

République Algérienne Démocratique et Populaire Ministère de l'Enseignement
Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Blida 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département : Biotechnologie

Filière : Biotechnologie

Spécialité : Biotechnologie Microbienne



Mémoire de Fin de Cycle

En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Etude de l'activité antimicrobienne des Bactéries lactiques
(*Lactobacillus*) isolées à partir de lait de chèvre utilisées dans
les industries laitières**

Présenté par :

Mlle ALLALI Selma & Mr ABBAS HENNI Imed Younes

Soutenu le : 08/07/2019

Devant le jury composé de :

Mme BENCHABANE D	M.A.A	Présidente	USDB1
Mme BENSAID F	M.A.A	Examinatrice	USDB1
Mme BENOUSSAID N	M.A.A	Promotrice	USDB1
Mme Nakkab S		co-promotrice	Laboratoire d'hygiène de BLIDA

Année universitaire : 2018/2019

Résumé

Au cours de notre travail, les 12 souches de Lactobacilles préalablement isolées du lait de chèvre provenant de deux régions (BLIDA et ALGER) sur milieu MRS (Man–Rogosa–Sharpe), ont fait l'objet d'une étude sur quelques caractéristiques biochimiques, physiologiques et aussi technologiques, avec leur activité antimicrobienne vis-à-vis un groupe de bactéries pathogènes. Les résultats obtenus semblent plus au moins intéressants, la majorité des souches testées sont signalées mésophile et homofermentaires. La moitié des souches sont thermorésistantes, mais aucune souche ne possède une activité protéolytique. Les résultats de l'étude de l'activité antibactérienne montrent que les douze souches de Lactobacillus sont douées d'une activité antibactérienne variable vis-à-vis de l'ensemble des pathogènes (*Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Escherichia coli* ATCC 25912, *Pseudomonas sp* ATCC 27812, *Bacillus cereus*, *Proteus mirabilis*) avec des zones d'inhibitions de 3 à 45 mm, en particulier à l'égard de *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Proteus mirabilis* et *Escherichia coli* ATCC 25912).

Mots clés : *Lactobacilles*, caractérisation, inhibition, activité antimicrobienne, bactéries pathogènes.

Abstract

Abstrat

During our work, the 12 strains of *Lactobacillus* previously isolated from goat milk from two regions (BLIDA and ALGER) on MRS medium were studied in a few biochemical, physiological and also technological characteristics, with their antimicrobial activity screwed a group of pathogenic bacteria. The results obtained seem more or less interesting. The majority of strains tested are reported mesophil and homofermentary. Half of the strains are heat-resistant, but none of the strains have proteolytic activity. The results of the antibacterial activity study show that the twelve strains of *Lactobacillus* are endowed with a variable antibacterial activity with respect to all the pathogens (*Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Escherichia coli* ATCC 25912, *Pseudomonas sp* ATCC 27812, *Bacillus cereus*, *Proteus mirabilis*) with a zones of inhibition varied from 3 to 45 mm, especially with regard to *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli* ATCC 25912).

Keywords : *Lactobacillus*, characterization, inhibition, antimicrobial activity, pathogenic bacteria

ملخص

خلال عملنا، السلالات الملبنة (*Lactobacillus*) الاثنا عشر المعزولة من عينات حليب الماعز من (منطقتي (البلدية و الجزائر) في وسط التكاثر MRS (Man, Rogosa et Sharpe) استخدمت لدراسة بعض خصائصها الكيميائية الحيوية، الفيزيولوجية والتكنولوجية، وأيضا نشاطها المضاد للميكروبات ضد مجموعة من البكتيريا المسببة للأمراض. النتائج التي تم الحصول عليها كانت ذات أهمية متفاوتة، حيث ان غالبية السلالات التي تم اختيارها محبة للحرارة المعتدلة وذاتية التخمر نصف السلالات مقاومة للحرارة لكن أيا من السلالات ليس لها نشاط بروتيني. أظهرت نتائج دراسة النشاط المضاد للبكتيريا أن جميع السلالات الملبنة (*Lactobacillus*) لها نشاط مضاد للبكتيريا (متغير بالنسبة لجميع الميكروبات (العنقوديات الذهبية ATCC25923 الاشريكية القولونية ، ATCC25912 الزائفة س ، ATCC25918 عصية المخيخ، متقلبة رائحة) مع مناطق تثبيط ، تتراوح بين 3 الى 45 ملم ولا سيما فيما يتعلق بالعنقوديات الذهبية ATCC25923 متقلبة ، رائحة و الاشريكية القولونية ATCC25912.

الكلمات المفتاحية: الملبنة (*Lactobacillus*) تثبيط، وصف، النشاط المضاد للجراثيم، حليب ، الماعز ، بكتيريا مسببة للأمراض

Remerciements

Avant tout nous remercions Dieu, le tout puissant, de nous avoir donné, le courage, la force, La santé et la persistance.

On tient à remercier notre promotrice **Madame BENOUSSAID N**, pour avoir assuré l'encadrement de ce mémoire. Depuis les premiers instants, sa pédagogie, ses connaissances, son écoute, et son ouverture d'esprit, ont largement contribué à l'évolution de cette étude.

Nos vifs remerciements s'adressent également à notre Co-promotrice **Mme. NAKKAB Selma**, pour son aide, sa gentillesse, sa patience et sa disponibilité.

Nos sincères remerciements vont aux membres du jury :

Mme BENCHABAN D de nous avoir fait un immense honneur en acceptant de présider le jury.

Mme BENSAID F de nous avoir accordé le temps et la patience pour évaluer notre travail.

Que tous nos professeurs trouvent ici l'expression de notre gratitude.

Nos vifs remerciements vont également à toute l'équipe du laboratoire d'hygiène de Blida :

Mr TAFABI Djamel, Mme NAKKAB Selma, Mme Asma.

Enfin, nous remercions tous les enseignants qui ont contribué à notre formation, et particulièrement ceux du département de biotechnologie.



Dédicaces

Je dédie ce modeste travail tout d'abord aux deux personnes les plus chers à mon cœur :

Ma mère qui a su habilement guider mes premiers pas dans ce parcours d'études.

Chère mère, j'avoue vraiment que tu es la lumière qui éclaire mon chemin et m'emmène vers la réussite, c'est grâce à toi que je dois toute ma réussite; et à mon cher père, dont le courage et l'éducation ont fait de moi ce que je suis.

Que Dieu vous garde, tous les deux.

A mon cher frère : ishak

A toute la famille : ABBAS HENNI

A toute la famille : CHKAIMI

A toute la famille : BENMIMOUNE

A mon cher binôme selma et à toute sa famille.

A mes amis :, Billel , mohamed, fadhél, , Nacer Eddine, islém , mehdi, lotfi , Mouâd, idriss

A tous les étudiants de ma promotion Biotechnologie Microbienne de l'année (2018/2019).

Enfin, je souhaite adresser mes chaleureux remerciements à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin pour la réalisation de ce travail.

Younes



Dédicace

Louange à Dieu, le tout puissant qui m'a donné la force et le courage d'avoir accomplir Ce travail, Je dédie ce modeste travail à :

La plus chère à mon cœur sur cette terre, **Ma mère**, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

A mon **cher frère** : Abd El Rahmen, ADJIMI Hichem. **Ma tante**, mes cousins (Mahrez et Abd El Rahmen)

A **mes sœurs** : Amel, Youssra, Lylia, Oumaima

A Mr et Mme **Benabdesselam** et Mr Mme **Attia**, vous m'avais comblé avec vos tendresses et affection, vous n'avais cessé de me soutenir et de m'encourager. Merci d'être toujours là pour moi.

A Mon binôme **ABBAS HENNI Imed Younes** avec qui j'ai partagé des moments difficiles et des moments agréables le long de ce travail.

A toute ma promotion Biotechnologie Microbienne (2018-2019).

Enfin à toutes les personnes qui comptent pour moi, intervenues dans ma vie à un moment ou à un autre et qui m'ont accompagné et soutenu. Et Tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer

Selma



Liste des abréviations

- **FAO** : Food and Agricultural Organization
- **OMS** : Organisation Mondiale de la Santé.
- **UFC** : Unité Formant Colonie.
- **pH** : Potentiel Hydrogène
- **MRS** : Man–Rogosa–Sharpe
- **ATCC** : American Type Culture Collection
- **ADN** : acide désoxyribonucléique
- **NaCl** : chlorure de sodium
- **ARN** : acide ribonucléique
- **G+C** : le ratio guanine+ cytosine
- **H₂O₂** : eau oxygénée
- **WGO**: World Gastroenterology Organisation
- **A.P.H.A** : American public Health Association
- **sp** : espèce
- **Mg** : magnésium
- **Fe** : fer
- **Zn** : zinc
- **EPEC** : *Escherichia coli* entéropathogènes
- **ETEC** : *Escherichia coli* entérotoxinogènes
- **EIEC** : *Escherichia coli* entéroinvasifs
- **EHEC** : *Escherichia coli* entérohémorragiques
- **Lb** : *lactobacilles*
- **MEB** : micrographie électronique à balayage
- **IVU** : infections des voies urinaires
- **Kj/kcal** : kilojoule/kilocalorie

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
1	Composition nutritionnelle moyenne de 3 laits (pour 100g)	4
2	Flore indigène de lait cru	6
3	Les différents genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques	13
4	Habitat des <i>Lactobacillus</i>	20
5	Effet bénéfique des lactobacilles probiotiques sur la santé humaine	26
6	Classification des bactériocines de bactéries lactiques	30
7	Exemples de bactériocines décrites chez des lactobacilles	31
8	L'origine des bactéries pathogènes	33
9	Résultats de l'étude microscopique des souches retenues	47
10	Profile fermentaire des isolats	48
11	Résultats du test de croissance à différentes températures	49
12	Résultats du test de croissance à différentes concentration de NaCl	50
13	Résultats du test de croissance à différentes pH	51
14	Résultats des diamètres des zones d'inhibitions des lactobacilles en (mm)	53

Liste des figures

N°	Titre	page
1	Colonies de <i>S.aureus</i> après coloration de Gram sous microscope électronique	8
2	Image générée par ordinateur en trois dimensions (3D) d'un certain nombre de bactéries <i>Salmonella sérotype Typhi</i>	8
3	Micrographie en microscopie électronique à balayage (MEB) de <i>Listeria monocytogenes</i> , grossissement: x 3 710	9
4	Micrographie électronique à balayage colorisée numériquement (MEB) de bactéries <i>Escherichia coli</i>	10
5	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906 au microscope électronique à balayage sous un grossissement 3296 X.	11
6	Observation au microscope électronique de (a) <i>Lactobacillus casei</i> , (b) <i>Streptococcus thermophilus</i> , (c) <i>Lactococcus lactis</i> , (d) <i>Enterococcus faecalis</i> , (e) <i>Pediococcus sp</i> , (f) <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	13
7	Arbre phylogénique des bactéries lactiques et comparaison avec les genres <i>Aerococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Listeria</i> et <i>Staphylococcus</i>	14
8	Micrographes montre les différent morphologies cellulaire de <i>lactobacillus</i> (A, <i>Lactobacillus gasseri</i> ; B, <i>Lactobacillus agilis</i> ; C, <i>Lactobacillus curvartus</i> ; D, <i>Lactobacillus minor</i> ; E, <i>Lactobacillus fermentum</i> ; et F, involution de <i>lactobacillus</i> dans une section mince de grain du kéfir)	16
9	Schéma succinct des principales voies métaboliques des lactobacilles	19
10	Identification des genres des bactéries lactiques	21
11	(A) Observation microscopique de bactéries, à l'état frais, contenues dans le yaourt : <i>Streptococcus thermophilus</i> (flèche en pointillés) et <i>Lactobacillus bulgaricus</i> (flèche pleine). (B) <i>Streptococcus thermophilus</i> et <i>Lactobacillus bulgaricus</i> colorés au bleu de méthylène et observés au microscope	22
12	Effet des probiotiques sur la muqueuse intestinale - Cas d'infection à <i>Clostridium difficile</i> . (Photos observées par microscopie électronique) - A) Muqueuse intestinale + Probiotique B) Muqueuse intestinale + <i>Clostridium difficile</i> . C) Muqueuse intestinale + <i>Clostridium difficile</i> + Probiotique	24

