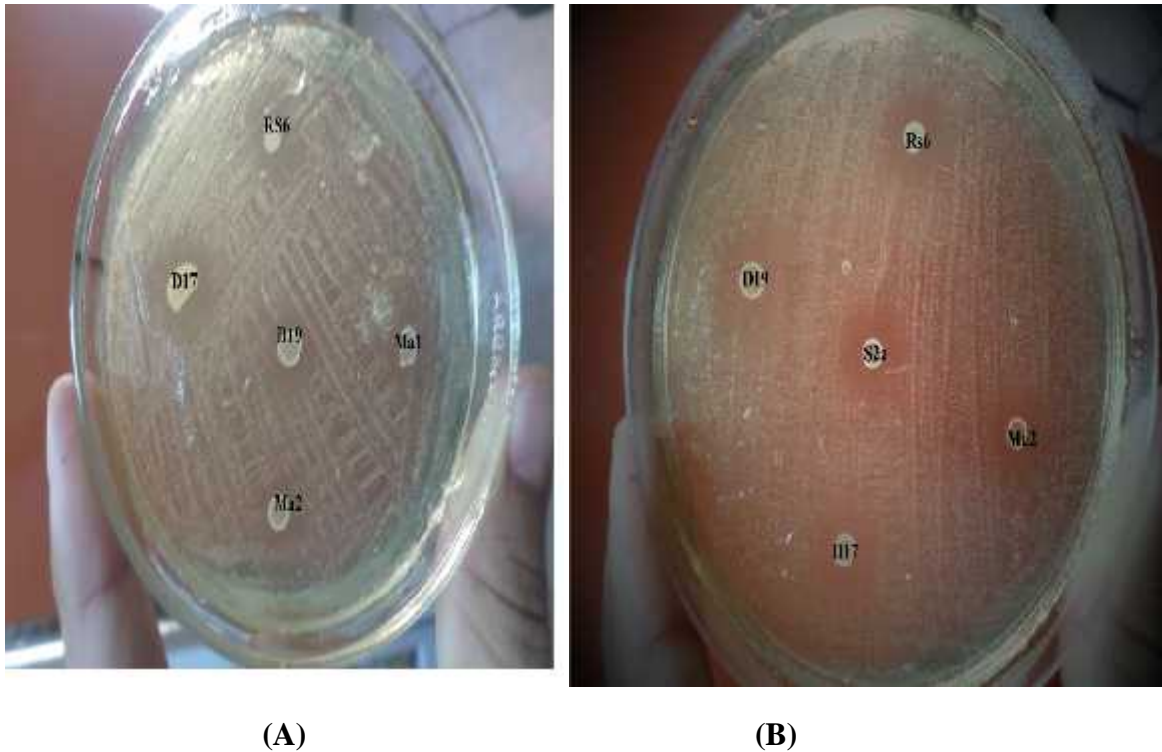


Figure 11 : Interactions entre les bactéries lactiques par la méthode de double couche à pH6.2
 (A) *St.thermophilus* ; (B) *Lc.lactis* Ma1

Les résultats ont relevés un effet d'inhibition entre toutes les souches lactiques par des zones d'inhibition qui varient entre 6mm et 13mm.

Nos résultats sont similaires avec (Hadeif *et al.*,2012) qui ont montré que la souche *Lc. lactis ssp. cremoris* C27 a montré une activité inhibitrice, la plus remarquable vis-à-vis à des espèces de *Ln. mesenteroides ssp. cremoris* C20, *Lc. lactis ssp. cremoris* C24 et *Lc. lactis ssp. lactis* C26.

De même (Mami *et al.*,2008) remarque que les souches lactiques Lb.68 (*Lb.plantarum*) ;Lb.55(*Lb.rhamnosus*) inhibent la souche Lb.58 (*Lb. plantarum*) avec des diamètres qui varient entre 3mm et 8mm, mais la Lb.58 n'est pas inhibée par elle-même, alors on peut dire qu'il n'y a pas d'auto-inhibition, ceci est due à la protection de la souche contre ses propres métabolites (Guessas *et al.*, 2005).

2.2-Interactions entre les souches lactiques et pathogènes par la méthode de double couche à pH 6,2

Les résultats obtenus au niveau de la figure 12 ont démontré la présence de zones d'inhibition autour des spots traduisant ainsi une activité inhibitrice des souches lactiques testées contre la totalité des souches cibles utilisées. Le tableau 05 représente les diamètres d'inhibition exprimé en millimètres obtenues pour chaque souche. Les souches présentant une zone claire d'extension latérale supérieure à 2 mm sont considérées comme productrices de substances antibactériennes (Fleming *et al.*, 1975).

Tableau 05: Interaction entre les souches lactiques et pathogènes à pH 6,2 par la méthode de double couche. le diamètre de zone d'inhibition est mesuré en (mm).

	<i>Ln. mesenteroides</i> <i>Rs6</i>	<i>Lc. lactis</i> <i>Ma1</i>	<i>Lc. lactis</i> <i>Ma2</i>	<i>Lc. lactis subsp</i> <i>diacetylactis</i> <i>D17</i>	<i>Ln.mesenteroide</i> <i>dextranicum</i> <i>D19</i>	<i>St. thermophilus</i> <i>S2a</i>
<i>E.coli E14</i>	21	19	17	14	11	14
<i>E.coli</i> <i>ATCC10536</i>	18	16	13	18	13	13
<i>S.aureus SA14</i>	12	18	19	8	9	16
<i>S.aureus</i> <i>ATCC6538</i>	17	13	14	18	11	12
<i>S.aureus</i> <i>ATCC25923</i>	13	18	17	16	9	11
<i>Salmonella</i> <i>spp SP14</i>	12	11	11	13	11	12
<i>Salmonella</i> <i>ATCC14028</i>	11	13	13	13	12	12
<i>Pseudomonas</i> <i>aerogenosa</i> <i>P14</i>	11	8	8	10	8	10
<i>Pseudomonas</i> <i>aerogenosa</i> <i>ATCC27853</i>	22	18	15	12	14	15
<i>Bacillus.cereu</i> <i>ATCC10876</i>	15	16	13	18	13	13
<i>Bacillus.subtil</i> <i>ATCC6633</i>	10	16	18	16	10	15
<i>Klebscella</i> <i>ATCC4352</i>	11	15	13	17	12	11

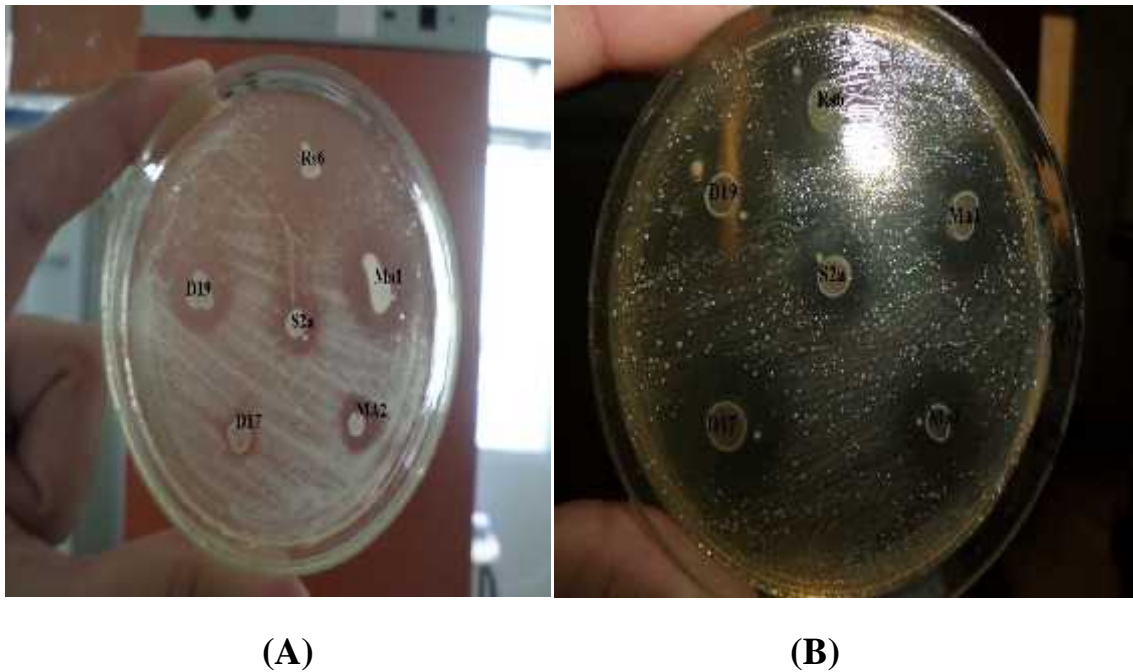


Figure 12 : Interaction par la méthode de Fleming *et al.*, (1975) à pH 6,2 (A) *S.aureus* ATCC25923 ; (B) *Pseudomonas aerogenosa* ATCC27853.

La meilleure zone d'inhibition 22 mm de diamètre a été observée pour la souche Rs6 (*Ln.mesenteroides*) contre *Pseudomonas aerogenosa* ATCC 27853 , tandis que la plus petite avec un diamètre de 8 mm de diamètre a été observée pour les souches *Lc.lactis* Ma1 ,Ma2 et *Ln.mesenteroides subsp dextranicum* D19 contre *Pseudomonas aerogenosa* P14, aussi on a observée le même diamètre pour la souche *Lc.lactis subps lactis biovar diacétylactis* contre *stahpylococcus aureus* SA14 .

Concernant les souches lactiques, la souche Ma1 identifiée *Lc.lactis* apparaît la plus performante avec les meilleures zones d'inhibition contre huit des douze souches indicatrices utilisées (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *E. coli* E14 , *E.coli*ATCC 10536, , *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, et *Klebsiella pneumoniae* ATCC74352).

Les souches *Ln.mesenteroides* (Rs6) et *Lc.lactis* subsp *lactis* biovar *diacétylactis*(D17) ont un pouvoir d'inhibition important sur les souches indicatrices. La souche *Ln.mesenteroides* a un pouvoir d'inhibition entre 10mm et 22mm et la souche *Lc.lactis subps lactis biovar diacétylactis* a un pouvoir d'inhibition entre 10mm et 18mm.

Nos résultats sont similaires à ceux de Belarbi *et al.*, 2011 qui ont trouvé que la majorité des souches de *Leuconostocs* présentent un potentiel à inhiber la croissance des bactéries ciblées.

Au sein de ces bactéries, plusieurs possèdent un potentiel élevé, surtout les deux souches *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides* Ln14 et Ln15 qui présentent des zones d'inhibition de 24 mm de diamètre vis-à-vis *Escherichia coli*, *S. aureus*.

Les souches *Lactococcus lactis* subsp *lactis* biovar *diacetylactis* L1 et L2 possèdent un spectre d'activité large parmi les autres *lactocoques* isolées avec un diamètre d'inhibition de 8 mm et 18 mm contre *E. coli* et un diamètre d'inhibition 6 mm et 10 mm contre *S. aureus* respectivement.

Des résultats ont été démontrés par Gyu et Hyung (2006) ayant trouvé que parmi les souches isolées à partir de Jeotgal aliment fermenté Coréen, les souches *Ln. mesenteroides* présentent des zones d'inhibition contre *S. aureus* avec un diamètre de 22 mm.

González *et al.*, (2007) ont isolé 125 souches de *Lactococcus* dont 13 souches étaient capables d'inhiber la croissance de *Staphylococcus aureus*, aussi ont montré que les souches de *Leuconostoc* qui ont été isolées à partir de « Genestoso » un fromage fabriqué à partir du mélange de lait chèvre, vache et de brebis en Espagne avaient une activité inhibitrice contre *S. aureus*, *L.monocytogenes*.

Concernant *St. thermophilus*, cette dernière a un pouvoir d'inhibition à toutes les souches pathogènes avec un diamètre d'inhibition entre 10 à 16mm, (Loumani *et al.*,2010) ont montré que *St. thermophilus* produit des substances inhibitrices contre *E.coli* avec un diamètre 18mm .

Concernant les souches indicatrices, toutes les souches ont été sensibles avec des zones d'inhibition variables, mais *Pseudomonas aeruginosa* P14 était la plus résistante avec un maximum d'inhibition de 11 mm obtenu par la souche Rs 6 identifiée *Ln. mesenteroides* . Ammor *et al.* (2006) ont signalé également la résistance de *Pseudomonas* à toutes les souches lactiques testées. De même (Ababsa *et al.*,2011) ont montré que *Pseudomonas aeruginosa* était la plus résistante avec un maximum d'inhibition de 8.5 mm obtenu par la souche *En. durans*.

2.3-Inhibition due à l'acide lactique

L'acide lactique est un facteur majeur dans les inhibitions. Ce test a pour but d'étudier l'effet de l'abaissement du pH sur le développement des souches indicatrices. Nous avons procédé selon la méthode de Fleming et *al.* (1975) sauf que nous avons utilisé le milieu MRS tamponné à pH 7 .

La lecture des boîtes s'effectue après 24h d'incubation à 37°C en aérobiose, la lecture des résultats se fait par comparaison au milieu témoin pH6.2 .La taille des zones d'inhibition produites a été mesurée en mm. Les résultats montrent que la dimension des diamètres a diminué (tableau 06, figure 13).

Tableau 06: Interaction par la méthode de Fleming *et al.*,(1975) tamponné à pH7 , le diamètre de zone d'inhibition est mesuré en (mm).

	<i>Ln. mesenteroides Rs6</i>	<i>Lc. lactis Ma1</i>	<i>Lc. lactis Ma2</i>	<i>Lc. Lactis subsp diacetylactis D17</i>	<i>Ln. mesenteroides dextranicum D19</i>	<i>St. thermophilus S2a</i>
<i>E.coli E14</i>	10	11	12	13	13*	12
<i>E.coli ATCC10536</i>	13	16	15*	13	19*	19*
<i>S.aureus SA14</i>	15*	13	13	14*	12*	11
<i>S.aureus ATCC 6538</i>	13	12	10	17	12*	13*
<i>S.aureus ATCC25923</i>	8	11	12	11	7	10
<i>Salmonella spp SP 14</i>	11	9	9	16*	16*	12
<i>Salmonella ATCC14028</i>	9	11	14*	10	12	12
<i>Pseudomonas P14</i>	11	10*	10*	14*	12*	8
<i>Pseudomonas ATCC27853</i>	7	8	9	8	10	11
<i>Bacillus.cereu ATCC10876</i>	12	11	12	12	14*	13
<i>Bacillus.subtil ATCC6633</i>	11*	20*	16	14	17*	14
<i>Klebscella ATCC4352</i>	12*	15	16	18*	10	17*

(*) Zone d'inhibition augmentée.

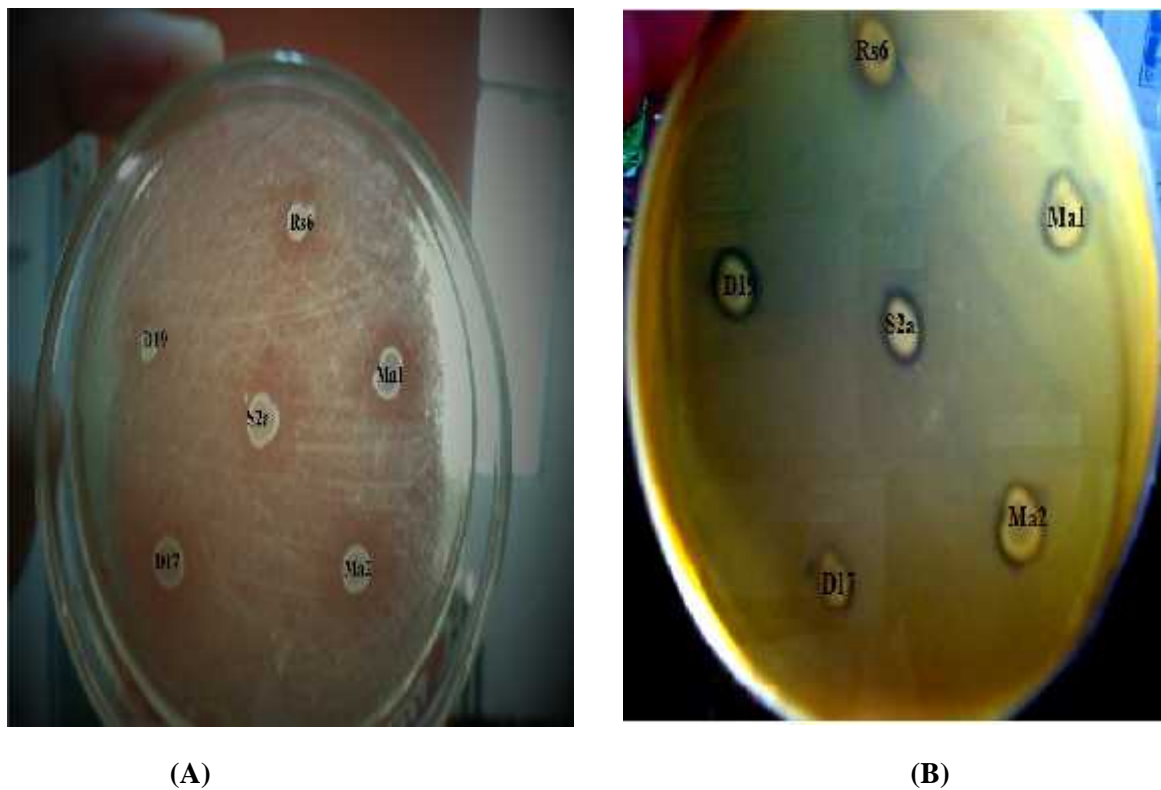


Figure 13: Interaction par la méthode de Fleming *et al.*, (1975) sur milieu tamponnée à pH 7. (A) *S.aureus* ATCC25923 ; (B) *Pseudomonas* ATCC27853

On remarque que les bactéries pathogènes cibles testés ont été inhibés par toutes les souches lactiques utilisées.

Concernant les zones d'inhibitions, ces zones d'inhibitions sont petites comparativement aux zones d'inhibition qui ont trouvées précédemment. Et on note que il y a des souches lactiques leur spectre d'inhibition est augmenté sur le milieu tamponné à ph 7 comparé à le milieu à pH6.2.

Nos résultats sont similaires avec (Belarbi *et al.*, 2011) qui note que les différentes souches de *Leuconostoc* (Ln), ces zones d'inhibition sont petites comparativement aux zones d'inhibition qui ont été trouvées. En revanche, la souche *Lactococcus* (L2), leur spectre d'inhibition est augmenté contre *E. coli* 18 mm observé sur milieu non tamponné comparé au milieu tamponné pH 6, 1 (20 mm de diamètre).

L'activité antibactérienne des souches lactiques peut être due à la production de plusieurs agents antibactériens. L'acide lactique et l'acidification du milieu inhibent plusieurs types de bactéries.

Aussi, ces souches produisent aussi le diacétyl, qui possède aussi un pouvoir d'inhibition. L' H_2O_2 , libéré par les souches lactiques inhibent les bactéries qui ne possèdent pas des défenses contre le stress oxydatif (Almmor *et al.*, 2008 ; Mami *et al.*, 2012).

2.4-Interaction par la méthode de puits ou de Barefoot et Kaenhammer (1983)

Les essais de l'activité bactériocinogène des surnageants ont été réalisés par la méthode des puits. Les résultats n'ont démontré aucune zone d'inhibition autour des puits figure 14, traduisant ainsi l'absence d'activité bactériocinogène dans ces derniers, et ceci malgré de nombreuses répétitions.