13	Mécanismes d'action des probiotiques contre les microorganismes pathogènes	25
14	Quelque exemple de probiotiques et compléments alimentaires à base des lactobacillus, A : <i>Lb rhamnosus</i> , B : <i>Lb plantarum</i> , C : <i>Lb rhamnosus</i> .	27
15	Activité antibactérienne d'une souche de <i>L. fermentum</i> contre <i>Staphylococcus aureus</i> Et <i>Listeria monocytogenes</i> . Les images (B) et (E) montrent des cellules détériorées de <i>S. aureus</i> et <i>L. monocytogenes</i> respectivement. Les images A et D correspondent à leurs cultures sans <i>Lactobacillus</i> (Microscopie électronique à balayage)	28
16	Les trois parties de prélèvement à partir de seau à lait	32
17	Pots stériles et glacière utilisés dans l'échantillonnage	33
18	Isolement des <i>Lactobacillus</i>	34
19	Schéma illustratif des étapes de l'isolement	35
20	Présentation d'une Série de tubes contenant la cloche de Durham	37
21	Test de fermentation des sucres	38
22	Test de thermorésistance	40
23	Schéma de l'étude du pouvoir protéolytique	41
24	Schéma de la réalisation du test d'Effet antibactérien	43
25	Aspect macroscopique des isolats sur gélose MRS à l'œil nu	45
26	Aspect de culture pure sur bouillon MRS (T : témoin ; E : ensemencé)	45
27	Aspect microscopique de deux souches lactobacilles S8 et S10 (grossissement ×100)	46
28	Exemple d'un résultat négatif du test de catalase	46
29	Résultat du Test de production de gaz	47
30	Exemple de résultat positif du test de fermentation des sucres	48
31	Exemple de résultat positif du test de croissance à différentes températures	49
32	Exemple de résultat positif du test de Croissance à différentes concentration de NaCl	50
33	Résultat du test de croissance à pH 4 et pH 9.6	51

34	Résultat de la thermorésistance	52
35	Résultat de l'effet antimicrobien de <i>Lb</i> sur <i>Escherichia coli</i> ATCC 25912	53
36	Observation de la zone d'inhibition de l'activité antibactérienne de <i>Lactobacillus sp</i> vis- à - vis <i>Escherichia coli</i> ATCC 25912	54
37	Résultat de l'effet antimicrobien de <i>Lb</i> sur <i>Pseudomonas sp</i>	54
38	Résultat de l'activité antibactérienne de <i>Lactobacillus sp</i> vis- à – vis <i>Proteus mirabilis</i>	55
39	Observation de la zone d'inhibition de l'activité antibactérienne de <i>Lactobacillus sp</i> vis- à – vis <i>Proteus mirabilis</i>	55
40	Résultat de l'activité antibactérienne de <i>Lactobacillus sp</i> vis- à – vis <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	56
41	Observation de la zone d'inhibition de l'activité antibactérienne de <i>Lactobacillus sp</i> vis- à – vis <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	56
42	Résultat de l'activité antibactérienne de <i>Lactobacillus sp</i> vis- à – vis <i>Bacillus cereus</i>	57
43	Observation de la zone d'inhibition de l'activité antibactérienne de <i>Lactobacillus sp</i> vis- à – vis <i>Bacillus cereus</i>	57

Sommaire

Résumé

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction.....1

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1. lait de chèvre	3
I.1.1 Composition du lait de chèvre	4
I.1.2. Les critères organoleptiques	5
I.1.3 La microflore du lait	5
I.2. Les contaminants du lait et leurs risques	7
I.3. Description générale des bactéries lactiques	11
I.3.1. Classification des bactéries lactiques	12
I.3.2. Identification des bactéries lactiques	20
I.4. Intérêt technologiques des bactéries lactiques	21
I.4.1. Fabrication du yaourt	22
I.4.2. Conservation des aliments	23
I.4.3. production d'enzymes protéolytiques	23
I.5. les <i>Lactobacilles</i> et les probiotiques.....	24
I.6. Effet inhibiteur des bactéries lactiques	27

Chapitre II : Matériel et Méthode

1. Matériel.....	32
1.1. Matériel biologique.....	32
1.2. Matériel non biologique.....	33
2. Méthode	34
2.1. Isolement et purification des isolats.....	34
2.2. Identification	36
2.2.1. Caractères morphologiques et culturaux.....	36
2.2.2. Caractères biochimiques.....	36
2.2.3. Teste physiologique.....	38
2.2.4. Teste technologique.....	39

Chapitre III : Résultats et Discussion

I. Résultats et Interprétation	
1. Résultats d'Isolement et purification.....	44
2. Résultats d'Identification.....	44
2.1. Résultats de l'Etude des caractères morphologique.....	44
2.1.1. L'aspect macro et microscopique.....	44
3. Résultats des tests des caractères biochimiques.....	46
3.1. Résultat de test de catalase.....	46
3.2. Résultat de test de Production du gaz	47
3.3. Résultat de test de Fermentation des sucres.....	48
4. Résultats de l'Etude des caractères physiologiques.....	49
4.1. Résultats de Croissance à différentes température.....	49
4.2. Résultats de croissance à différentes concentration de NaCl.....	50
4.3. Résultats de croissance à différents pH.....	51
5. Résultats de l'étude des caractères technologiques	52
5.1. Résultats de test de thermorésistance.....	52
5.2. Résultats de l'activité protéolytique.....	52

Sommaire

5.3.	Résultats de l'activité antibactérienne.....	52
II.	Discussion.....	58

Conclusion

Annexe

Introduction

Depuis l'antiquité, les bactéries lactiques ont été utilisées pour la fabrication et la conservation des aliments (**Chammas et al., 2006 ; Zamfir et al., 2006**). Elles sont généralement reconnues comme étant saines et de statut "GRAS"(Generally Recognized As Safe) (**O'Sullivan et al., 2002**). Les bactéries lactiques appartiennent à un groupe de bactéries bénéfiques, sont largement impliquées dans la fabrication des produits laitiers fermentés du fait de leurs activités métaboliques particulières. La production d'acide lactique est essentielle à la production des produits laitiers fermentés et leur confère une saveur typique (**Laboui et al., 2005**).

Dans l'industrie laitière, les souches lactiques sont sélectionnées sur la base de leur propriétés technologiques (production d'acide lactique, production d'arômes, activité protéolytique et cinétique de croissance), et leur caractéristiques fonctionnelles (activité antibactérienne) (**Tamime, 2002 ; Molin, 2008**). Étant des probiotiques, elles 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**).

Malgré la disponibilité de plusieurs techniques de conservation fiables et adéquates (réfrigération, congélation, stérilisation, séchage, préservation, etc.), la contamination et la détérioration des produits alimentaires par les micro-organismes n'est pas encore sous contrôle. Par ailleurs, les consommateurs refusent de plus en plus les aliments préparés avec des agents conservateurs d'origine chimique. Ainsi, les industries agroalimentaires se tournent de plus en plus vers des techniques de préservation plus douces qui peuvent conduire à l'obtention d'aliments sécurisés mais présentant un aspect plus naturel et une qualité nutritive affectée au minimum. Ces techniques sont notamment basées sur l'activité antimicrobienne naturelle associée à des souches bactériennes agissant comme des cultures protectrices.

Ces dernières années les bactériocines produites par les bactéries lactiques ont attiré une grande attention due à leur application dans les aliments comme conservateur contre certains micro-organismes indésirables. Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques fonctionnelles permettent de réduire le nombre d'autres micro-organismes indésirables dans les produits laitiers (**Abee et al., 1995**).

L'origine de l'effet inhibiteur des bactéries lactiques peut être à l'origine de la production d'acides organiques. En effet, les lactobacilles sont connus pour une grande résistance aux pH acides (jusqu'à un pH voisin de 3,5) contrairement aux autres genres de bactéries lactiques qui sont plus sensibles (**Martínez-Cuesta et al., 2000**).

Actuellement, les scientifiques exploitent les interactions microbiennes des bactéries lactiques pour réduire d'une façon considérable la présence des microorganismes indésirables et nuisibles. En plus de l'effet protecteur de l'acide lactique, l'acide acétique, le diacétyle et le peroxyde d'oxygène, la découverte des bactériocines a donné un plan pour le développement des aliments de qualité sanitaire meilleure.

Notre travail s'inscrit dans ce contexte qui consiste à isoler des souches de lactobacilles à partir de lait de chèvre et d'étudier quelques caractéristiques morphologiques, biochimiques physiologiques, et leurs croissances à différents pH et à différentes concentration de NaCl, leurs propriétés protéolytiques et antibactériennes.

Chapitre 1

Synthèse Bibliographique

I.1. lait de chèvre

D'après la FAO/OMS, le concept lait est exclusivement réservé au produit de la sécrétion mammaire normale obtenue par une ou plusieurs traites sans aucune addition ou soustraction (**Boudier et Luquet, 1981**).

Le lait est le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière, vache, jument, chèvre, brebis, etc. Bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne doit pas contenir de colostrum (**Bourgeois et Larpent, 1996 ; Mahaut et al., 2000**).

Le lait constitue l'un des produits de base de l'alimentation. Il apparaît comme un produit indispensable à la santé et fait partie des produits de première nécessité. En effet c'est un produit nécessaire à la croissance, compte tenu de ses vertus nutritionnelles spécifiques (**FAO, 1995**). Il est un liquide blanc opaque, plus ou moins jaunâtre (selon la teneur en matière grasse et en β -carotènes), de saveur légèrement sucrée et d'odeur peu marquée, mais caractéristique (**Louaileche, 1998**).

Une connaissance approfondie de sa composition, de sa structure et de ses propriétés physiques et chimiques est indispensable à la compréhension des transformations du lait et des produits obtenus lors des différents traitements industriels (**Vignola, 2002**).

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

Franworth et Mainville (2010), évoquent que, le lait est reconnu comme étant un aliment complet et bon pour la santé. Etant source de calcium et de protéines, il peut être ajouté à notre régime sous plusieurs formes. Cependant, Les laits restent les seuls aliments naturels complets qui existent, chacun d'eux étant adapté à la race qui permet de le développer. Le lait est une source importante de protéines de très bonne qualité, riches en acides aminés essentiels, tout particulièrement en lysine qui est par excellence l'acide aminé de la croissance. Ses lipides, caractérisés par rapport aux autres corps gras alimentaires par une forte proportion d'acides gras à chaîne courte, sont beaucoup plus riches en acides gras

saturés qu'en acides gras insaturés. Ils véhiculent par ailleurs des quantités appréciables de cholestérol et de vitamine A ainsi que de faibles quantités de vitamine D et E.

Le lait de chèvre est un aliment de grande importance à l'échelle mondiale. Il contribue grandement à l'alimentation humaine dans les pays en voie de développement (**Wehrmüller et Ryffel, 2007**).

I.1.1 Composition du lait de chèvre

Le lait de chèvre se rapproche plus du lait de vache que de celui de femme (**Coveney et Darnton-Hill, 1985 ; Grandpierre *et al.*, 1988**) (Tableau 1). Il a des qualités nutritionnelles bien plus importantes que le lait de vache. Le lait de chèvre est une source de bienfaits pour la santé de l'homme. Il mériterait d'être plus consommé. Il faut cependant noter que le lait de chèvre produit un caillé qui est plus friable que celui du lait de vache (**Jaubert, 1980**).

Tableau 1 : Composition nutritionnelle moyenne de 3 laits (pour 100g) (Coveney et Darnton-Hill, 1985 et Grandpierre *et al.*, 1988).

Nutriments	Unité	Chèvre	Vache	Humain
Eau	G	87.5	87.7	87.1
Energie	KJ/kcal	296/71	272/65	289/69
Protéines	G	3.3	3.3	1.3
Caséines/lactalbumine	-	83/17	82/18	40/60
Lipides	G	4.5	3.8	4.1
Glucides	G	4.6	4.7	7.2
Na	mg	40	50	14
K	mg	180	150	58
Ca	mg	130	120	34
Mg	mg	20	12	3
P	mg	110	95	12
Fe	mg	0.04	0.05	0.07
Cu	mg	0.05	0.02	0.04
Zn	mg	0.30	0.35	0.28

I.1.2. Les critères organoleptiques

La qualité organoleptique d'un produit se dégrade au fil du temps, la durée de stockage, la température et leur action combinée affectent considérablement les attributs sensoriels totaux. Les critères organoleptiques du lait (Coveney et Darnton-Hill, 1985 ; Grandpierre et al., 1988) sont :

- **Couleur** : blanc mat, contrairement au lait de vache, le lait de chèvre ne contient pas de β -Carotène, aussi le beurre de chèvre va-t-il une couleur blanche.

- **Odeur** : fraîchement traité, le lait de chèvre a une odeur assez neutre parfois en fin de lactation, il a une odeur dite Caprique.

- **Saveur** : douceâtre agréable particulièrement au lait. Le lait de chèvre fraîchement traité possède une saveur plutôt neutre ; par contre, après stockage au froid il acquiert une saveur caractéristique.

Dans certains pays anglo-saxons, la saveur du lait de chèvre est un critère de sélection car sa commercialisation en l'état est très répandue.

- **Aspect** : propre, sans grumeaux.

I.1.3 La microflore du lait

Le lait est un milieu de culture et de protection de plusieurs microorganismes, y compris les microorganismes pathogènes pour l'humain. La microflore du lait est très hétérogène qui peut comprendre des bactéries, des virus et des mycètes, on peut diviser cette microflore en deux grands groupes (Lamontagne et al., 2002) :

- ✓ microflore non pathogène responsable de l'altération des caractéristiques organoleptiques et sensorielles du lait ;
- ✓ la microflore pathogène dont l'ingestion peut causer différentes pathologies chez l'humain.

Les microorganismes de lait se répartissent, selon leurs importances, en deux grandes classes : la flore indigène ou originelle et la flore contaminant.

La flore contaminant est subdivisée en deux sous classes : la flore d'altération et la flore pathogène (Lamontagne et *al.*, 2002).