Des mêmes analogues ont été signalés par Ammor *et al.* (2006) où l'activité a été détectée seulement sur milieu BHI solide, tandis que la recherche de celle-ci dans le surnageant sous les conditions qui éliminent l'effet des acides organiques et de peroxyde d'hydrogène étant sans succès. Ceci a été expliqué par l'attachement des bactériocines à la paroi de la cellule productrice, l'inhibition n'aura donc lieu que lorsque cette dernière soit en contact avec la souche indicatrice.

La fréquence de la production des bactériocines diffère selon les souches; Luo *et al.* (2011) ont démontré que seulement cinq souches sur un total de 256 souches de bactéries lactiques testées ont produit des bactériocines.

De même, Salminen *et al.* (2004) ont signalé que quatre sur cinquante des souches de bactéries lactiques étaient productrices de bactériocines, et que la majorité des souches de *Pediococcus acidipropionici*, *Pediococcus jensenii*, et *Pediococcus thoenii* ont présentent une activité bactériocinogène.

Aussi Belabri *et al.* (2011) ont montré aucune activité bactériocinogène des bactéries lactiques isolées de lait de chèvre et de vache de total 53 souches.

Castro *et al.* (2011) n'ont isolé qu'une seule souche bactériocinogène sur un ensemble de 141 souches testées. D'autre part, il a été suggéré que tous les membres des eubactéries et également des archéobactéries, si fraîchement isolés de leurs écosystèmes naturels, sont équipés de la capacité d'expression des bactériocines. Le fait de ne pas mettre en évidence la production de ces dernières est dû à ce que les chercheurs n'ont pas encore déterminé les conditions appropriées pour l'expression de cette capacité bactériocinogène *in vitro* (Riley et Chavan, 2007 ; Gillor *et al.*, 2008).

L'incapacité des bactéries lactiques de produire les bactériocines dans le milieu de culture liquide a été déjà signalée par Barefoot et Klaenhammer (1983) qui ont suggéré que celle-ci peut être probablement attribuée à l'inactivation des bactériocines par les enzymes protéolytiques sous les conditions de croissance. Les facteurs supplémentaires ajoutés dans le milieu de cultures tel le glucose, le magnésium ainsi que les conditions de culture peuvent également affecter la production des bactériocines. En effet, la production de bactériocines peut être augmentée si la cellule productrice est stressée du point de vue nutritionnel ou écologique (Riley et Chavan, 2007).

Il est à noter que la production de bactériocines, comme tout acte biologique, nécessite une dépense d'énergie pour la cellule productrice, ces bactériocines doivent donc être fonctionnellement indispensables pour l'existence et la survie de ces cellules pour qu'elles les produisent. En effet, la production de bactériocines est un système de défense dont les bactéries lactiques utilisent contre les autres bactéries avec lesquelles elles entrent en compétition pour l'habitat et les nutriments dans la nature.

Résultats et Discussion

Sous les conditions du laboratoire où la bactérie se trouve en monoculture, en absence de concurrence et en excès de nutriments, la production de bactériocines s'avère alors sans sens et inutile pour la bactérie lactique (Riley et Chavan, 2007). Cette hypothèse pourrait expliquer donc le fait que les souches lactiques isolées dans ce travail ne synthétiseraient pas de bactériocines dans les conditions testées.

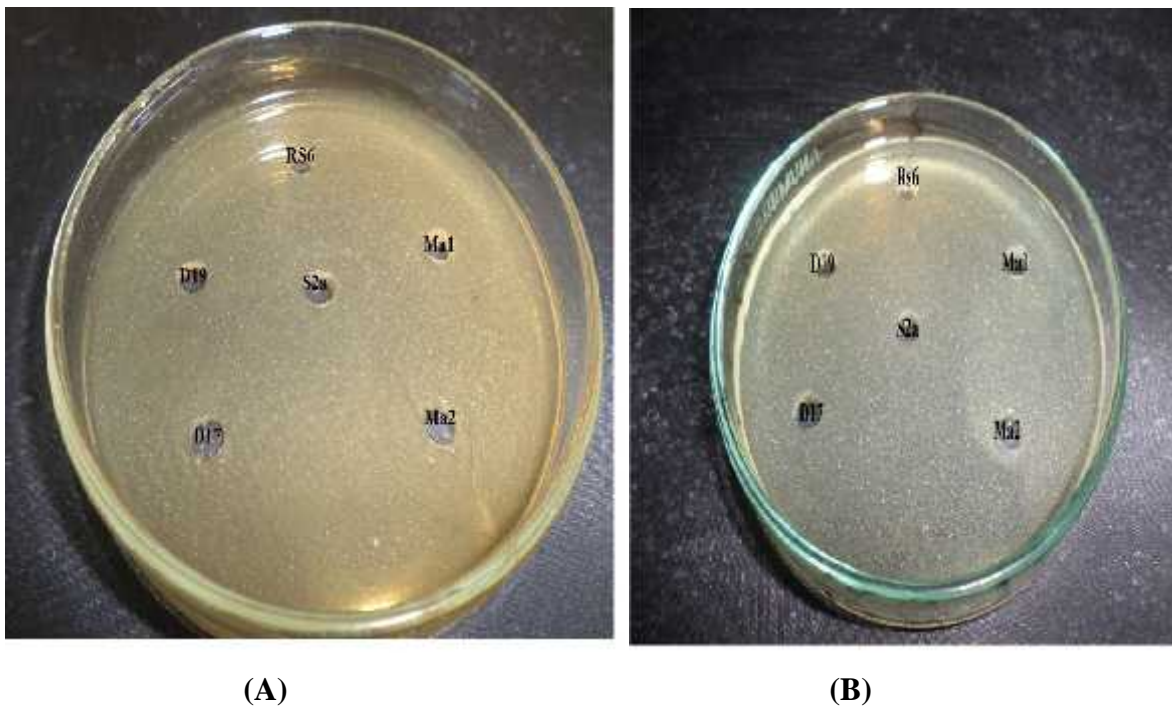


Figure 14: Interaction par la méthode de Barefoot et Kaenhammer (1983) (A) *E.coli* ATCC10536 et (B) *S.aureus* ATCC25923.

3-Pouvoir acidifiant des souches lactiques

L'activité acidifiante est l'une des principales fonctions des bactéries lactiques. Les résultats obtenus sont illustrés dans les figures 15 , 16.

D'après ces résultats, nous remarquons que les bactéries lactiques présentent une production progressive en acide lactique. Cette dernière est accompagnée d'un abaissement du pH du milieu.

Après trois heures d'incubation, les valeurs de pH varient entre pH 6,23 et pH 5,61 en parallèle la quantité d'acide lactique produite se situe entre 2,3g /l et 2,9g/l .

Au bout de 24h d'incubation ces valeurs de pH diminues entre pH 4,37 et pH 4,39, de même la quantité de l'acide lactique produite variant entre 7,2 et 8,7 g/l.

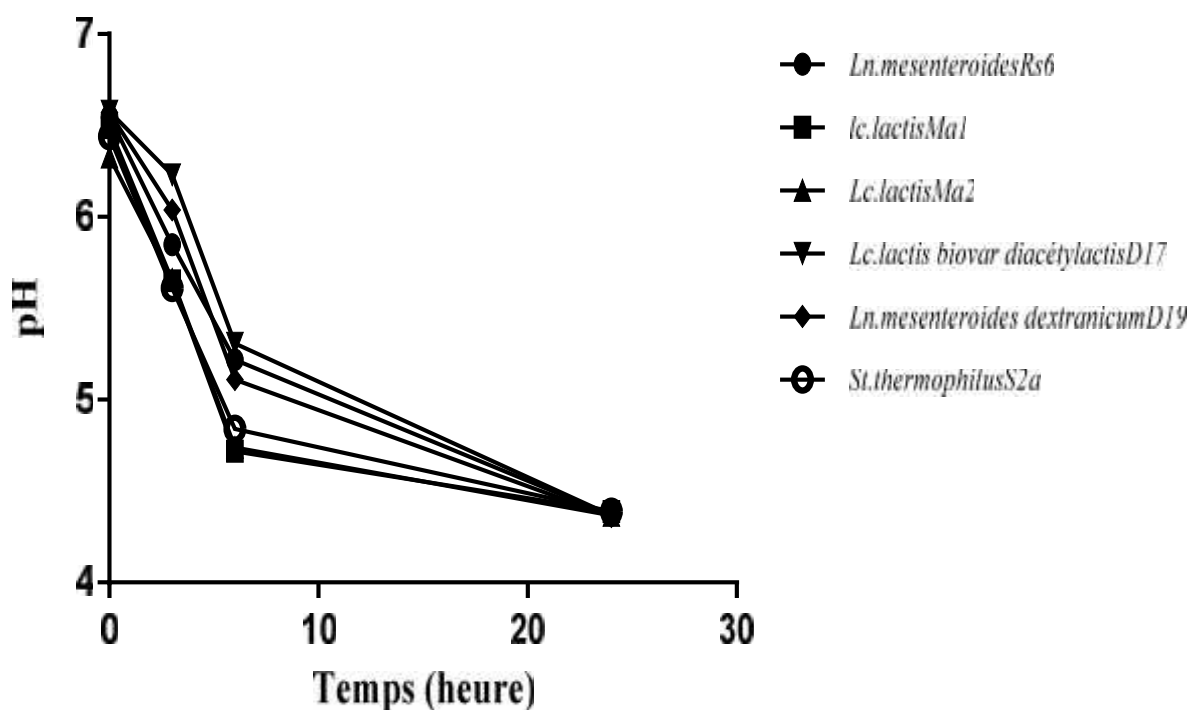


Figure 15 : Cinétique d'acidification par les souches lactiques.