I.1.3.1 Flore indigène ou originelle

C'est l'ensemble des microorganismes dans le lait à la sortie du pis. Le lait devrait contenir moins de 5.10^3 UFC/ml. Les germes dominants sont principalement des microorganismes mésophiles (Tableau 2) (Michel et *al.*, 2002).

Tableau 2 : Flore indigène de lait cru (Michel et *al.*, 2002)

Microorganismes	Pourcentage (%)
<i>Micrococcus</i> sp.	30 -90
<i>Lactobacillus</i>	10-30
<i>Streptococcus</i> ou <i>lactococcus</i>	< 10
Gram négatif	< 10

I.1.3.2 Flore Contaminant

C'est l'ensemble des microorganismes qui contaminent le lait de façon accidentel et semble indésirable de la récolte à la consommation. Elle peut se composer de :

a. La flore d'altération

Elle cause des défauts sensoriels ou réduire la durée de conservation du produit. Les principaux genres identifiés sont *Pseudomonas* sp, *Proteus* sp, les coliformes (*Escherichia* et *Enterobacter*) et les sporulées tel que *Bacillus* sp et *Clostridium* sp, et certaine levure et moisissure (Michel et *al.*, 2002).

- **Les coliformes** : sont des bacilles, Gram négatif, non sporulés, oxydase négatif, aérobies ou anaérobies facultatifs, capables de se multiplier en présence des sels biliaires , capables de fermenter le lactose avec production d'acide lactique et de gaz(CO₂) en 48heures, à température 35 à 37°C. Leur présence indique une faute hygiénique, relevant

soit d'une mauvaise qualité du produit soit de la mauvaise pureté du matériel de fabrication ou de conditionnement (**Bourgeois et al., 1996**).

- **Les moisissures** : Sans importance dans le lait liquide, elles intéressent un grand nombre d'autres produits laitiers. Elles se développent en surface ou dans les parties internes aérées. Elles sont productrices de lipases et de protéases (**FAO, 2007**).

- **Les levures** : Les levures sont immobiles, leur cellule est limitée par une paroi riche en polysaccharides antigéniques. La taille des cellules est grande environ 5-20µm, sa production de type végétatif. La multiplication s'effectue par bourgeonnement et par scissiparité chez quelques espèces (**Guiraud, 1998**).

b. La flore pathogène

Elle peut avoir trois sources : l'animal, l'environnement et l'homme. Les principaux germes sont : *Salmonella sp*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella sonnei* et certaines moisissures (**Lamontagne et al., 2002**).

I.2. Les contaminants du lait et leurs risques

Le lait et les produits laitiers renferment une flore microbienne naturelle et/ou additionnelle à l'origine de la diversité des produits, l'origine des contaminants par les bactéries pathogènes varie en fonction de la nature du produit et de son mode de production et de transformation.

La contamination du lait et des produits laitiers par les germes pathogènes peut être d'origine endogène, et elle fait alors suite à une excrétion mammaire de l'animal malade, elle peut aussi être d'origine exogène, il s'agit alors d'un contact direct avec des troupeaux infectés ou d'un apport de l'environnement (eaux, personnel).

Les germes les plus souvent évoqués sont les *Mycobactéries*, *Brucella*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, les *Entérobactéries*, parmi lesquelles les *Escherichia coli* producteurs de toxines et les *Salmonella*.

- **Les Staphylocoques** : Sont des cocci Gram positif, non sporulés, regroupés en amas, immobilisés. Ils sont classés dans une famille des *Staphylococcaceae*, anaérobies facultatifs (**Figure 1**). Ils produisent une catalase et résistants au lysozyme (**Bourgeois et al., 1996**). La présence des staphylocoques dans les aliments représente un risque pour la

santé humaine, parce que certaines souches appartenant principalement à l'espèce *S. aureus* produisent des entérotoxines dont l'ingestion provoque une toxiinfection alimentaire à staphylocoques (De-Buyser, 1996).

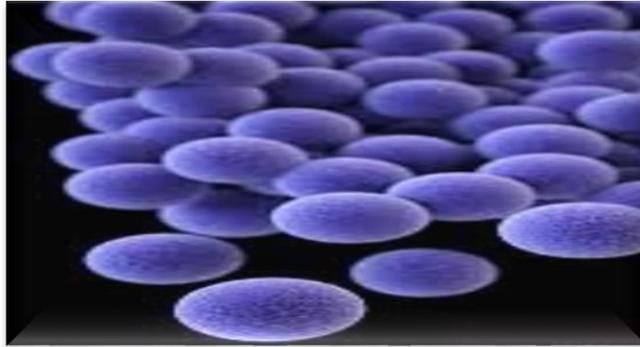


Figure 1 : Cellules de *S.aureus* après coloration de Gram sous microscope électronique (Yves et Michel, 2009).

➤ ***Salmonella*** : Sont des bactéries à Gram négatif de type aérobie-anaérobie facultatif appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* et possédant toutes leurs caractéristiques biochimiques. Les *Salmonella* peuvent se multiplier à des températures comprises entre 5 °C et 45 °C avec un optimum à 35 °C-37 °C et à des pH de 4,5 à 9 avec un optimum compris entre 6,4 et 7,5 (Figure 2).



Figure 2 : Image générée par ordinateur en trois dimensions (3D) d'un certain nombre de bactéries *Salmonella sérotype Typhi* (Archer, 2013).

Le pouvoir pathogène est différent pour les salmonelles typhiques, paratyphiques et pour les salmonelles non typhiques. Les *Salmonella* responsables des fièvres typhoïdes ayant l'homme pour seul réservoir, la contamination se fait par ingestion d'eau ou d'aliments ayant

subi une contamination fécale d'origine humaine. Les fièvres typhoïdes et paratyphoïdes sont causées par des *Salmonella* strictement adaptées à l'homme, *Salmonella Typhi*, *Salmonella Paratyphi A*. Aussi, La salmonellose est une maladie grave qui peut même parfois être mortelle.

➤ ***Listeria monocytogenes*** : Le genre *Listeria* appartient à la branche phylogénétique des *Clostridium* tout comme *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Bacillus*. *Listeria monocytogenes* peut être considérée comme un agent pathogène alimentaire « parfait » car elle est ubiquiste, très résistante aux conditions difficiles (température, Aw, pH...) et surtout elle est capable de se développer aux températures de réfrigération des aliments. La virulence des souches pourrait d'ailleurs être exaltée par leur développement à basse température (**Figure 3**) (**Larpent, 1995**).

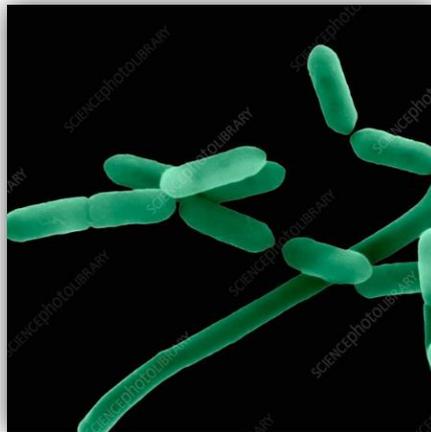


Figure 3 : Micrographie en microscopie électronique à balayage (MEB) de *Listeria monocytogenes*, grossissement: x 3 710 (Dennis, 2004).

➤ ***Escherichia coli*** : Forment un groupe de bacilles mobiles ou immobiles, à Gram négatif, de la famille des *Enterobacteriaceae* (**Figure 4**). Ils peuvent se multiplier à des températures comprises entre 4 °C et 46 °C, avec un optimum de croissance à 37 °C et à un pH compris entre 4,6 et 9,5. Des critères de différenciation basés sur leur sérotype, leur virulence et leurs conséquences cliniques ont permis de classer ces souches pathogènes en quatre groupes. On distingue les *E. coli* entérotoxigènes (EPEC), les *E. coli* entérotoxinoigènes (ETEC), les *E. coli* entéroinvasifs (EIEC) et les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC).

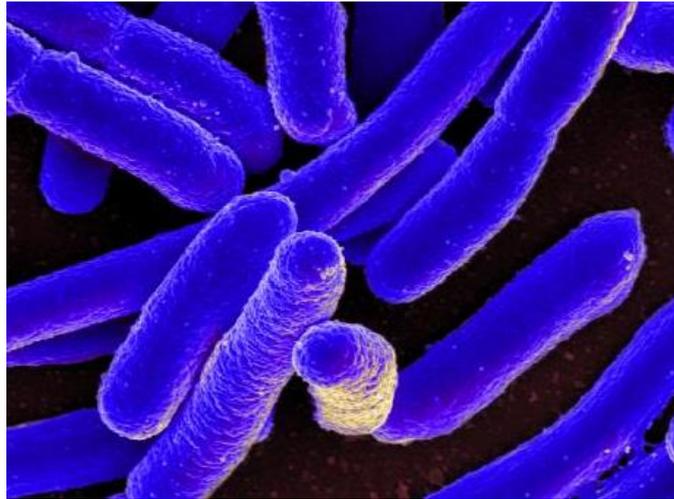


Figure 4 : Micrographie électronique à balayage colorisée numériquement (MEB) de bactéries *Escherichia coli* (Niaid, 2002).

➤ ***Clostridium* sulfito-réducteurs** : Leur recherche et dénombrement sont réalisés car les *Clostridium* sulfito-réducteurs (ou leurs spores), sont des bactéries commensales de l'intestin ou saprophytes du sol (Joffin et Joffin, 1999). Leur résistance est beaucoup plus importante que celle des autres germes car sont sporulées. Lorsque des bactéries anaérobies sulfito-réductrices sont présentes dans les aliments, il y a présomption de la présence de *Clostridium perfringens* qui est l'un des plus fréquemment impliqués dans les intoxications alimentaires (Guiraud, 2003).

➤ ***Proteus sp*** : Les bactéries du genre *Proteus* sont des bacilles (en forme de bâtonnets) Gram négatif aérobies mobiles qui fait partie de la famille des entérobactéries (Figure 5) (Abbott, 2007). Les espèces pathogènes pour l'humain comprennent *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. penneri* et *P. hauseri*). Les bactéries du genre *Proteus* sont parfois qualifiées de membres de la tribu des *Proteeae* (Kim et al., 2003).

Les espèces du genre *Proteus* sont fréquemment en cause dans les infections des voies urinaires (IVU) (Kim et al., 2003., Abbott, 2007 et Ronald, 2003). Il sont habituellement considérées comme pathogènes chez les jeunes patients et opportunistes chez les patients âgés (Coker et al., 2000).

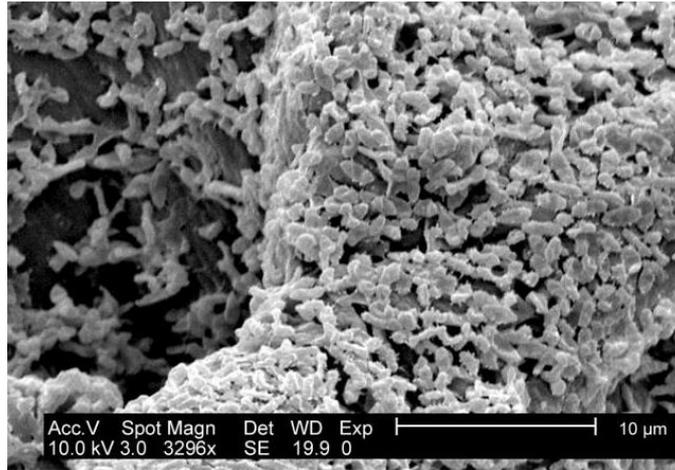


Figure 5: *Proteus mirabilis* ATCC 29906 au microscope électronique à balayage sous un grossissement 3296 X (Janice, 2003).

➤ **Autres germes pathogènes**

D'autres micro-organismes pathogènes peuvent être rencontrés dans le lait et les produits laitiers, parmi lesquels *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Coxiella burnetii*, *Streptococcus agalactiae*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus*, les moisissures productrices de toxines et les virus. La présence et la persistance de ces germes dans les laits et les produits laitiers dépendent de leur résistance aux traitements que peut subir le lait cru (pasteurisation, acidification, chauffage du caillé, conditions d'affinage) et du niveau initial de contamination dans le lait cru.

En ce qui concerne les risques liés aux moisissures productrices de toxines, les quantités de toxines produites (*Penicillium camemberti*, *P. roqueforti*, *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*) sont trop faibles pour provoquer des intoxications.

I.3. Description générale des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques ou "bactéries de l'acide lactique", désignent les bactéries produisant de l'acide lactique par fermentation des hydrates de carbonés (**Djide, 2007**). Elles sont de très anciens micro-organismes, dont les ancêtres auraient pu voir le jour il y a trois milliards d'années. Elles seraient donc apparues avant les cyanobactéries photosynthétiques qui ont transformé l'atmosphère terrestre ancienne sans oxygène en atmosphère aérobie (**Dridier et Prévost, 2009**).

Elles sont principalement utilisées en tant que starter dans les produits alimentaires fermentés où elles permettent de développer certaines caractéristiques organoleptiques et d'augmenter la durée de conservation (**Abee et al., 1995**). Leur utilisation est apparue, depuis des millénaires, dans la fabrication des aliments comme les fromages, les charcuteries, les boissons fermentées, le pain au levain, les sauces, les saumures, les légumes fermentés, les ensilages etc... (**Badis ,2005**). Aussi, elles jouent un rôle déterminant dans l'élaboration de nombreux produits fermentés, tels que les produits laitiers, les salaisons et la choucroute. Elles participent également à la production du pain, du café, du cacao, du vin, de l'ensilage (**Dridier et Prévost, 2009**).