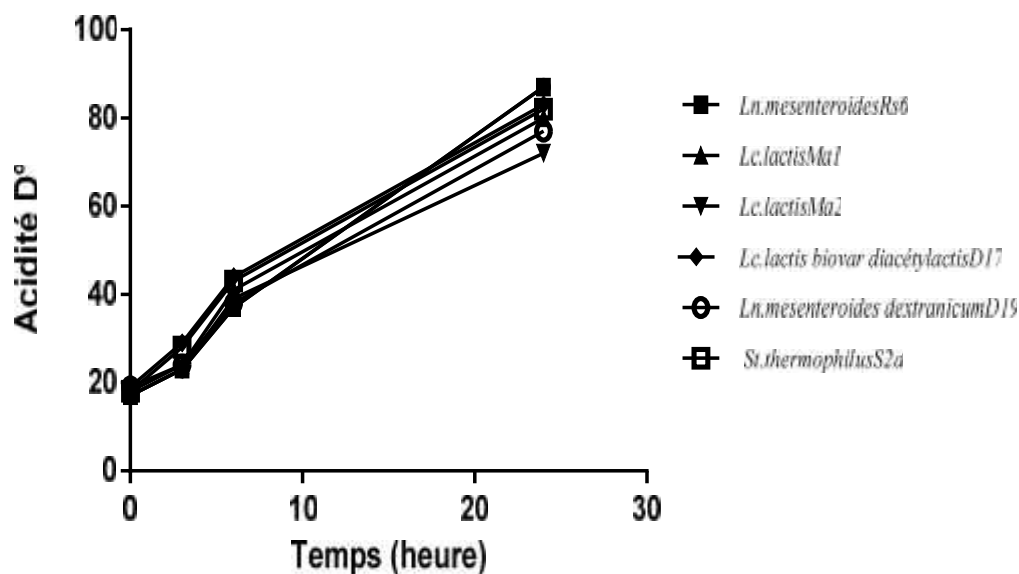


Figure 16 : Cinétique de la production d'acide lactique par les souches lactiques.

Après 24h d'incubation, les espèces *Lc. Lactis Ma2* ; *Ln mesenteroides subsp dextranicum* ; *St.thermophilus* ; *Lc. Lactis Ma1* ; *Lc. lactis subps lactis biovar diacetylactis* avaient un pouvoir acidifiant avec une quantité d'acide lactique de 7,2 ; 7,7 ; 8,0 ; 8,2 ; 8,3 g/l respectivement

Un maximum de 8,7g/l d'acide lactique a été produit par la souche *Ln. mesenteoides* après 24 h d'incubation.

Nos résultats concordent avec ceux de Idoui *et al.* (2009), qui ont trouvé que *Lc. lactis ssp. lactis*, *Ln. lactis* et *Lc. lactis ssp. cremoris* produisent des quantités en acide lactique supérieures à 8,5g/l après 24h d'incubation. Par contre Cheriguene *et al.* (2006) ont rapporté une activité acidifiante de *Lc. lactis ssp. lactis* une moyenne de 7,5g/l après le même temps d'incubation.

Roukas et Kotzekidou (1998) travaillant sur la production d'acide lactique à partir de lactosérum en culture pure et mixte de *Lactococcus lactis*, ont montré que la concentration la plus élevée en acide lactique est obtenue en culture mixte (22,5g/l) alors qu'en culture pure la concentration est de l'ordre de 10,5g/l. De même Mangia *et al.* (2008), ont étudié la cinétique d'acidification de la souche *Lc. lactis ssp. lactis* CFM7 isolée à partir du lait de brebis, ont trouvé qu'après 24h, cette souche, produit 7,2g/l d'acide lactique.

4-Etude de l'évolution de la croissance en culture mixte

4.1-Dénombrement de *E. coli* ATCC 10536 en culture pure et mixte

L'étude de la cinétique de croissance des souches lactiques et *Escherichia coli* ATCC 10536 seule ou en culture mixte a été réalisée dans du lait écrémé. Le dénombrement s'effectue à un intervalle de temps de 0h, 3h, 6h, 24h, 48h.

Les résultats obtenus de dénombrement et le pouvoir acidifiant de *E.coli* en culture pure et mixte avec les souches lactiques sont montrés dans les figures 17, 18.

Après 24h, en culture pure le dénombrement de *E.coli* atteint 9,85 log ufc/ml.

Après 24h, en culture mixte on aperçoit une diminution de la densité *E.coli* atteint 5,80 ; 5.12 ; 5.76 log ufc/ml avec les souches lactiques Rs6 :*leuconostoc mesenteroides* ; Ma1 :*lactococcus lactis* ; D17 : *lactococcus lactis subsp lactis biovar diacetylactis* respectivement.

Après 48h, en culture mixte le dénombrement de *E.coli* atteint 5,50 ;4.95 ; 0 log ufc/ml avec les souches lactiques Rs6 :*leuconostoc mesenteroides* ;Ma1 :*lactococcus lactis* ; D17 : *lactococcus lactis subsp lactis biovar diacetylactis* respectivement.

Après 48h, le pH de lait écrémé est diminué à 5.99 pour la culture pure *E.coli* de et pour la culture mixte à 4.50 ; 4.54 ; 3.99 avec les souches lactiques Rs6 :*leuconostoc mesenteroides* ; Ma1 :*lactococcus lactis* ; D17 : *lactococcus lactis subsp lactis biovar diacetylactis* respectivement.

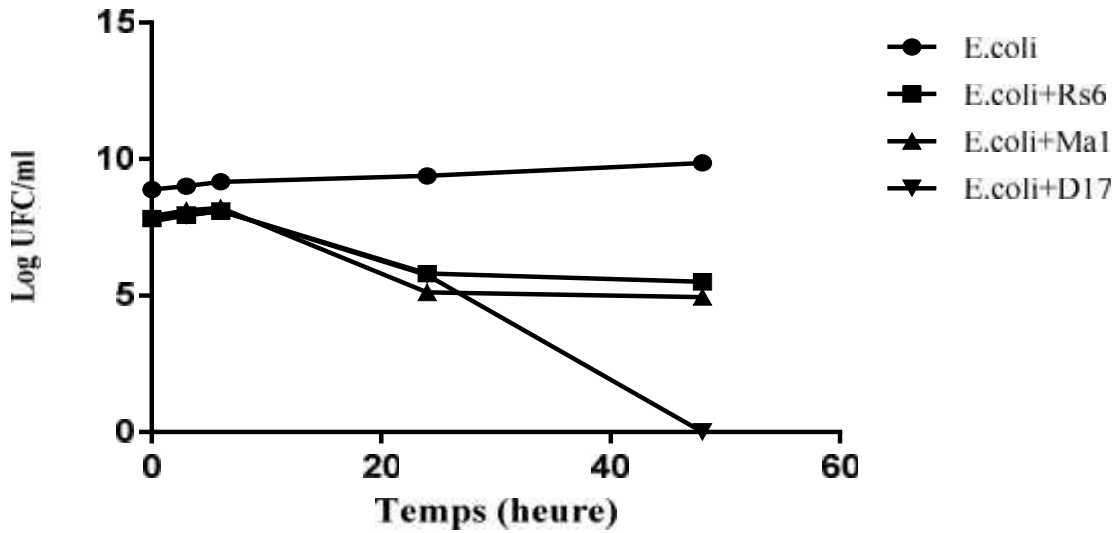


Figure 17: Cinétique de croissance en culture pure et mixte de *E.coli* ATCC 10536 et *Rs6* :*leuconostoc mesenteroides* ;*Ma1* :*lactococcus lactis* ; *D17* : *lactococcus lactis* subsp *lactis* biovar *diacetylactis*

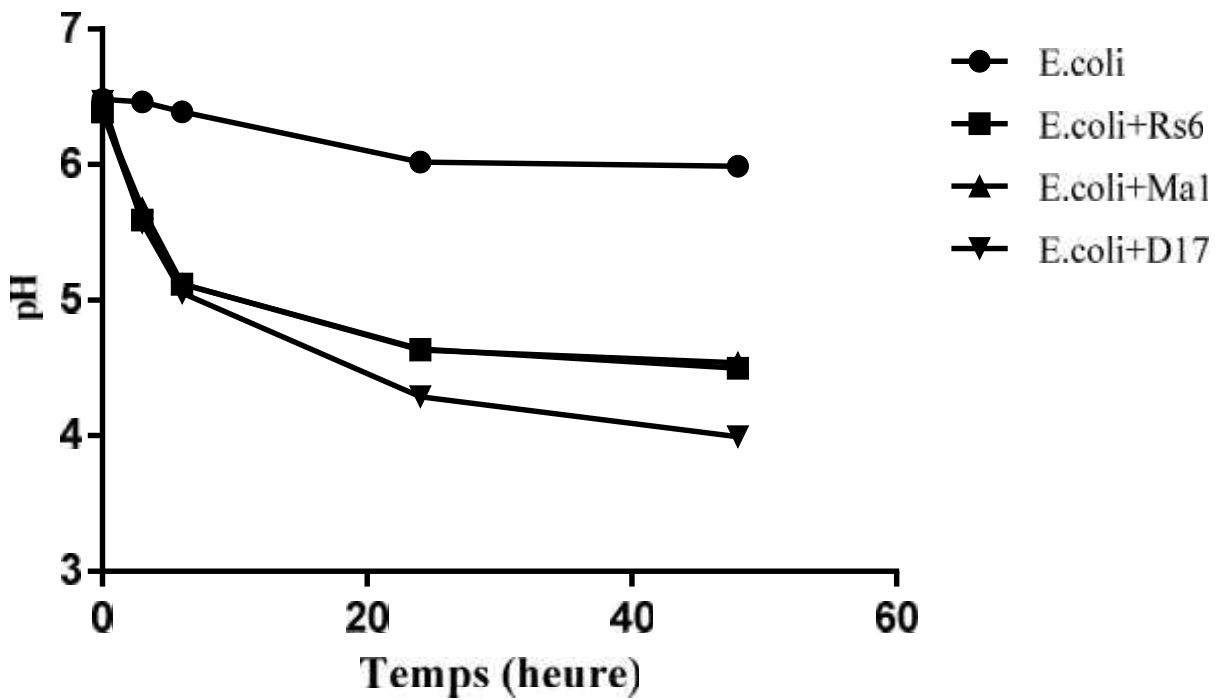


Figure 18 : Pouvoir acidifiant en culture pure et mixte de *E.coli* ATCC 10536 et *Rs6* :*leuconostoc mesenteroides* ;*Ma1* :*lactococcus lactis* ; *D17* : *lactococcus lactis* subsp *lactis* biovar *diacetylactis*

L'analyse statistique ANOVA a montré qu'il y a une différence significative d'inhibition entre ces souches lactiques $P < 0.05$, le tableau 07 illustre que il y a une corrélation entre la diminution de la croissance de la souche *E. coli* en culture mixte et le pH de milieu $p < 0,1$.