Les bactéries lactiques forment un groupe hétérogène composé de coques et de bacilles, dont la principale caractéristique est la production d'acide lactique à partir de la fermentation des sucres. Non pathogènes, ces bactéries à coloration de gram positive (Gram+) ont un métabolisme anaérobie facultatif et ne produisent pas de catalase (**Badis, 2005**). Elles colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, la viande, les végétaux et les céréales et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale. Elles sont impliquées dans un grand nombre de fermentations spontanées de produits alimentaires (**Stiles et al ; 1997**).

I.3.1. Classification des bactéries lactiques

Leur classification est réalisée en fonction de leur morphologie, de leur type de fermentation et de leur température optimale de croissance. Elles forment un groupe hétérogène composé de coques et de bacilles, dont la principale caractéristique est la production d'acide lactique à partir de la fermentation des sucres, ou se distinguent deux groupes homofermentaires et hétérofermentaires (**Badis et al., 2005**).

Selon la dernière édition de **Bergey's manual of systematic bacteriology (2009)**, les bactéries lactiques sont classées dans le phylum des *Firmicutes*, la Classe des *Bacilli* et l'ordre des *Lactobacillales* renfermant trente-cinq genres répartis sur six familles. Parmi ces genres, seulement douze sont utilisés dans la biotechnologie alimentaire, à savoir *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus*, *Weissella* (**Figure 6 ,Tableau 3**) (**Dridier et Privost, 2009**).

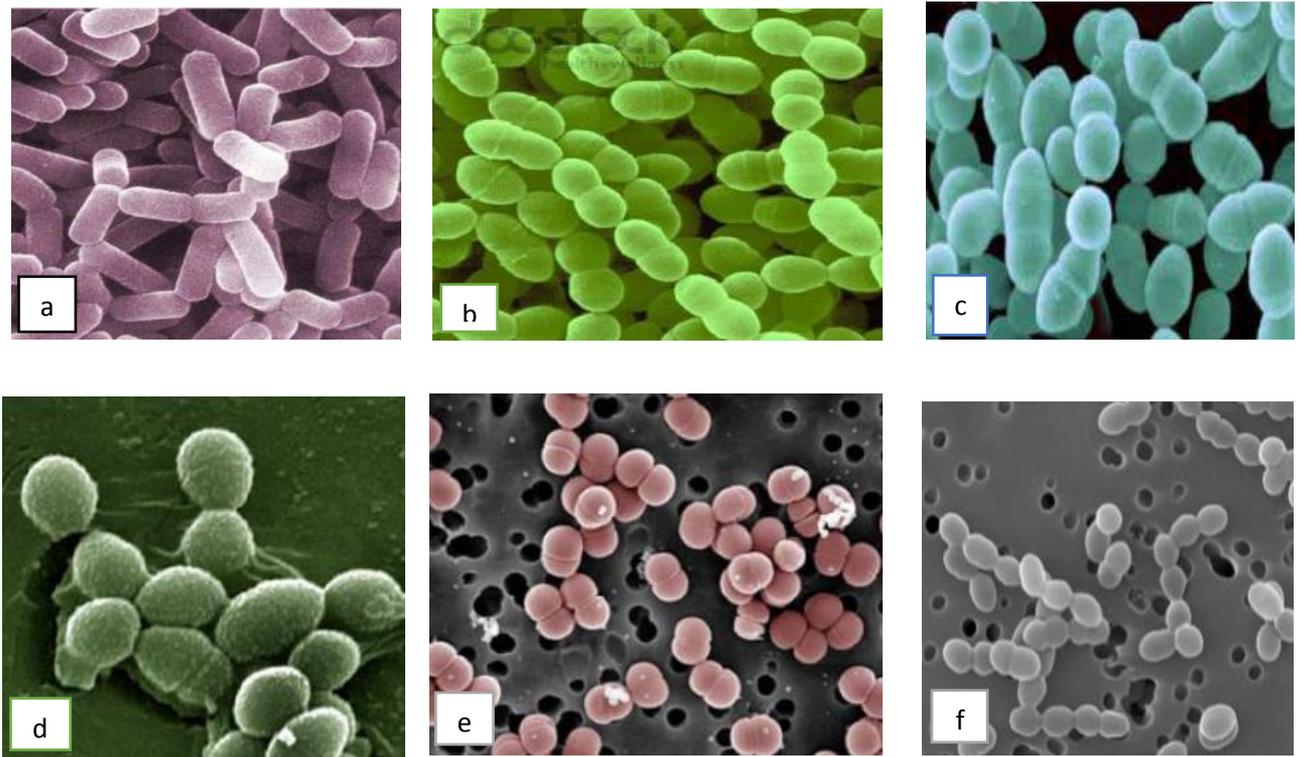


Figure 6 : Observation au microscope électronique de (a) *Lactobacillus casei*, (b) *Streptococcus thermophilus*, (c) *Lactococcus lactis* (Corrieu et Luquet, 2008) ., (d) *Enterococcus faecalis*, (e) *Pediococcus sp*, (f) *Leuconostoc mesenteroides* (Wallace et al., 2003).

Tableau 3 : Les différents genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques (Laurent et al., 1998).

Genre	Morphologie	Fermentation	Température optimale	Nombre d'espèces
<i>Lactobacilles</i>	Bacilles	Homo ou hétérofermentaires	thermophiles ou mésophiles	G1 :23 G2 :16 G3 :22
<i>Lactococcus</i>	Coques	Homofermentaires	Mésophiles	5
<i>Streptococcus</i>	Coques	Homofermentaires	thermophiles ou mésophiles	19
<i>Leuconostoc</i>	Coques	Hétérofermentaires	Mésophiles	11
<i>Bifidobacterium</i>	forme irrégulière	Acide acétique et lactique	Mésophiles	25

De plus, l'utilisation des séquences de gènes codant les ARN 16S et 23S a conduit à l'identification de nouveaux genres bactériens parmi des bactéries lactiques, tels que *Carnobacteria*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus* issue d'une évolution taxonomique (Vandamme et al., 1996).

Les études d'hybridation ADN ÷ ADN, puis des structures et des séquences d'ARN ribosomiaux sont aussi devenues depuis quelques années des éléments essentiels permettant l'identification et ainsi la classification taxonomique des bactéries lactiques (Mäkelä et al., 1992, Stanckebrandt et Teuber, 1988, Vandamme et al., 1996, et Woese et al., 1990)(Figure 7).

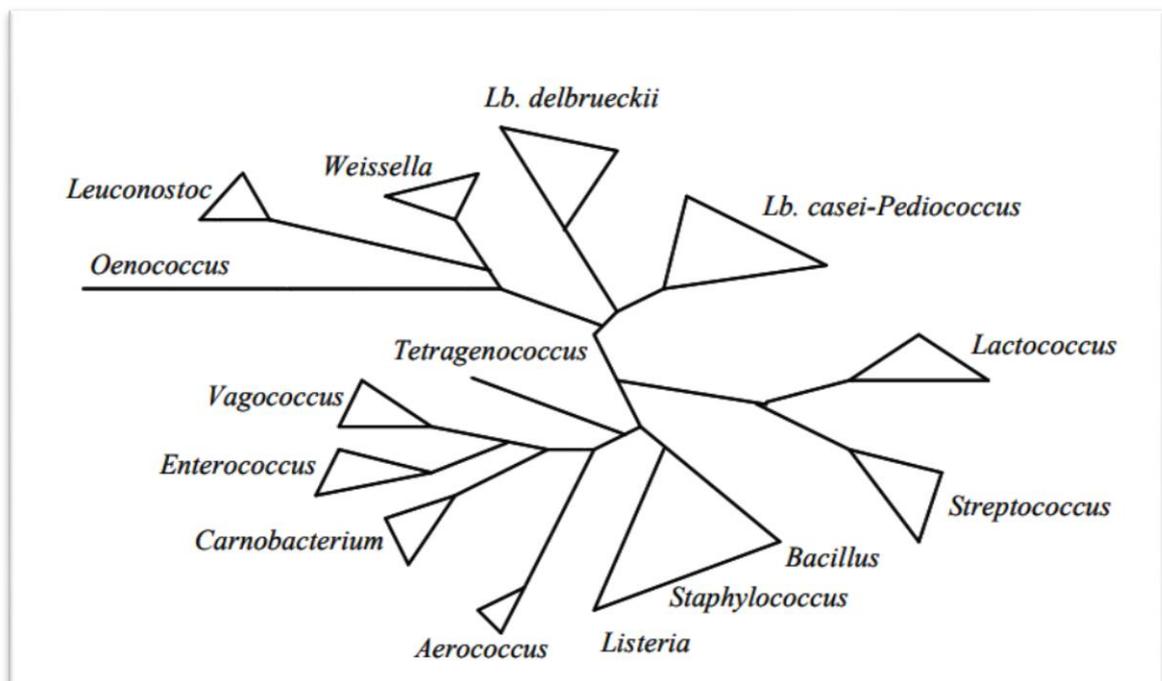


Figure 7 : Arbre phylogénique des bactéries lactiques et comparaison avec les genres *Aerococcus*, *Bacillus*, *Listeria* et *Staphylococcus* (Axelsson, 2004).

I.3.1.1. Genre *Lactobacillus*

Les espèces du genre *Lactobacillus* appartiennent à la famille des *Lactobacillaceae*. Ce sont des bâtonnets ou des coccobacilles Gram positif qui forment à l'occasion de courtes chaînes (Felis et al., 2007) .

Les *lactobacilles* sont des bactéries non mobiles, ne formant pas de spores, tolérantes à l'acide, et qui produisent de l'acide lactique comme principal produit fini métabolique de la fermentation des glucides (Cho et al., 2009) .

Ces bactéries sont chimio-organotrophes et micro-aérophiles. Bien qu'elles aient besoin de milieux riches pour croître, elles sont omniprésentes et peuvent survivre partout où il y a des hydrates de carbone (p. ex. aliments ; appareil respiratoire, tube digestif et appareil urogénital des humains et des animaux ; eaux usées ; et matériel végétal). Ils sont couramment utilisés pour la fermentation d'aliments et comme probiotiques (**Cannon et al., 2005**).

Les lactobacilles sont sensibles à la pénicilline, à l'ampicilline et aux aminosides (généralement la gentamicine) administrés par voie intraveineuse (**Cannon et al., 2005**).

Le genre *Lactobacillus* est quantitativement le plus important des genres du groupe des bactéries lactiques. Créé, pour la première fois, par **Beijerinck (1901)**.

Le genre *Lactobacillus* fait partie du phylum des *Firmicutes*, classe des *Bacilli*, la famille des *Lactobacellaceae*, ordre des *Lactobacillales*. Il regroupe des espèces présentant des caractères phénotypiques très hétérogènes, cette hétérogénéité est due à un GC% allant de 32-55% (**Beijerinck, 1901**).

a) Caractères morphologiques

Les lactobacilles sont des bactéries à Gram positif, non sporulées et généralement non mobiles. Les souches mobiles le sont grâce à une ciliature péritriche. Ils peuvent se présenter sous la forme de bâtonnets longs et fins ou très courts ou coccobacilles (**figure 8**). La formation de chaînes de cellules est courante (**De Vos et al., 2009**).

Les colonies des lactobacilles sont généralement de petites tailles, lisses, brillantes non pigmentées et souvent opaques. Dans les cas rares, certaines espèces comme *Lb. plantarum* donnent des colonies jaunâtres ou rougeâtres. Les lactobacilles se cultivent également, bien que plus difficilement, sur gélose enrichie en sang frais ou cuit donnant de petites colonies sans zones d'hémolyse (**Denis et al., 2007**).

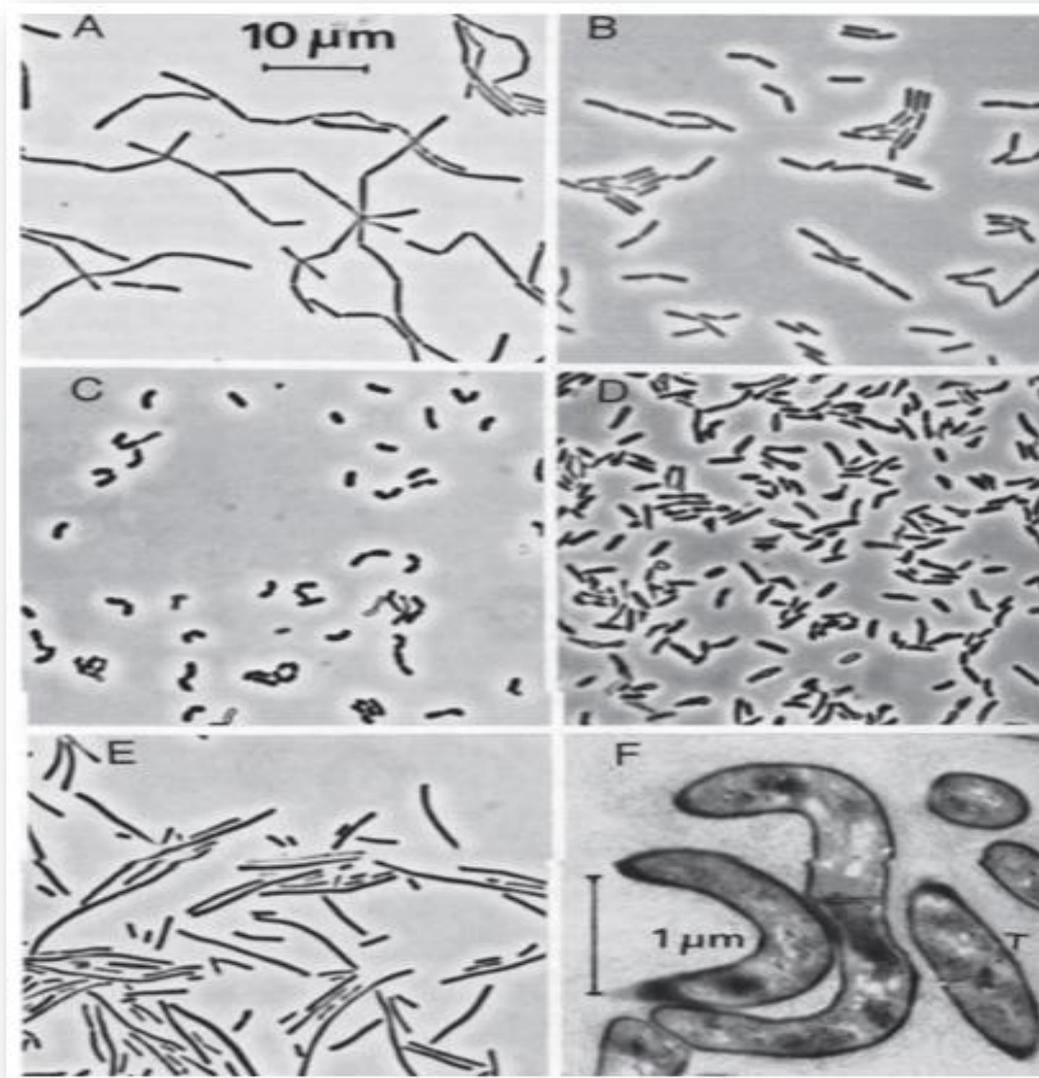


Figure 8 : Micrographes montre les différent morphologies cellulaire de *Lactobacillus* (A, *Lactobacillus gasseri*; B, *Lactobacillus agilis*; C, *Lactobacillus curvatus*; D, *Lactobacillus minor*; E, *Lactobacillus fermentum*; et F, involution de *Lactobacillus* dans une section mince de grain du kéfir) (Bergey's manual, 2009).

b) Caractères cultureux et exigence nutritionnelles des lactobacilles

La plupart des lactobacilles se multiplient dans une gamme de température comprise entre 15°C et 42°C. Certaines souches dites « thermophiles » restent viables à 55 °C (Tailliez, 2004).

Les lactobacilles se développent au mieux dans des conditions acides, quand le pH avoisine les 4,5 à 6,4, mais leur croissance s'arrête lorsque le pH avoisine 3,5 (**De Vos et al., 2009**). Le milieu le plus adapté à leur culture est celui De Man, Rogosa et Sharpe (MRS). Sur ce dernier, les colonies se développent en 24 à 48 heures. Elles sont généralement petites, incolores, blanchâtres ou jaunâtres, lisses ou rugueuses, arrondies ou lenticulaires (**De Vos et al., 2009**).

En plus de la source de carbone et d'azote, les lactobacilles sont caractérisés par des exigences nutritionnelles nombreuses qui peuvent être classées selon **De Man et al., (1960)** et **De Vos et al., (2009)** comme suit :

➤ **exigences en vitamines**

Toutes les espèces ont un besoin absolu en vitamines telles que la pantothenate (B5), en niacine (B3) et en cobalamine (B12). Les déficiences en vitamine B12 peuvent induire une diminution de la synthèse de l'ADN et entraîner des changements morphologiques et les cellules deviennent filamenteuses.

➤ **exigences en bases azotées**

Dans les milieux synthétiques, les lactobacilles, exigent la présence d'adénine, de cytosine, de désoxyguanosine, de guanine, de thymidine et d'uracile. Ces exigences sont variables selon les espèces (**De Man et al., 1960**).

➤ **exigences en cations**

Les ions Mg^{2+} et Mn^{2+} ou Fe^{2+} sont nécessaires pour la croissance des lactobacilles. Il a été démontré que le manganèse et le magnésium interviennent comme activateurs d'un grand nombre de réactions enzymatiques et comme stabilisateurs de la structure des acides nucléiques, de l'intégrité des ribosomes et de la membrane cellulaire des lactobacilles (**De Man et al., 1960**).

c) Caractères biochimiques et physiologiques

Le métabolisme énergétique des lactobacilles est exclusivement le saccharolytique et le lactate, généralement non fermenté, représente au moins, 50% des métabolites finaux produites à partir des sources de carbone assimilées (**Hammes et Hertel, 2009**).

La voie hétérofermentaire, communément appelée voie des pentoses phosphate (transcétolases) se produit chez les espèces appartenant à *Lactobacillus*, telles que *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermenti* et chez *Leuconostoc*, telles que *Leuconostoc*

mesenteroides et *Leuconostoc pentosaceus*. Ces bactéries dégradent les hexoses avec formation quasi stœchiométrique d'une molécule d'acide lactique, d'une molécule de CO₂ et d'une molécule d'éthanol. Les sucres à cinq atomes de carbone ou pentoses, peuvent parfois être fermentés et donnent alors une molécule d'éthanol et une molécule d'acide lactique. Outre ces produits, qui représentent plus de 80% des métabolites obtenus, on obtient également de l'acide acétique et du glycérol (**Makhloufi, 2012**).

Les lactobacilles se répartissent en trois groupes selon leur profil fermentaire, d'après la classification de **Kandler et Weiss (1986)** :

➤ **Les lactobacilles du groupe I (LBI)**, sont des bactéries homofermentaires strictes, ne fermentant que des hexoses. Les espèces de ce groupe fréquemment rencontrées dans les produits laitiers sont : *L. delbrueckii subsp. lactis*, *L. delbrueckii subsp. delbrueckii*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. acidophilus* et *L. helveticus*. Dans ce groupe, les écarts de contenu G+C sont élevés (33 à 53%).

➤ **Les lactobacilles du groupe II (LBII)**, lactobacilles hétérofermentaires facultatifs sont des bactéries qui fermentent les hexoses et produisent presque exclusivement de l'acide lactique. Ils peuvent également fermenter les pentoses après induction d'une phosphocétolase et produire de l'acide lactique et de l'acide acétique. Ce groupe rassemble entre autres : *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. rhamnosus*, *L. casei* et *L. paracasei*. Les contenus en G+C sont compris entre 35 et 47%.

➤ **Les lactobacilles du groupe III (LBIII)**, sont hétérofermentaires stricts. L'utilisation des sucres suit la voie des pentoses phosphate et conduit à la formation de lactate, d'acétate ou d'éthanol et de CO₂. Les contenus en G+C sont très variables : de 33% à 53% (**Axelsson, 2004 et Felis et Delaglieo, 2007**).

Ces caractères biochimiques sont fortement influencés par les conditions de culture. Ainsi, en présence d'hème (gélose au sang) certaines espèces de *Lb* peuvent synthétiser une vraie catalase et tous les cytochromes de la chaîne respiratoire, tout en se comportant comme des aérobies-anaérobies facultatives (**Coudeyras et al., 2008**).

Le mode de fermentation des sucres est une caractéristique utilisée pour différencier les genres des bactéries lactiques, il est étudié dans des conditions standards, concentration non limitée du glucose et des facteurs de croissance (acide aminé, vitamine, et précurseurs d'acide nucléique), et limiter la disponibilité de l'oxygène. Sous ces conditions les bactéries

lactiques peuvent être divisées en deux groupes : les homofermentaires, convertissant presque toute la quantité du glucose en acide lactique et les hétérofermentaires, ferment le glucose en acide lactique, éthanol, acide acétique, et CO₂ (Figure 9) (Klein et al.,1998 et Axelsson,2004).

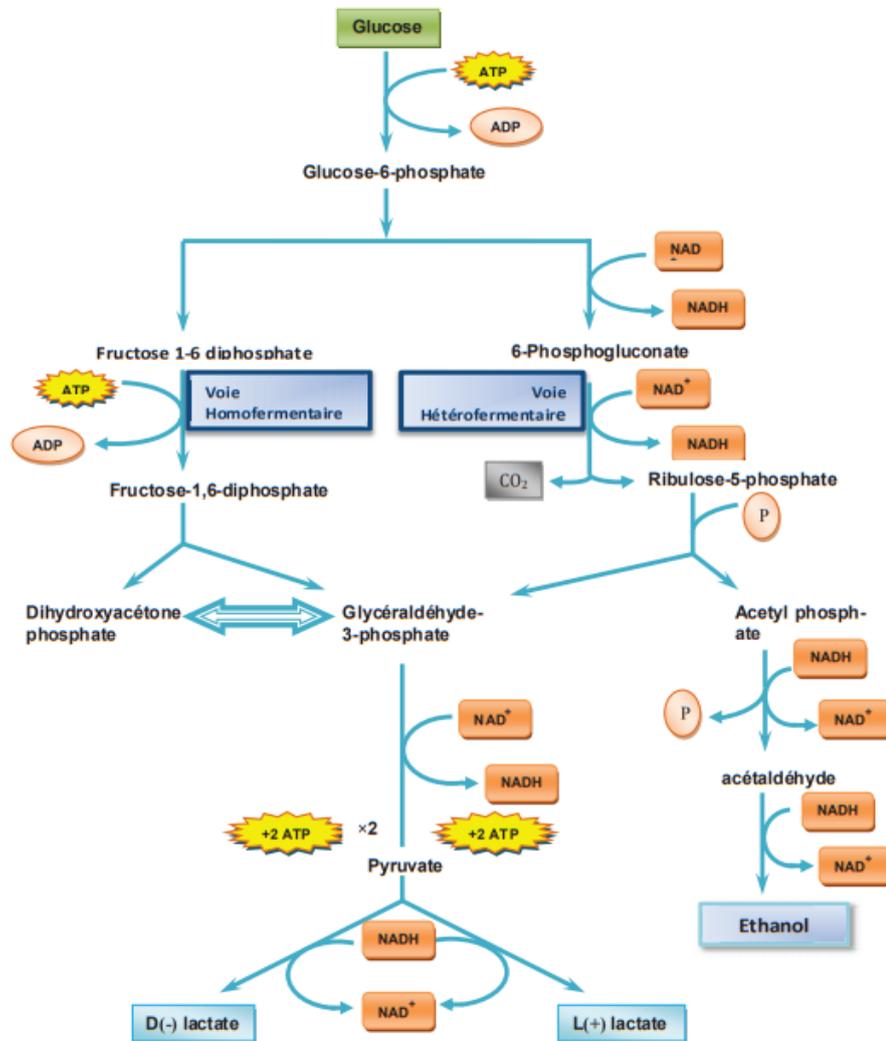


Figure 9 : Schéma succinct des principales voies métaboliques des lactobacilles (Perry et al., 2004).

d) Habitat

Les bactéries lactiques sont présentes à l'état libre dans l'environnement ou vivent en association avec un hôte, tel que l'homme ou l'animal, dans un écosystème bactérien comme le tractus gastro-intestinal ou génital des mammifères (Tableau 4) (Klein, 1998).

Tableau 4 : Habitat des *Lactobacillus* (Perry et al., 2004).

Habitat	Espèces rencontrées	Activité ou produit
Matériel végétal en décomposition	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. acidophilus</i> ,	Cornichons, ensilage et choucroute,
Laiterie	<i>Lb. delbrukii</i> , <i>Lb. lactis</i>	Fromage, yoghourts,
Tractus gastro-intestinal des animaux	<i>Lb. Salivarius</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. rhamnosus</i>	
-(Oral)	<i>Lb. casei</i> , <i>Lb</i>	Formation de
-(Intestinal)	<i>plantarum</i> ,	Carie dentaire
	<i>Lb. gasseri</i>	Flore normale
	<i>Lb. vaginalis</i>	
Vagin des mammifères	<i>Lactobacillus spp.</i>	Flore normale

I.3.2. Identification des bactéries lactiques

Schillinger et Lucke (1989), ont été les premiers à proposer une clef d'identification des bactéries lactiques basée sur la comparaison des caractéristiques physiologiques et biochimiques typiques des différentes espèces. Néanmoins cette clef permettait uniquement d'orienter l'identification et non une identification précise (Schillinger et Lucke (1989)).

Généralement, il existe plusieurs critères pour identifier les bactéries lactiques au niveau phénotypique : la forme des cellules bactériennes, la température de la croissance, la fermentation des sucres, les activités physiologiques et biochimiques et la production des exopolysaccharides (Wood et al., 1995).