Tableau07 : Analyse de corrélation entre la croissance de la souche *E. coli* en culture mixte et le pH de milieu.

	<i>E. coli</i> et <i>Ln.mesenteroides</i>	<i>E. coli</i> et <i>Lc.lactis</i>	<i>E. coli</i> et <i>Lc.lactis</i> <i>biovar diacetylactis</i>
Pearson r	0,7612	0,7709	0,7303
Intervalle de confiance à 90%	-0,1629 à 0,9739	-0,1399 à 0,9751	-0,2298 à 0,9700
P value	0,0675	0,0635	0,0806

4.2-Dénombrement de *S.aureus* ATCC 25923 culture pure et mixte

L'étude de la cinétique de croissance des souches lactiques et *S.aureus* ATCC 25923 seule ou en culture mixte a été réalisée dans le lait écrémé. Le dénombrement s'effectue à l'intervalle de temps 0h, 3h, 6h, 24h, 48h.

Les résultats obtenus de dénombrement et pouvoir acidifiant de *S.aureus* en culture pure et mixte avec les souches lactiques sont montrés dans les figures 19, 20.

Après 24h, en culture pure le dénombrement de *S.aureus* atteint 8.09 log ufc/ml.

Après 24h, en culture mixte on remarque une diminution de la densité *S.aureus* atteint 5,83 ; 5.75 ; 5.62 log ufc/ml avec les souches lactiques Rs6 :*leuconostoc mesenteroides* ; Ma1 :*lactococcus lactis* ; D17 : *lactococcus lactis biovar diacetylactis* respectivement. Après 48h, en culture mixte le dénombrement de *S.aureus* atteint 4.67 ;3.49 ; 0 ufc/ml avec les souches lactiques Rs6 :*leuconostoc mesenteroides* ;Ma1 :*lactococcus lactis* ; D17 : *lactococcus lactis subsp lactis biovar diacetylactis* respectivement.

Après 48, le pH de lait écrémé est diminué à 5.45 pour la culture pure *S.aureus* de et pour la culture mixte à 4.40 ; 3.69 ; 3.71 avec les souches lactiques Rs6 :*leuconostoc mesenteroides* ; Ma1 :*lactococcus lactis* ; D17 : *lactococcus lactis subsp lactis biovar diacetylactis* respectivement.

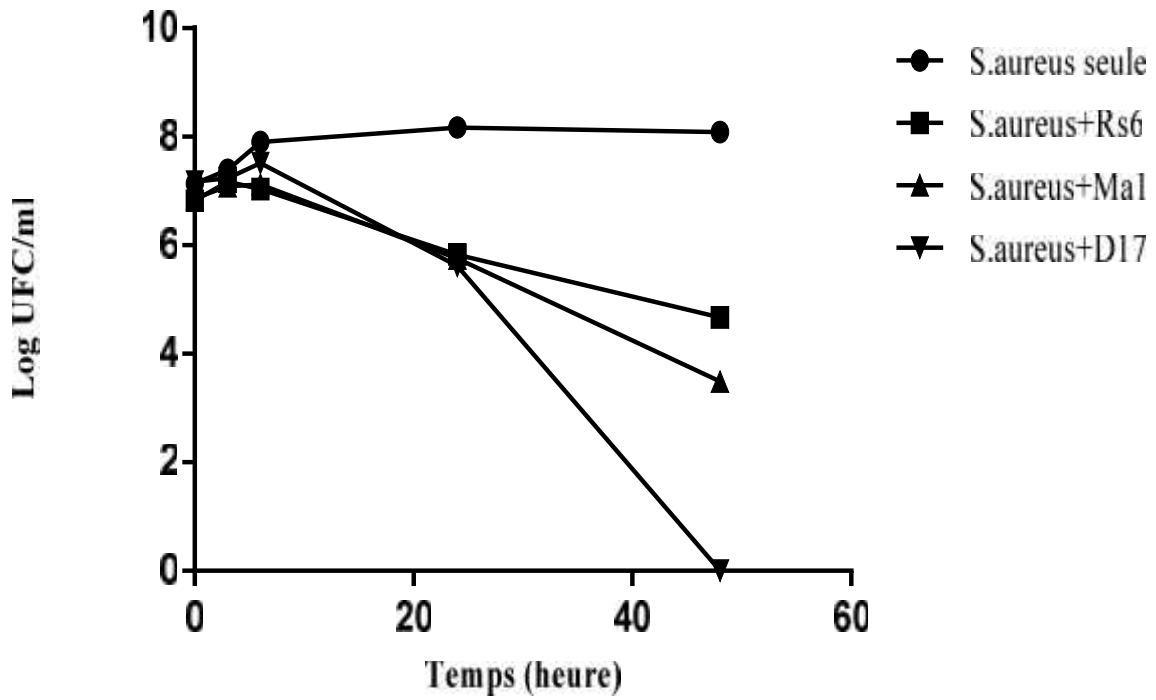


Figure 19 : Cinétique de croissance en culture pure et mixte de *S.aureus* ATCC 25923 et Rs6 :*leuconostoc mesenteroides* ;Ma1 :*lactococcus lactis* ; D17 : *lactococcus lactis* subsp *lactis* biovar *diacetylactis*.

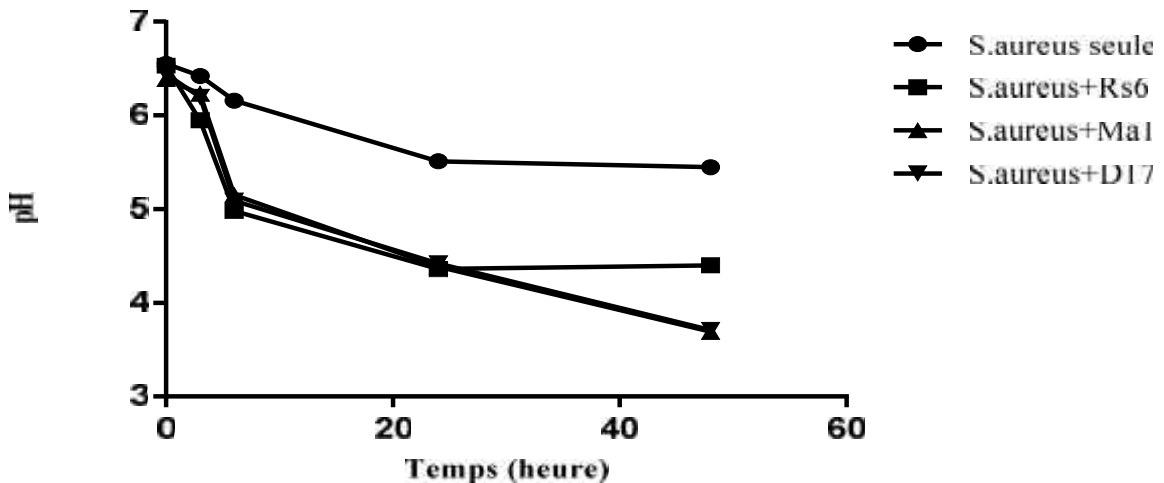


Figure 20: Pouvoir acidifiant en culture pure et mixte de *S.aureus* ATCC 25923 et Rs6 :*leuconostoc mesenteroides* ;Ma1 :*lactococcus lactis* ; D17 : *lactococcus lactis* subsp *lactis* biovar *diacetylactis*.

Résultats et Discussion

L'analyse statistique ANOVA a montré que il ya une différence significative d'inhibition entre ces souches lactiques $P < 0.05$. Le tableau 08 illustre l'analyse de corrélation entre la diminution de la croissance de la souche *S.aureus* en culture mixte et le pH de milieu $p < 0,1$.

Tableau08 : Analyse de corrélation entre la croissance de la *S.aureus* en culture mixte et le pH de milieu.

	<i>S.aureus</i> et <i>Ln.mesenteroides</i>	<i>S.aureus</i> et <i>Lc.lactis</i>	<i>S.aureus</i> et <i>Lc.lactis</i> <i>biorav diacetylactis</i>
Pearson r	0,7078	0,8485	0,7963
Intervalle de confiance à 90 %	-0,2735 à 0,9671	0,08737 à 0,9841	-0,07486 à 0,9781
P value	0,0906	0,0691	0,0535

Benkerroum *et al.*(2000) ont démontré la capacité des bactériocines produites par *Lactococcus lactis* de diminuer le nombre de *Listeria monocytogene* s'ajoutée expérimentalement au Jben Marocain. Après contamination du Jben avec 10^7 et 10^4 UFC.ml⁻¹ il a été constaté que la bactériocine entraîne une réduction du nombre de contaminants de 2,7 log après 30h dans le premier cas et complètement éliminé après 24h dans le deuxième.

Almmor *et al.*,2008 ont montré que quatre souches de *Lc.gariveae*, trois souche de *Lc.lactis* et la souche *En. Faecalis* sont capable d'inhiber la croissance de la souche *S.aureus* SA15 après 6h de culture . *Lc.lactis* et *En. Faecalis* inhiberaient la croissance de *S.aureus* par abaissement du pH. En revanche , le pH ne serait pas responsable de l'inhibition par *Lc.gariveae* car il reste supérieure à 6,2.