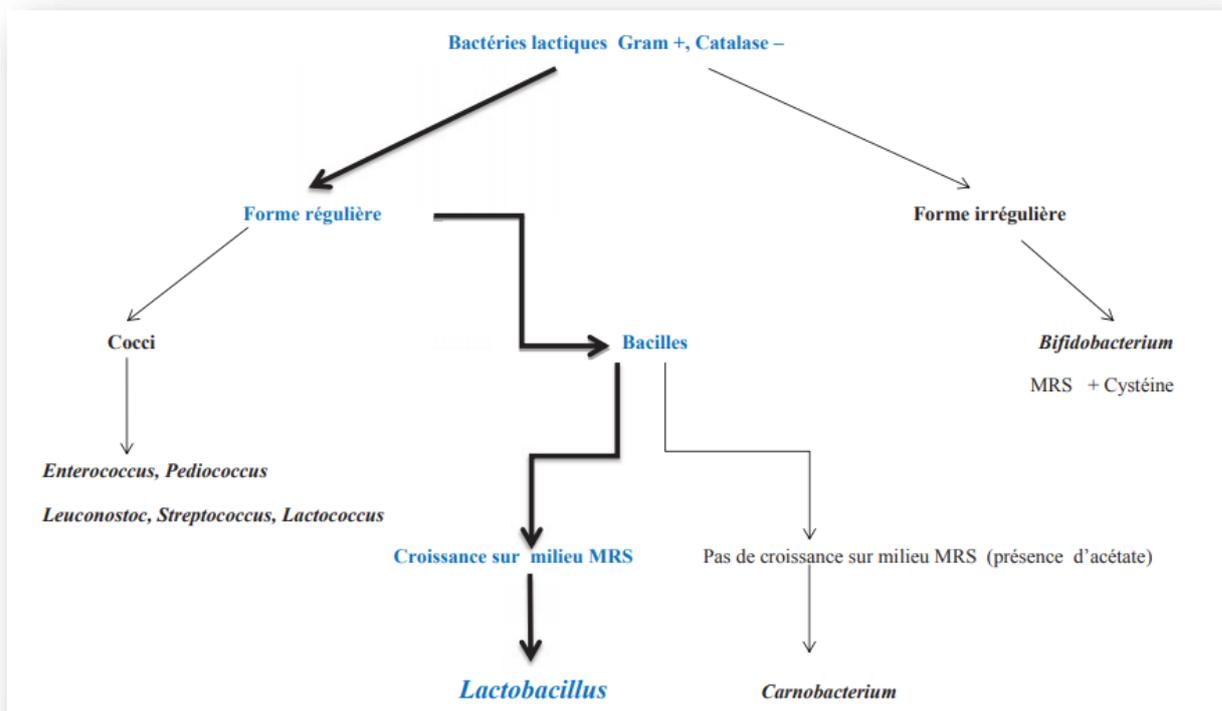


Figure 10 : Identification des genres des bactéries lactiques (Sutra et al., 1998).

L'utilisation des outils de taxonomie moléculaire comme l'hybridation quantitative ADN/ADN et le séquençage des gènes d'ADNr 16S, ont permis de lever des ambiguïtés et de nommer précisément les espèces de lactobacilles d'intérêt en santé et en alimentation humaine parmi plus d'une centaine d'espèces de lactobacilles décrites (Dellaglio et Felis, 2005).

I.4. Intérêt technologiques des bactéries lactiques

Les lactobacilles sont répendu dans la nature, et beaucoup d'espèces ont des applications dans l'industrie agroalimentaire, elles sont en général plus tolérante à l'acidité que les autres bactéries et peuvent ainsi terminer beaucoup de fermentation lactiques spontanée comme l'ensilage et les fermentations végétales (Mayra et Bigret, 2004).

Les lactobacilles sont utilisés dans plusieurs domaines dont la manufacture des produits laitiers comme :

I.4.1. Fabrication du yaourt

• Acidification

Le pouvoir acidifiant des bactéries lactiques permet la coagulation du lait (en facilitant l'action de la présure) et l'augmentation de la synérèse du caillé ; la participation aux propriétés rhéologiques du produit final et l'inhibition de la croissance des bactéries nuisibles (Papamanoli *et al.*, 2003).

Le yaourt est fabriqué grâce à l'association de *Streptococcus thermophilus* et de *Lactobacillus bulgaricus* (Figure 11). Ces organismes croissent en symbiose qui en résulte une rapide acidification. La présence des lactobacilles stimule la croissance de *S. thermophilus* en libérant des acides aminés et de peptides de caséine (Rajagopal et Sandine, 1990).

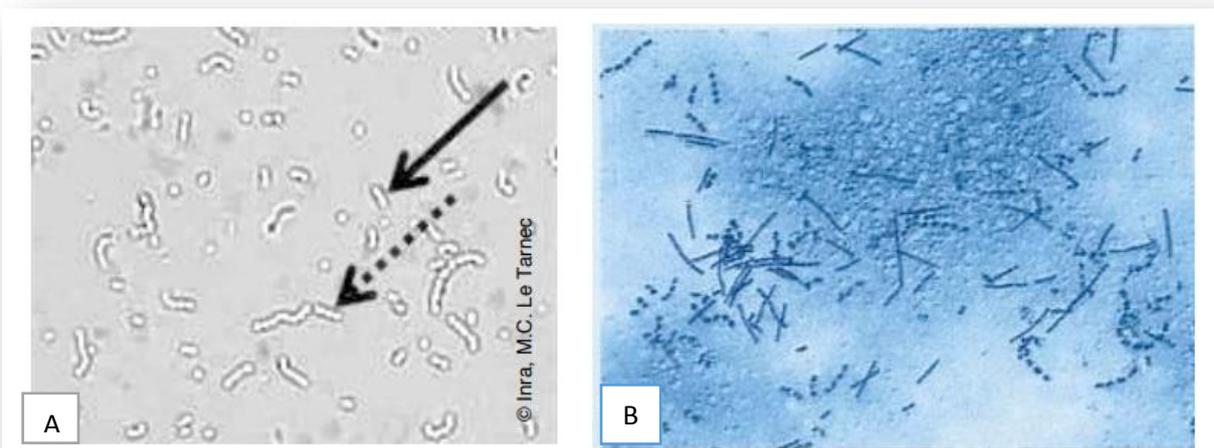


Figure 11 : (A) Observation microscopique des bactéries, à l'état frais, contenues dans le yaourt : *Streptococcus thermophilus* (flèche en pointillés) et *Lactobacillus bulgaricus* (flèche pleine). (B) *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* colorés en bleu de méthylène et observés au microscope (Righi, 2006).

• Aromatisation

L'arôme idéal d'un yaourt est un mélange équilibré de l'acidité et de l'acétaldéhyde. Ce processus est réalisé lors de la sélection des souches, de l'équilibre entre bacilles et cocci et lors du contrôle de la fermentation (Hickey *et al.*, 1983). Certains lactobacilles comme *Lb. acidophilus*, produisent de l'alcool déshydrogénase, cette dernière convertit l'acétaldéhyde en éthanol (Marshall et Cole, 1983).

Les bactéries lactiques sont capables de produire de nombreux composés aromatiques (tels que : l'a-acétolactate, l'acétaldéhyde, le diacétyl, l'acétoïne et 2,3-butanediol, l'éthanol, l'acétate, le formiate, ...etc.) principalement à partir du lactose, du citrate, des acides aminés et des matières grasses. Cette fonctionnalité est particulièrement importante lors de l'élaboration des laits fermentés, des fromages frais, crèmes et beurre, dont l'arôme principal est lié à cette activité microbienne (**Bourgeois et Larpent, 1996 ; Gerrit et al., 2005 et Cholet, 2006**).

➤ Les lactobacilles participent aussi dans la fabrication de certains pains, tel que les lactobacilles homofermentaires et hétérofermentaires (*Lb.delbreuckii*, *Lb.acidophilus*, *Lb.plantarum*...) qui interviennent à côté des levures (**Guiraud et Rosec, 2004 ; Giraffa et al., 2010**).

➤ Les lactobacilles participent également dans la production du vin grâce à la fermentation malolactique (*Lb.plantarum*, *Lb.brevis*, *Lb.casei*,.....) et à la dégradation de l'acide tartrique : *Lb.plantarum*, *Lb.brevis* (**Guiraud et Rosec, 2004 ; Giraffa et al., 2010**).

I.4.2. Conservation des aliments

L'homme utilise depuis longtemps, constamment ou non, les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques. Ces propriétés se sont avérées être intéressantes pour la conservation des aliments dans lesquels cette flore se développe. Les bactéries lactiques inhibent le développement de certains microorganismes grâce à la synthèse de molécules antimicrobiennes parmi lesquelles se trouvent les acides organiques et les bactériocines (**Wilson et al., 2005**).

I.4.3. production d'enzymes protéolytiques

Les bactéries lactiques possèdent des protéinases et des peptidases nécessaires à la dégradation des protéines du lait en peptides et acides aminés. Ceux-ci peuvent alors être transformés en alcools et en acides. Cette activité protéolytique intervient de ce fait sur le rendement fromager, la texture et la saveur typique du fromage et par conséquent sur les caractéristiques du produit final (**Buist et al., 1998**).

I.5. Les *Lactobacilles* et les probiotiques

Le terme "probiotique", dérive de deux mots grecs "pros" et "bios" qui signifient « pour la vie» (Bernier, 2010).

La définition actuelle des" probiotiques" est celle adoptée par le comité mixte d'experts **FAO/WHO (2002)** qui les définit comme "des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, exercent un effet bénéfique sur la santé de l'hôte".

Les probiotiques ont pour but d'aider la flore microbienne naturelle intestinale et par conséquent, leur plus grande évidence, sur la santé humaine, leur rôle sur l'intestin est exprimé par l'inhibition des germes pathogènes et la prévention et/ou le traitement des diarrhées infectieuses (FAO/OMS, 2002).

La figure 12 montre l'effet des probiotiques sur la muqueuse intestinale dans le cas d'infection à *Clostridium difficile* observé par microscopie électronique (Hickson et al., 2007).

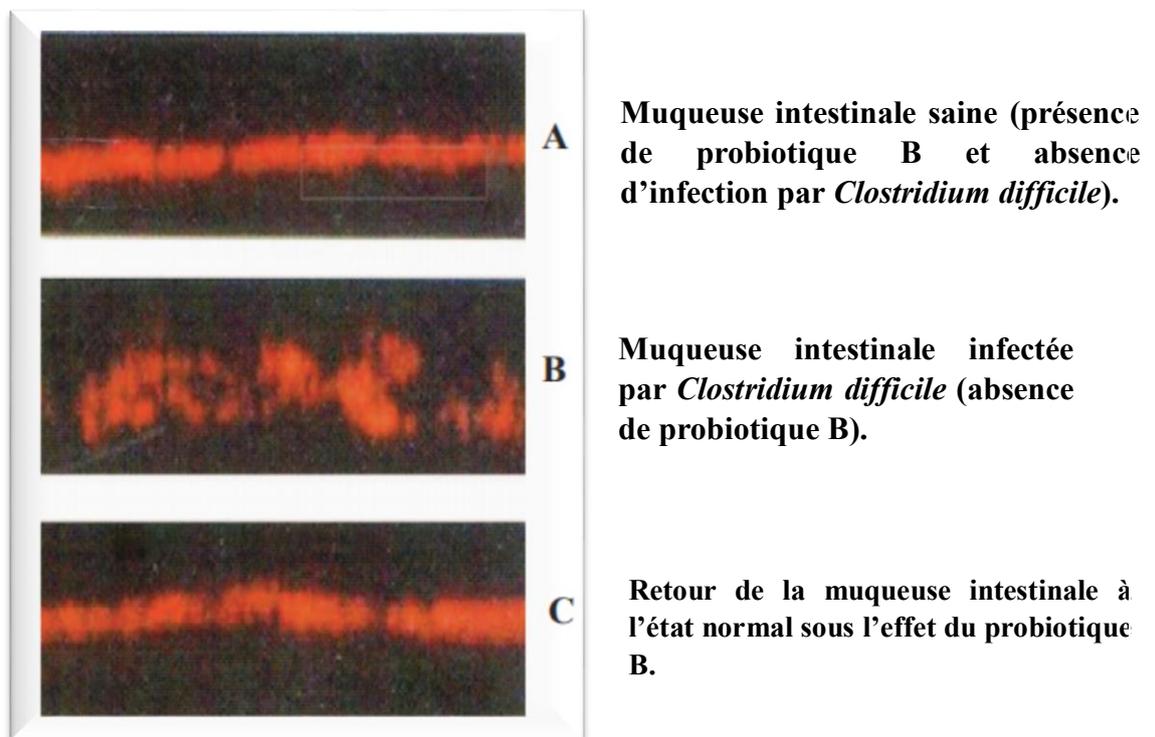


Figure 12 : Effet des probiotiques sur la muqueuse intestinale - Cas d'infection à *Clostridium difficile*. (Photos observées par microscopie électronique) (Hickson et al., 2007).