Belarbi *et al.*,2011 ont montré que les souche *Ln. mésentroides supb mésentroides* Ln 10 et Ln14 ont été capable d'inhiber la croissance de *S.aureus* ATCC 25923 et la souche *E.coli* a été inhibé par *Ln. mésentroides supb mésentroides* Ln14 après 24h d'incubation en culture mixte. Mami *et al.*,2012 ont montré que *Lb.plantarum* Lb58 a été inhibé la souche *S.aureus* ATCC 25923 après 72h d'incubation en culture mixte.

L'activité antibactérienne des souches lactiques peut être due à la production de plusieurs agents antibactériens. L'acide lactique et l'acidification du milieu inhibent plusieurs types de bactéries. Aussi, ces souches produisent aussi le diacétyl, qui possède aussi un pouvoir d'inhibition. L'H₂O₂, libéré par les souches lactiques inhibent les bactéries qui ne possèdent pas des défenses contre le stress oxydatif (Almmor *et al.*,2008 ; Mami *et al.*,2012).

5-Détermination des profils de sensibilité aux antibiotiques des souches lactiques

Les résultats de ce test sont présentés dans le tableau 09 et la figure 21. Après l'application des recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie(2007), ce dernier donne la signification de chaque résultat, à savoir : R, bactérie résistante, S, bactérie sensible et I, intermédiaire.

Tableau09: Profils antibiorésistance des souches lactiques.

	<i>Ln. mesenteroides</i> <i>Rs6</i>	<i>Lc.lactis</i> <i>Ma1</i>	<i>Lc.lactis</i> <i>Ma2</i>	<i>Lc lactis subsp</i> <i>diacetylactis</i> <i>D17</i>	<i>Ln .mesenteroides</i> <i>subsp dextranicum</i> <i>D19</i>	<i>St. thermophilus</i>
sulphamethoxazole	S	S	S	S	S	S
Cefotaxime	S	S	S	S	R	R
Vancomycine	S	S	S	S	S	S
Bacitracine	S	S	S	S	S	S
Pénicilline	S	S	S	S	S	S
Gentamycine	R	R	R	R	R	R
Am pénicilline	S	S	S	S	S	S
Metronidazole	R	R	R	R	R	R
Amoxiciline	S	S	S	S	S	S
Tetracycline	S	S	S	S	S	S

(S) : Sensible.

(R) : Résistante.

D'après les résultats du test, les souches lactiques ont établi une sensibilité presque à tout les antibiotiques, la résistance est observé à : gentamicyne, Metronidazole et variable à Cefotaxime, les souches résistante de ce dernier sont *Ln.mesenteroides dextranicum* et *streptococcus thermophilus*.

De nombreux chercheurs ont spéculé que la bactérie commensale telle que les bactéries lactiques peuvent servir de réservoir de gènes de résistance aux antibiotiques .La principale menace associée à ces bactéries, c'est qu'ils peuvent transférer des gènes de résistance aux bactéries pathogènes , des gènes conférant la résistance à la tétracycline, l'érythromycine et la vancomycine ont été détectés et caractérisés chez *Lactococcus lactis*, entérocoques et plus récemment dans les espèces *Lactobacillus* isolées de la viande et des produits laitiers fermentés (Mathur et Singh, 2004).

nos résultats sont similaire avec (Hadeif *et al.*,2012) ont montré que les souches *Lc.lactis* ; *Ln menteroides* et *Lc.lacti ssp cremois* sont sensible à la vancomicyne et la souche *Lc. lactis ssp. lactis* C18 sensible à la Ampicilline, de même (Loumani *et al.*,2010) ont montré que les *streptococcus thermophilus* isolé de yaourt sont sensible à la pénicilline et oxacilline .

(Botes *et al.*, 2008) ont démontré que la résistance de souches de *Leuconostoc sp.* à la Vanomycine, Gentamicine et la Chloramphénicol a été bien élucidée (Ogier et al., 2008). De même que pour des espèces de *Lactococcus lactis* qui ont présenté une résistance à l'Ampicilline et la Vanomycine (Donohue, 2004).

Il est nécessaire avant de lancer une culture d'amorçage ou un produit probiotique de vérifier que les souches bactériennes impliquées ne contient pas des gènes de résistance aux antibiotiques (Ammor et Mayo, 2007). Mais, selon Donohue (2004), la résistance des probiotiques aux antibiotiques peut poser un problème si elle peut être transmise à des pathogènes chez lesquels la résistance thérapeutique pourrait avoir des conséquences néfastes.

L'utilisation de différentes souches lactiques en tant que probiotiques doit faire l'objet de travaux extrêmement attentifs (Marteau *et al.*, 2004). De même (Zago *et al.*, 2011) suggère que les probiotiques ne doivent pas avoir une résistance acquise aux antibiotiques .



Figure 21: Profil antibiorésistance de la souche *Streptococcus thermophilus*.

Conclusion

Les bactéries lactiques jouent un rôle important que se soit dans la bio-conservation des aliments ou dans la biothérapie grâce à leur pouvoir d'inhiber les bactéries pathogènes. Six souches lactiques ont été utilisées pour évaluer leur potentiel antimicrobien, le spectre d'activité de ces souches a été utilisé entre eux et sur une gamme de souches de bactéries pathogènes.

Les interactions entre les bactéries lactiques ont relevés un effet d'inhibition entre toutes les souches lactiques, ainsi entre les bactéries lactiques et pathogènes, à pH 6,2 la présence de zones d'inhibitions autour des spots traduit une activité inhibitrice des souches lactiques testées contre la totalité des souches cibles utilisées dans un milieu tamponnée pH 7, les zones d'inhibitions sont petites comparativement aux zones d'inhibition qui ont trouvées précédemment.

Les interactions par la méthode des puits n'ont montré aucune zone d'inhibition autour des puits, et ceci malgré de nombreuses répétitions.

Les souches lactiques, ont présenté une production progressive en acide lactique, cette dernière est accompagnée d'un abaissement du pH du milieu.

L'étude de l'évolution de la croissance en culture mixte a été réalisée dans du lait écrémé; après 48h, le dénombrement de *E.coli* atteint 5,50 ; 4.95 et 0 log ufc/ml avec les souches lactiques *leuconostoc mesenteroides*, *lactococcus lactis*, *lactococcus lactis biovar diacetylactis* respectivement . et après 48h, en culture mixte le dénombrement de *S.aureus* atteint 4.67 ;3.49 et 0 log ufc/ml avec les souches lactiques *leuconostoc mesenteroides*, *lactococcus lactis*, *lactococcus lactis subsp lactis biovar diacetylactis* respectivement.

Ce travail nous a permis de détecter des souches lactiques telles que *leuconostoc mesenteroides*, *lactococcus lactis*, *lactococcus lactis subsp lactis biovar diacetylactis* capable d'inhiber et de limiter la croissance des germes indésirables, par l'exploitation des potentialités antibactériennes qui sont capables d'assurer une qualité hygiénique et bio-préservative désirable inhibant ainsi les germes nuisibles et toxigènes dans les produits alimentaires.

Référence

- Acheson. 1999. Independent inquiry into inequalities in health report. The Stationery Office.London.
- Adams M.R. et Hall C.J. 1988. Growth inhibition of food borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. *Int. J. Food Sci. Technol.* 23: 287-292.
- Ahmed, Z., Wang, Y., Cheng, Q., Imran, M. (2010). Lactobacillus acidophilus bacteriocin, from production to their application: An overview. *Afr. J. Biotechnol.*, 9: 2843-2850.
- Alakomi H.L., Skytta E., Saarela M., Mattila-Sandholm T., Latva-Kala K. et Helander . Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2001–2005
- Albano, H., Pinho, C., Leite, D., Barbosa, J., Silver, J., Carneiro, L., Magalhães, R. (2009). Evaluation of bacteriocin-producing strain of *Pediococcus acidilacticias* a biopresrvative for « Alheira », a fermented meat sausage. *Food Control*, 20: 764-770.
- Albert I., Couvert O., De Buyser M-L., Denis C., Fai l le C., Gohar M., Leguerinel I., Lereclus D., Nguyen-The C., Sorokine A., Torny D. Etude de l'émergence d'une bactérie pathogène dans les filières alimentaires. Le cas de *Bacillus cereus* dans les produits non stériles traités thermiquement. *Bulletin de la Société Francaise de Microbiologie* 24 N°4, 507-514 (2009)
Alomar.J, Loubiere.P, Delbes.C, Nouaille.S, Montel.M.C.,2008. Effect of *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecalis* on the behaviour of *Staphylococcus aureus* in microfiltered milk. *Food Microbiology* 25 : 502–508.
- Ababsa Ahlem.,2012. Recherche de bactériocines produites par les bactéries lactiques du lait. Mémoire de magister Université de setif.
- 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., Dufour, E., Chevallier, I. (2006). Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 1- Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control*, 17: 454-461.
- Atlan D., Béal C., Champonier-Vergès M.C., Chapot-Chartier M.P., Chouayekh H., Coccagn 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.

- Avril D. et Denis M. 1992. Biopréservation by lactic acid bacteria. *Antonie leeuwenhoek. J.* 70:331-345.
- Axelsson Lars, 2004. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology **In** Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects. Salminen S., Wright A.v., Ouwehand A.3^e Ed., Marcel Dekker, pp: 1-66.
- Barefoot S.F., Kleanhammer T.R., 1984. Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin, lactacin b. Antimicrobial. *Agents chemother.*, 26: 328-334.
- Baron, F. et al. Isolation and Characterization of a Psychrotolerant Toxin Producer, *Bacillus weihenstephanensis*, in Liquid Egg Products. *Journal of Food Protection* 70, 2782–2791 (2007).
- Bautista, L, Gaya, P, Medina, M, Nunez, M. (1988). A quantitative study of enterotoxin production by sheep milk staphylococci. *Applied and Environmental Microbiology* **54**, 566-569.
- Bayoub.K ., Elottmani.F ., Assobhei. O., Jaoua. S., Soukri. A (2006). Contribution à l'étude des bactériocines produites par des souches isolées du lait fermenté traditionnel Raib. *Congrès international de Biochimie, Agadir.*
- Belarbi fatima.,2011.Isolement et sélection de bactéries lactiques productrice des métabolites antimicrobienne. Mémoire de magister Université d'Oran Es-Senia.
- Ben Hammou, F., Skali, S. N., Idaomar, M., Abrini, J. (2010). Combination of nisin with salt (NaCl) to control *Listeria monocytogenes* on sheep natural sausage castings at 6°C. *Afr. J. Biotechnol.*, 9: 1190-1195.
- Benito m.J., Serradilla m.J., Ruiz-Moyano S., Martin A., Perez-Nevado F., Cordoba M.G. Rapid differentiation of lactic acid bacteria from autochthonous fermentation of Iberian dry-fermented sausages. *Meat Science*. 2008, In Press, Corrected Proof.
- Budde B.B., Hornbæk T., Jacobsen T.,BarkholT V., Koch A.G. *Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for use as a protective culture for vacuum-packed meats, culture isolation, bacteriocin identification, and meat application experiments. *International Journal of Food Microbiology*. 2003, vol. 83, 171-184.
- Castro, M. P., Palavecino, N. Z., Herman, C., Garro, O. A., Campos, C. A. (2011). Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: Characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. *Meat Science*, 87: 321-329.
- Chamba, J.F. and F. Prost (1989). Mesure de l'activité acidifiante des Bactéries lactiques thermophiles pour la fabrication de fromage à pâte cuite. *Lait*, (69):417-431.
- Chen, L., Coolbear, T. & Daniel, R. . Characteristics of proteinases and lipases produced by seven *Bacillus* sp. isolated from milk powder production lines *International Dairy Journal* 14, 495–504 (2004).
- Chen, L., Daniel, R. M. & Coolbear, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *International Dairy Journal* 13, 255–275 (2003).

- Cheriguene A., Chougrani F. et Bensoltane A., 2006. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from goat's Algerian milk. *Pakistan J. Biol. Sci.* 9(7) : 1242-1249.
- Collinsm D, Samelis J., Metaxopoulos J. AND Wallbanks S. Taxonomic studies of some *Leuconostoc*-like organisms from fermented sausages, description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J. Appl. Bacteriol.* 1993, vol. 75, 595 – 603
- Cosgrove, K., Coutts, G., Jonsson, I.M., Tarkowski, A., Kokai-Kun, J. F., Mond, J. J., Foster, S. J. (2007). Catalase (KatA) and Alkyl Hydroperoxide Reductase (AhpC) Have Compensatory Roles in Peroxide Stress Resistance and Are Required for Survival, Persistence, and Nasal Colonization in *Staphylococcus aureus* *Journal of Bacteriology* **189**: 1025-1035.
- Cotter, P. D., Hill, C., Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Rev. Microbiol.*, 3: 777-788.
- Davidson P.M., Post L.S., Braner A.L. et Mc Curdy A.R. 1983. Naturally occurring and miscellaneous food antimicrobials. In: *Antimicrobials in Foods*. eds. Davidson, P.M. and Branen, A.L. *Marcel Dekker Inc.*, New York. pp. 385-392.
- De Jonghe, V. et al. Toxinogenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk. *International Journal of Food Microbiology* 136, 318–325 (2010).
- 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.
- Dortu, C. et Thonart, P. (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêt pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 13: 143-154.
- Doumandji A., Hellal A., Saidi N., 2010. Purification de la bactériocine a partir de *Lb.acidophilus* 11, *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.*, 4: 25-47.
- Edwards C.G., Collins m.D., Lawson P.A., rodriguez A.V. *Lactobacillus nagelii* ssp. nov., an organism isolated from a partially fermented wine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2000, vol. 50, 699 - 702
Environmental Microbiology 10, 851–865 (2008).
- Eom H.-J., Seo D.M., Han n.S. Selection of psychrotrophic *Leuconostoc* spp. producing highly active dextransucrase from lactate fermented vegetables. *International Journal of Food Microbiology*. 2007, vol. 117, 61-67.
- Fimland G., Axelsson L., Brurberg M.B., Nes I.F., Eijsink V.G., Nissen-Meyer J., 2000. A C-terminal disulfide bridge in pediocin-like bacteriocins renders bacteriocin activity less temperature dependent and is a pajor determinant of the antimicrobial spectrum. *J. bacterial.*, 182: 2643-2648.

- Fleming H.P., Etchells J. L., Costilow R. N., 1975. Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber Brines. *Appl Microbiol.*, 30(6): 1040-1042.
- Fleming H.P., Etchells J. L., Costilow R. N., 1975. Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber Brines. *Appl Microbiol.*, 30(6): 1040-1042. for food. *Nature Rev. Microbiol.*, 3: 777-788.
- Franz C.M.A.P, Stiles m.E., Schleifer K.H., Holzapfel W.H. Enterococci in foods - a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology Enterococci in Foods. Functional and Safety Aspects.* 2003, vol. 88,105-122.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R. L., BenOmar, N. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 120: 51-70.
- Gautam, N. et Sharma, N. (2009). Bacteriocin: safest approach to preserve food products. *Indian J. Microbiol.*, 49: 204-211.
- Ghrairi, T., Frere, J., Berjeaud, J. M., Manai, M. (2008). Purification and characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* from Tunisian rigouta cheese. *Food Cont.*, 19: 162-169.
- Giraffa G., 2011. Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiol.* 28 : 1033-1040.
- Glazer, A. N. et Nikaido, H. (2007). *Microbial biotechnology: fundamentals of applied microbiology.* Cambridge University Press, New York.
- Gong, H. S., Meng, X. C., Wang, H. (2010). Plantaricin MG active against Gram-negative bacterioproducted by *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391 isolated from "Jiaoke", a traditional fermented cream from China. *Food Cont.*, 21: 89-96.
- Goubau P. et Pellegrims E. 2000. Repères en microbiologie, *Édition Garant.* P: 391.
- Granum, P. E. & Lund, T. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Letters* 157, 223–228 (1997).
- Guessas Bettache., 2007. Les potentialités métaboliques des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre dans le biocontrôle de *Staphylococcus aureus*. Thèse de Doctorat en microbiologie appliqué. Université d'Oran Es-Senia
- Guinebretière, M.-H. et al. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group.
- Guiraud, J.P. (1998). *Microbiologie alimentaire,* DUNOD, Paris. P : 80, 84, 116, 282,283, 29.
- Gyu Sung Cho, Hyung Ki Do, 2006. Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from a Traditional Jeotgal Product in Korea. *Ocean Science Journal.*, Vol. 41(2): 113-119
- Haddie J.M. Other streptococci. **In** *Bergey's Manual of systematic Bacteriology.* Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G. Williams and Wilkins, Baltimore.

1986, 1070.

- Hadji-Sfaxi, I., El-Ghaish, S., Ahmadova, A., Batdorj, B., Le Blay- Laliberté, G., Barbier, G., Haertlé, T., Chobert, J. M. (2011). Antimicrobial activity and safety of use of *Enterococcus faecium* PC4.1 isolated from Mongol yogurt. *Food Control.*, 22: 2020-2027.
- Haeghebaert, S., Le Querrec, F., Gallay, A., Bouvet, P., Gomez, M. and Vaillant, V. (2002). Les toxi-infections alimentaires collectives en France, en 1999 et 2000. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* **23**, 105-109.
- Hafed sawsen 2012., Evaluation des aptitudes technologiques et probiotiques des bactéries lactiques locales Mémoire de magister Université d'Ourgla.
- Hagen b.F., Næs H., Holck a.L. Meat starters have individual requirements for Mn²⁺. *Meat Science*. 2000, vol. 55, 161-168.
- Herranz. C et Driessen. A. J. (2005). Sec-mediated secretion of bacteriocin enterocin P by *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. **71**: 1959-1963.
- Holzapfel W.H., Haberer P., Snel J., Schillinger U. et Huis in't Veld J.H. 1998. Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 41: 85-101.
- Hwanhlem N., Buradaleng S., Wattanachant S., Benjakul S., Tani A., Maneerat S., Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented fish (Plasom) and production of Plasom from selected strains. *Food Control.*, 22: 401-407. 2011. I.M. 2000.
- 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. *Gr. Y. Aceites*. 60(2) : 177-183.
- Imlay, J. A. (2003). Pathways of oxidative damage. *Annual Review of Microbiology* **57**, 395-418.
- Isolauri E., Moreau M.C., Roberfroid M. et Rowland I. 1998. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Brit. J. Nutr. Suppl.* 1: 147-171.
- Ito, A., Sato, Y., Kudo, S., Sato, S., Nakajima, H., and Toba, T. (2003). The Screening of Hydrogen Peroxide-Producing Lactic Acid Bacteria and Their Application to Inactivating Psychrotrophic Food-Borne Pathogens. *Current Microbiology* **47** , 231-236.
- Karthikeyan, V. et Santhosh, S. W. (2009). Study of bacteriocin as a food preservative and the *L.acidophilus* strain as probiotic. *Pak. J. Nutr.*, 8: 335-340.
- Kjos m., Nes I. F., Diep D. B. (2011). Resistance mechanisms against bacteriocins targeting the mannose phosphotransferase system. *Applied and Environmental Microbiology*. **77**: 3335- 3342