Les probiotiques peuvent être considérés comme un moyen de véhiculer les principes actifs qu'ils contiennent (enzymes, composants de paroi, substances antimicrobiennes) jusqu'à leurs cibles d'actions dans le tractus digestif. Les mécanismes d'action des probiotiques sur l'hôte sont complexes, souvent multiples et dépendent de la souche bactérienne considérée. Ils agissent en particulier en inhibant les bactéries indésirables, en neutralisant les produits toxiques, en améliorant la digestibilité alimentaire et en stimulant l'immunité. Ceci suggère qu'il faut un contact direct de ces probiotiques avec les différents constituants de la barrière intestinale, tels que la microflore endogène, le mucus intestinal, les cellules épithéliales. Ils sont également une source de vitamines (essentiellement du groupe B), et de sels minéraux assimilables (**Figure 13**) (Ait-Belgnaoui et al., 2006).

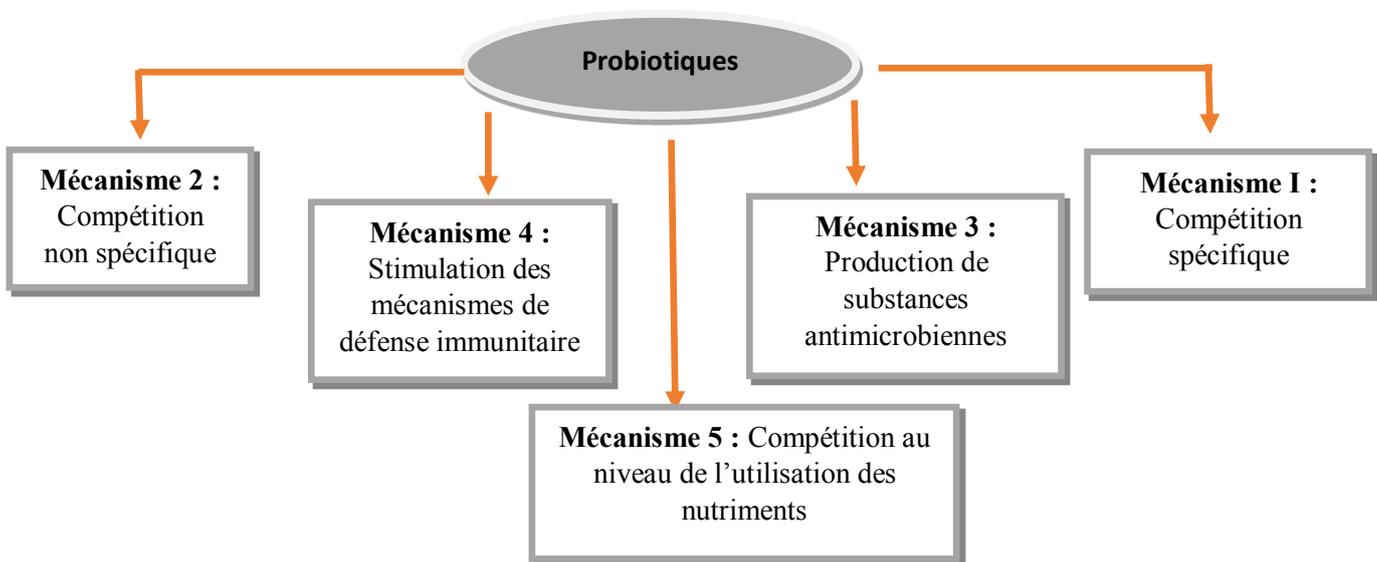


Figure 13 : Mécanismes d'action des probiotiques contre les microorganismes pathogènes (Kaur et al., 2002).

De nombreux microorganismes sont considérés comme probiotiques, parmi eux des bactéries lactiques telles que *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Lb acidophilus*, *Lb bulgaricus*, *Lb casei*, et *Streptococcus thermophilus*, sont les premières souches bactériennes qui ont été utilisées pour la fabrication de yaourt (Dias et al., 1995).

De nos jours, les probiotiques font l'objet de recherches intensives et on trouve de plus en plus de preuves démontrant la variabilité des effets bénéfiques associés à la consommation de probiotiques (**tableau 5**). Ces effets peuvent être répartis en deux groupes : des effets bénéfiques sur l'équilibre de la microflore intestinale et des effets thérapeutiques.

Tableau 5: Effet bénéfique des lactobacilles probiotiques sur la santé humaine (FAO/OMS, 2001 ; WGO, 2008) :

Effet probiotiques	Mode d'activité proposé
Réduction des risques des diarrhées	-Résistance à la colonisation des pathogènes. -Stimulation du système immunitaire.
Diminution des allergies alimentaires	-Diminution du passage des protéines alimentaires par diminution de la perméabilité membranaire intestinale. -Stimulation du système immunitaire.
Amélioration de la digestion du lactose	Action de la β galactosidase dans l'intestin grêle
Traitement des maladies inflammatoires	-Modulation de la flore intestinale. -Stimulation du système immunitaire.
Réduction du cholestérol	-Assimilation du cholestérol. -Déconjugaison des sels biliaires.
Prévention du cancer du côlon	-Stimulation du système immunitaire. -Production de composés antimutagéniques -Modulation des enzymes fécales carcinogéniques. -Dégradation des carcinogènes. -Elimination des bactéries impliquées dans la production de carcinogènes.

De nos jours, les produits probiotiques sont commercialisés sous trois formes (**Patterson, C.A., 2008**) :

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



Figure 14 : Quelque exemple de probiotiques et compléments alimentaires à base des lactobacillus, A : *Lb rhamnosus*, B : *Lb plantarum*, C : *Lb rhamnosus*.

(<https://www.amazon.fr/lactobacillus-rhamnosus>)

I.6. Effet inhibiteur des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques peuvent empêcher l'adhésion de plusieurs bactéries pathogènes par la sécrétion d'inhibiteurs d'adhérence. Cette capacité se retrouve chez plusieurs bactéries lactiques telles que les *Lactobacillus*, *Streptococcus thermophilus* et *Bifidobactéries* (Matto et al., 2006).

Certaines souches présentent une activité antibactérienne et l'application de souches lactiques bactériocinogéniques peut être considérée comme un outil complémentaire pour prévenir le développement des bactéries pathogènes (Todorov et al., 2004).

Certaines espèces de bactéries lactiques comme les *Lb brevis*, *Lb plantarum*, *Lb acidophilus*, *Lb delbrueckii subsp. bulgaricus* produisent des antibiotiques actifs contre les bactéries Gram positives (*Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Sarcina*) ou Gram

négatives (*Pseudomonas*, *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Proteus*, *Vibrio*) (Savado et Traoré, 2012).

Certaines souches présentent une activité antibactérienne et l'application de souches lactiques bactériocinogéniques peut être considérée comme un outil complémentaire pour prévenir le développement des bactéries pathogènes (Figure 15) (Todorov, 2004).

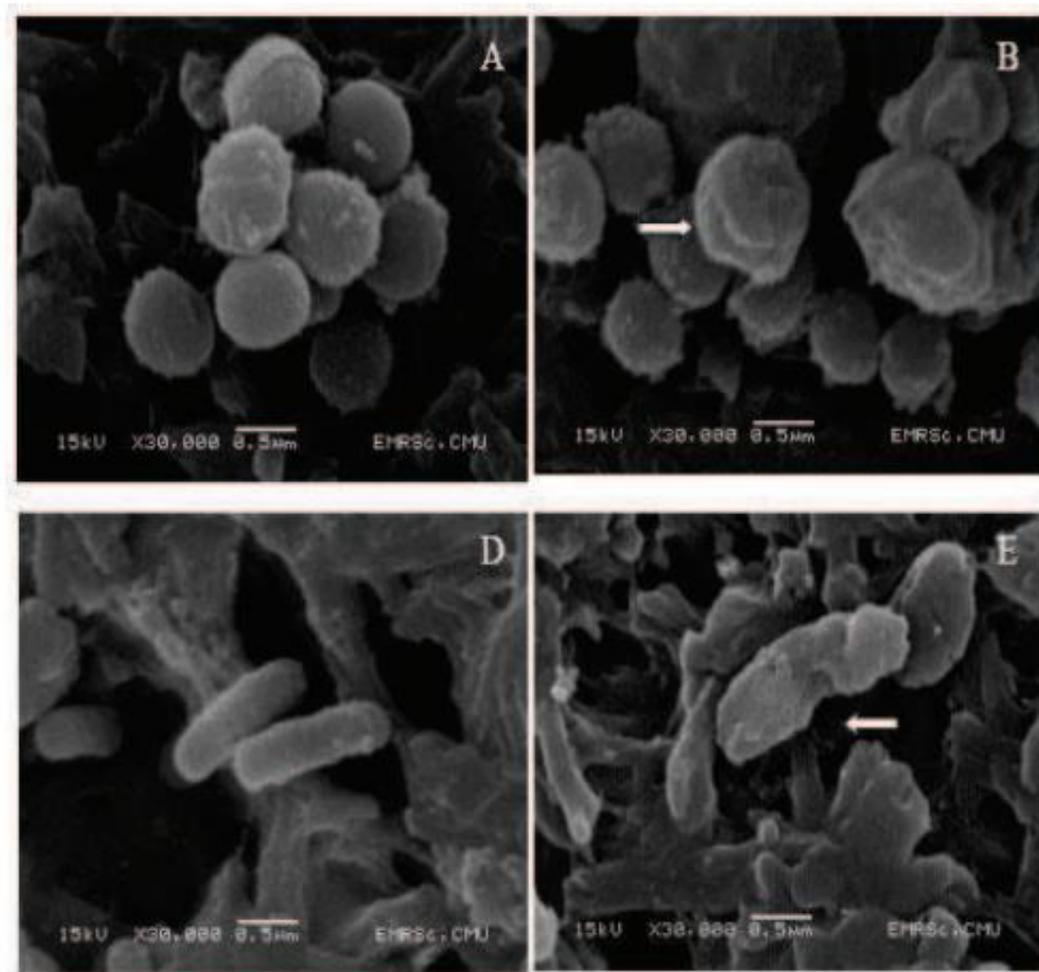


Figure 15 : Activité antibactérienne d'une souche de *L. fermentum* contre *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes*. Les images (B) et (E) montrent des cellules détériorées de *S. aureus* et *L. monocytogenes* respectivement. Les images A et D correspondent à leurs cultures sans *Lactobacillus* (Microscopie électronique à balayage) (Klayraung et Okonongi, 2009).

Les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyl et les bactériocines (**Dortu et Thonart, 2009**).

- **Acides organiques**

La production d'acides organiques cause une acidification du milieu qui peut limiter la croissance de certaines bactéries indésirable de ce fait une longue exposition dans un milieu acide peuvent entraîner la mort de plusieurs bactéries (**kostineket al., 2005**).

L'acide lactique et l'acide acétique pénètrent passivement la membrane cytoplasmique, des fortes concentrations d'acides, le milieu intracellulaire peut s'acidifier et les fonctions cellulaires sont inhibées et le potentiel membranaire est annulé (**Ammoret al., 2005**).

- **Dioxyde de carbone (CO₂)**

Il crée un milieu anaérobique, qui empêche les décarboxylations enzymatiques. L'accumulation de CO₂ peut causer un dysfonctionnement de la perméabilité, il est principalement produit par les *Lb* hétérofermentaires (**Eklund, 1984**).

- **Acétaldéhyde L'acétaldéhyde**

Empêche la croissance de *Staphylococcus aureus*, de *Salmonella typhimurium* et d'*E. coli* à une concentration de 10 à 100 ppm dans les produits laitiers (**Piard et Desmazeaud, 1991**).

- **Peroxyde d'hydrogène**

Les bactéries lactiques sont capables de convertir l'oxygène moléculaire (O₂) en super oxyde excité (O₂⁻), en peroxyde (H₂O₂) ou en eau (H₂O). Ces réactions sont catalysées par des enzymes spécifiques en présence d'un substrat à oxyder. Ces enzymes ont été trouvées chez des souches de *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* (**Condon, 1987**). Ce composé bloque le fonctionnement de certaines enzymes-clés intervenant dans la glycolyse résultant l'inhibition de la croissance des microorganismes (**Desmazeaud, 1996**).

- **Les bactériocines**

Il existe plusieurs définitions du terme bactériocine. A l'origine, ce terme a été utilisé pour désigner les protéines et peptides antimicrobiens synthétisés selon la voie ribosomique. Plus précisément, les bactériocines sont considérées comme des substances protéiques présentant une activité antimicrobienne (**Klaenhammer, 1988**).

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens le plus souvent cationiques, modifiés ou non post-traductionnellement, de masses moléculaires comprises entre 2 et 6 kDa (**Heng et al., 2007**).

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont généralement actives à faible concentration contre des bactéries phylogénétiquement proches (**Belguesmia et al., 2011, Cotter et al., 2005**).

L'activité antimicrobienne des bactériocines a un effet soit bactéricide, provoquant la mort de la bactérie cible, soit bactériostatique inhibant la croissance bactérienne. Les bactériocines les plus étudiées sont celles produites par les bactéries lactiques connues pour leur rôle dans la bonne conservation des aliments (**Cotter et al., 2005**).