- Klaenhammer TR. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12:39-85.
- Krieg n.R. The Archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria - Identification of procaryotes. In Bergey's Manual of systematic Bacteriology. Garrity G.M., Boone D. R., Castenholz R. W. Williams and Wilkins, Baltimore. 2001, 721, 33
- Labiuoi, H., Elmoualdi, L., El Yachioui, M., Ouhssine, M. (2005). Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bull. Soc.Pharm. Bordeaux*, 144 : 237-250.
- Larpent J.P. Microbiologie alimentaire. Lavoisier – Tec & Doc. Paris. 1997, 1072.
- Lereclus D., Nguyen-The C., Sorokine A., Tornoy D. Etude de l'émergence d'une bactérie pathogène dans les filières alimentaires. Le cas de *Bacillus cereus* dans les produits non stériles traités thermiquement. *Bulletin de la Société Française de Microbiologie* 24 N°4, 507-514 (2009) .
- Leroy F., De vuyst L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*. 2004, vol. 15, 67-78.
- 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.
- Lindgren S.E. et Dobrogosz W.J. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Rev.* 87: 149-164.
- Loumani Akil.,2010. Evaluation du qualité microbiologique et hygienique de yaourt commercialisé en Algerie. Mémoire de magister Université d'Oran Es-Senia.
- Ludwig W., Schleifer k-H., Whitman w.B. Bergey's taxonomic outlines - Revised Road Map to the Phylum Firmicutes. 2008, vol. 3.
- Luo, F., Feng, S., Sun, Q., Xiang, W., Zhao, J., Zhang, J., Yang, Z. (2011). Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from kurut, a traditional naturally-fermented yak milk from Qinghai-Tibet plateau. *Food Control*, 22: 50-53.
- Makras L., Falony G., Van der Meulen R et De Vuyst L. 2006. Production of organic acids from fermentation of mannitol, fructooligosaccharides and inulin by a cholesterol removing *Lactobacillus acidophilus* strain' by M.T. Liong and N.P. J. *App. Microbiol.* 99: 783–793.
- Mami, A., Henni, J. E., Kihal, M. (2008). Antimicrobial activity of *Lactobacillus* species isolated from Algerian raw goat's milk against *Staphylococcus aureus*. *World J. Dairy & Sci.*, 3: 39-49.
- Mami A, Boumehira A, Hamedi A, Henni J , Kihal M (2012). Screening of autochthonous *Lactobacillus* species from Algerian raw goats' milk for the production of bacteriocin-like compounds against *Staphylococcus aureus*. *African Journal of Biotechnology*.

- Mangia N.P., Murgia M.A., Garau G., Sanna M.G. et Deiana P., 2008. Influence of selected lab cultures on the evolution of free amino acids, free fatty acids and Fiore Sardo cheese microflora during the ripening. *Food Microbiol.* 25 : 366-377.
- Masuda S., Yamaguchi H., Kurokawa T., Shirakami T., Tsuji R.F., Nishimura I. Immunomodulatory effect of halophilic lactic acid bacterium *Tetragenococcus halophilus* Th221 from soy sauce moromi grown in high-salt medium. *International Journal of Food Microbiology.* 2008, vol. 121, 245-252.
- Mkrtchyan, H., Gibbons, S., Heidelberger, S., Zloh, M., Limaki, H.K. (2010). purification, characterization and identification of acidocin LCHV, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus acidophilus* n.v. Er 317/402 strain narine. *Int.J. Antimicrobial Agents.*, 35: 255-260.
- Nauciel C et Vildé J.L. 2005. *Bactériologie médicale: Abrégés Connaissances et pratique. Elsevier Masson.* Paris. pp : 257.
- Nazef, L., Belguesmia, Y., Tani, A., Prévost, H., Drider, D. (2008). Identification of lactic acid bacteria from poultry feces: evidence of anti-Campylobacter and anti-Listeria activities. *Poultry Science*, 87: 1-6.
- Neves A. R., Pool W. A., Kok J., Kuipers O. P., Santos H. (2005). Overview on sugar metabolism and its control in *Lactococcus lactis*—the input from in vivo NMR. *FEMS Microbiology Review.* 29: 531–554.
- Nilsen T., Nes I.F., Holo H., 2003. Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG2333. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(5): 2975-2984.
- Otero, M. and Nader-Macias, M. E. (2006). Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂-producing *Lactobacillus gasseri* isolated from the vaginal tract of cattle. *Animal Reproduction Science* 96, 35-46.
- Ouwehand A.C. et Vesterlund S. 2004. 11 Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: Salminen S., Ouwehand A., Von Wright A. (eds.). *Lactic Acid Bacteria: Microbial and Functional Aspects*, 3rd ed. *Marcel Dekker, New York.* 375–395.
- Peláez S.M. et Martín O. 2009. Bacteriocin production and sensitivity. *Folia Microbiol.* 49: 172–174.
- Pinto, A. L., Fernandes, M., Pinto, C., Albano, H., Castilho, F., Teixeira, P., Gibbs, P. A. (2009). Characterization of anti-Listeria bacteriocins isolated from shellfish: potential antimicrobials to control non-fermented seafood. *Int. J. Food Microbiol.*, 129: 50-58.
- Prescott C.E., Hope G.D. et Blevins L.L. 2003. Identification of newly isolated lactobacilli from stomach mucus of lamb. *Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae.* 55: 64-72.
- Rampal M., Ouwehand A.C. et Vesterlund S. 2000. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 57(1):114-121.

- Richard C., Canon R., Naghmouchi K., Bertrand D., Prévost H., Drider D., 2006. Evidence on correlation between number of disulfide bridge and toxicity of class IIa bacteriocins. *Food Microbiol.*, 23(2): 175-183.
- Riley, M. A. et Chavan, M. A. (2007). *Bacteriocins: Ecology and Evolution*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Ruiz-Barba, J. L., Caballero-Guerrero, B., Maldonado-Barragán, A., Jiménez-Díaz, R. (2010). Coculture with specific bacteria enhances survival of *Lactobacillus plantarum* NC8, an autoinducer-regulated bacteriocin producer, in olive fermentations. *Food Microbiol.*, 27: 413-417.
- Salminen S., Bouley M.C., Boutron-Rualt M.C., Cummings J., Franck A., Gibson G., technologiques des bactéries lactiques thermophiles utilisées dans les fromages à pâte pressée cuite. *Sciences des aliments*, 20: 159-167
- Salminen, S., Wright, A. V., Ouwehand, A. (2004). *Lactic acid bacteria. microbiological and functional aspects*. Marcel Dekker. Inc., U.S.A.
- Samapundo, S., Heyndrickx, M., Xhaferi, R. & Devlieghere, F. Incidence, diversity and toxin gene characteristics of *Bacillus cereus* group strains isolated from food products marketed in Belgium. *International Journal of Food Microbiology* 150, 34–41 (2011).
- Samelis J., Maurogenakis F. et Metaxopoulos J., 1994. Characterization of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami, *Inter. J. Food. Microbiol.*, 23:179-196.
- Sarika, A. R., Lipton, A. P., Aishwarya, M. S. (2010). Bacteriocin production by a new isolate of *Lactobacillus rhamnosus* GP1 under different culture conditions. *Adv. J. Food Sci. Technol.*, 2: 291-297.
- Schleifer K.H. Recent changes in the taxonomy of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 1987, vol. 46, 201-203.
- Smaoui, S. (2010). Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse.
- Tabasco, R., García-Cayuela, T., Peláez, C., Requena, T. (2009). *Lactobacillus acidophilus* La-5 increases lactacin B production when it senses live target bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 132: 109-116.
- Tagg, J. R., Jack. R. W, Heng N. C. et Haie. J. D. (2005). Identification of *ofnlmTE*, the locus encoding the ABC transport System required for export of nonlantibiotic mutacins in *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology*. **187**: 5036-5039.
- Taylor M.J., Bandi C. et Hoerauf A. 2005. Wolbachia bacterial endosymbionts of filarial nematodes. *Adv in Parasitol*. 60: 245-284.

- Teuber M. The genus *Lactococcus*. In The genera of lactic acid bacteria. Wood B.J.B., Holzapel W.H Chapman & Hall. 1995, 420, 173 - 234.
- Thakur, R.L. et Roy, U. (2009). Antibacterial activity of *Leuconostoc lactis* isolated from raw cattle milk and its preliminary optimization for the bacteriocin production. *Res. J. Microbiol.*, 4: 122-131.
- Thomas, A. and J.F. Chamba (2000). Mise en évidence de l'évolution des aptitudes
- Thompson J., Gentry-Weeks C.R., 1994. Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques (De Roissart H. et Luquet F.M.). Loriga, Uriage. 1 : 239-290.
- Todorov, S. D. et Dicks, L. M. T. (2005). Growth parameters influencing the production of *Lactobacillus rhamnosus* bacteriocins ST461BZ and ST462BZ. *Ann. Microbiol.*, 55:283289.
- Twomey D., Ryan M., Meaney B., Hill C., 2002. Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82: 165-185.
- Verluyten, J., Leory, F., De Vuyst, L. (2004). Influence of complex nutrient source on growth of and curvacin A production by sausage isolated *L. curvatus* LTH 1174. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 5081- 5088.
- Widdick. D. A., Dodd. H. M., Barraille. P., White. J., Stein. T. H., Chater. K. F., Gasson. M. J., and bibb. M. J. (2003). Cloning and engineering of the cinnamycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces cinnamoneus* DSM 40005. *Academy of Science. USA*. **100**: 4316-4321.
- Xie, Y., An, H., Hao, Y., Qin, Q., Huang, Y., Luo, Y., Zhang, L. (2011). Characterization of an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LB-B1 isolated from koumiss, a traditionally fermented dairy product from China. *Food Control*, 22: 1027-1031.
- Yateem, A., Balba, M. T., Al-Surrayai, T., Al-Mutairi, B., Al-Daher, R. (2008). Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potential from camel milk. *Int. J. Dairy Sci.*, 3: 194-199.
- Zadoks, R. N., van Leeuwen, W. B., Kreft, D., Fox, L. K., Barkema, H. W., Schukken, Y. H. and van Belkum, A. (2002). Comparison of *Staphylococcus aureus* Isolates from Bovine and Human Skin, Milking Equipment, and Bovine Milk by Phage Typing, Pulsed-Field Gel Electrophoresis, and Binary Typing. *Journal of Clinical Microbiology* **40**, 3894-3902.
- Zago M., Fornasari M.E., Carminati D., Burns P., Suárez V., Vinderola G., Reinheimer J. et Giraffa G., 2011. Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiol.* 28 : 1033-1040.
- Zalan. Z, Hudacek. J, Stetina. J, Chumchalova. J, et Halasz. A. (2010). Production of organic acids by *Lactobacillus* strains in three different media. *Eur Food Res Technol* 230:395-404.