Selon KLAENHAMMER, 1993, les bactériocines sont réparties en trois classes :

- Les bactériocines de classe I ou lantibiotiques ;
- Les bactériocines de classe II : La classe II peut être subdivisée en quatre sous classes IIa à IId ;
- Les bactériocines de classe III.

Tableau 06 : Classification des bactériocines de bactéries lactiques (Luquet et Corrieu, 2005).

Classe	Sous-catégorie
Classe I : l'antibiotique	Type A : molécules linéaires Type B : molécules globulaires
Classe II : bactériocines non-modifiées thermostables	Classe : anti-listeria Classe : bactériocines à deux composants Classe : autres bactériocines
Classe III : bactériocines de grande taille, sensibles à la chaleur.	

Les bactéries lactiques produisent des substances antimicrobiennes de nature protéique appelées bactériocines. Cette caractéristique est utilisée industriellement pour la destruction des bactéries indésirables et pathogènes dans la fabrication d'aliment comme la nisine produite par les *lactocoques* dirigée contre *Bacillus* et *Clostridium*, la plantaricine et la sakacine produites toutes les deux par les *lactobacilles* actives sur *E. coli*, *Listeria* et certaines levures (Ogunbanwo et al., 2003). Certaines bactériocines produites par les lactobacilles sont résumées dans le tableau 07 .

Tableau 7: Exemples de bactériocines décrites chez des lactobacilles

Souches	Bactériocines	Références
<i>L. acidophilus strain M46</i>	acidocine B	(Leer, 1995)
<i>L. johnsonii</i>	lactacine F	(Abee, 1994)
<i>L. salivarius BGH01</i>	LS1 et LS2	(Busarcevic, 2012 ; Busarcevic,2008)
<i>L. gasseri LA39</i>	gasséricine A	(Kawai, 1998)
<i>L. helveticus 481</i>	helvéticine J	(Joerger, 1990 ; Joerger, 1986)
<i>L. salivarius UCC118</i>	Abp118	(Riboulet-Bisson,2012)
<i>L. curvatus LTH1174</i>	curvacine A	(Tichaczek, 1993)
<i>L. brevis SB27</i>	brévicine 27	(Benoit, 1997)
<i>L. plantarum A1</i>	plantaricine ASM1	(Hata, 2010)
<i>L. sakei 1</i>	sakacine 1	(Gomes, 2012)

Chapitre 11

Matériel et Méthode

Le but de notre étude qui porte sur l'isolement des souches de lactobacilles à partir de lait de chèvre et l'étude de leur activité antimicrobienne vis-à-vis des souches indésirable (qui contaminent les produits laitiers et qui possèdent un danger pour la santé de l'homme) a été réalisé au niveau de laboratoire d'hygiène de Blida durant la période, du mois de Février jusqu'au mois d'Avril.

1. Matériel

1.1. Matériel biologique

➤ Échantillonnage

Les échantillons du lait de chèvre(race Malti) analysés proviennent des deux fermes une de la commune de Reghaia (Wilaya d'Alger), et une autre de Bouaarfa (Wilaya de Blida).

La collecte, le transport, le stockage de lait de chèvre peuvent tous affecter la qualité des résultats des tests, pour cette raison, nous avons suivi les étapes ci-dessous :

- La collecte des échantillons est faite juste après la traite matinale (7h du matin) à la main.
- Les mains et le matériel utilisé ont été nettoyé avec des lingettes désinfectantes, et d'autres ont été flambés à l'alcool comme (matériel inox).
- Prélèvement de notre échantillon à partir de trois parties différentes du seau à lait, surface, profond, mélange, (le seau à lait était fermé pendant 10 à 20 minutes) **(Figure 16).**

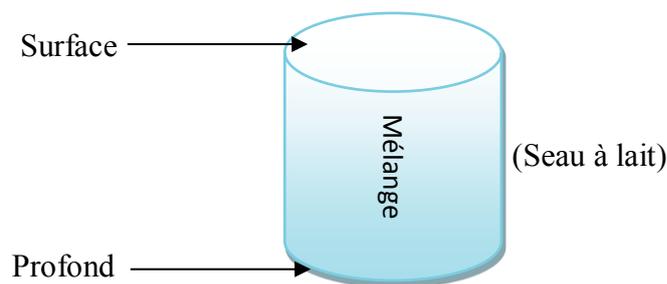


Figure 16 : Prélèvement à partir de seau à lait.

- le lait était recueilli dans des flacons stériles de 50 ml et identifié par étiquetage.

- Les échantillons sont réfrigérés (dans une glacière contenant des blocs réfrigérants) pour préserver la qualité et la composition du lait.



Figure 17 : Pots stériles et glacière utilisés dans l'échantillonnage.

➤ **Souches pathogènes**

Pour l'étude de l'activité antimicrobienne, cinq (5) souches pathogènes isolées à partir des urines (**Tableau 8**) ont été utilisées dans notre étude.

Tableau 8 : L'origine des bactéries pathogènes

Souches pathogènes	Isolement	Origine
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25912	Urine	Hôpital Brahim tirichine/faubourg de Blida
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Urine	Hôpital Brahim tirichine/faubourg de Blida
<i>Pseudomonas sp</i> ATCC 27812	Urine	Hôpital Brahim tirichine/faubourg de Blida
<i>Bacillus cereus</i>	Urine	Laboratoire d'hygiène de Blida
<i>Proteus mirabilis</i>	Urine	Laboratoire d'hygiène de Blida

1.2. Matériel non biologique

Le matériel non biologique utilisé dans notre étude représenté par les géloses, les bouillons, produits chimiques et réactifs, l'appareillage est consigné en Annexe I.

2. Méthode

2.1. Isolement et purification des isolats

a. Isolement

Le milieu de culture utilisé pour l'isolement des *Lactobacillus* est celui de Man Rogosa et Sharpe (MRS) (Guiraud et Rosec, 2004). Afin d'isoler les lactobacilles, 1 ml de chaque échantillon a été déposé dans 9 ml d'eau peptonée stérile ; c'est la solution mère. Après homogénéisation, 1ml de cette solution mère a été transféré dans 9 ml d'eau peptonée ; c'est la dilution 10^{-1} . De la même manière, les dilutions suivantes ont été préparées jusqu'à la dilution 10^{-4} . Un ml de chaque dilution a été ensemencé sur gélose MRS (pH 5,95) à raison de 3 boîtes par dilution. Les boîtes de Pétri ont été incubées en anaérobiose à 37°C pendant 24 à 72 h (Figure 18).

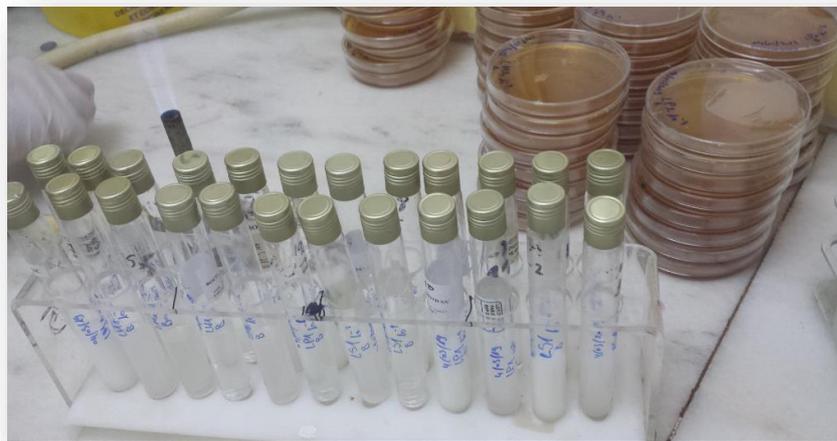


Figure 18 : isolement des *Lactobacillus*.

b. Purification

Afin de purifier les souches de bactéries lactiques, plusieurs repiquages successifs ont été réalisés sur gélose MRS. Le prélèvement et la remise en suspension ont été réalisés, uniquement, pour des colonies bien distinctes, homogènes et bien développées. La pureté de la souche a été vérifiée par examen macroscopique et microscopique.

Les souches considérées comme pures et qui possèdent les caractéristiques des lactobacilles (petite colonies blanchâtres, Gram +, forme bacilles) sont conservées sur gélose MRS et bouillon MRS à une température de 4°C (Saidi *et al.*, 2002) (Figure 19).

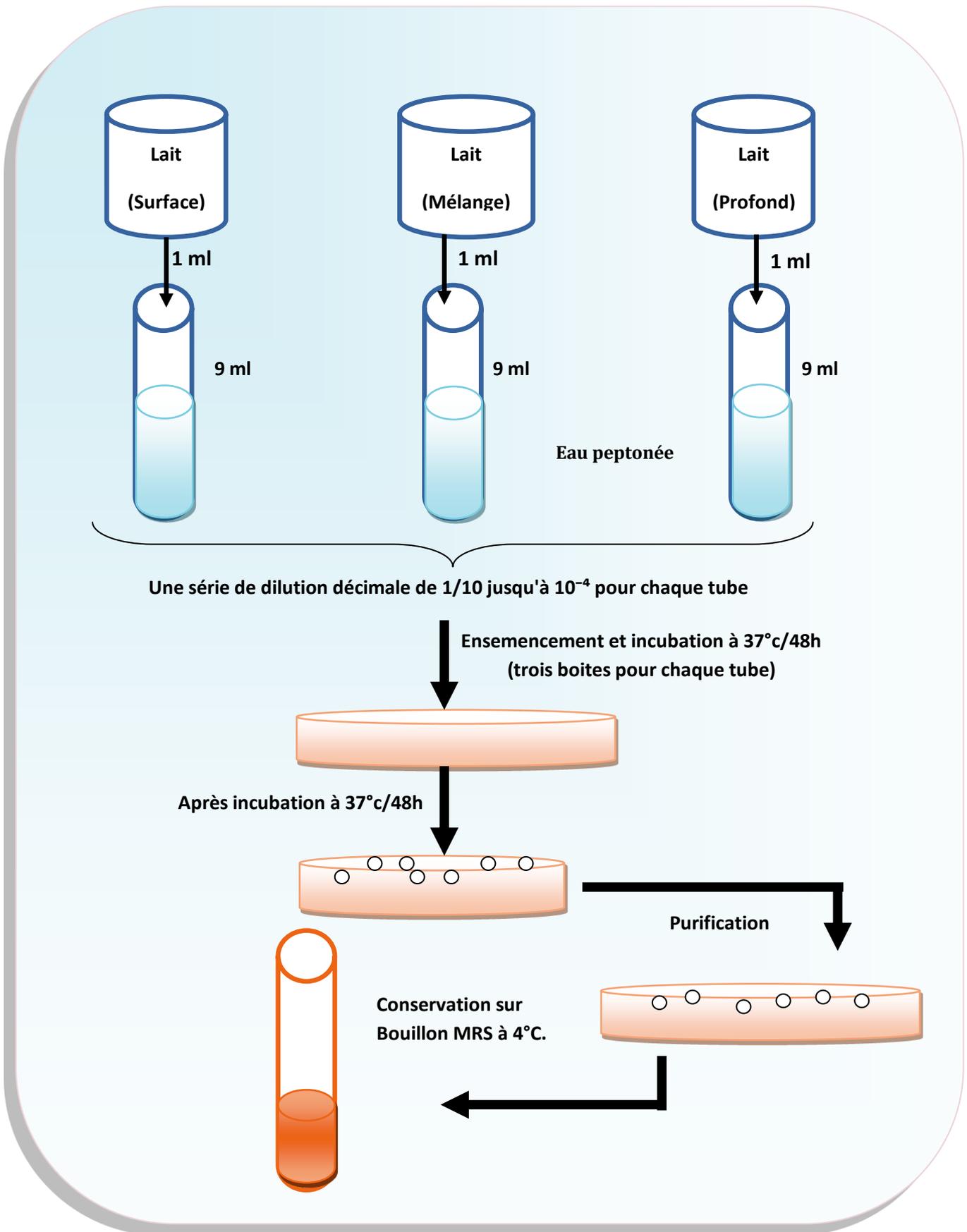


Figure 19 : Schéma illustratif des étapes de l'isolement.

2.2. Identification

2.2.1. Caractères morphologiques et culturels

a. Examen macroscopique

L'étude macroscopique a permis de décrire l'aspect, la forme, le contour, la surface et la couleur des colonies obtenus sur milieu solide (Prescott et al., 2003).

b. Examen microscopique

L'examen microscopique est révélé par la coloration de Gram (APHA, 1992). Celle-ci permet de faire la différentiation entre les bactéries Gram positives et Gram négatives et renseigne sur la forme et la disposition des bactéries (Prescott et al., 2003).

La coloration de Gram a été réalisée selon la méthode classique sur des cultures jeunes pures de moins de 24h. Un frottis de cellules a été réalisé sur une lame propre et en laissant évaporer quelques gouttes d'alcool versées directement sur le prélèvement. Après fixation, de Violet de Gentiane, égoutter sans rincer, puis, on dépose quelques gouttes de légol et laisser agir 4 à 6 secondes, qui ensuite a été traité avec, la fushine pendant 30 seconds. Le frottis a été observé au microscopique sous immersion au grossissement X100. Les isolats ayant une coloration violette sont Gram positifs (+) tandis que ceux présentant une coloration rose sont Gram négatifs (-).

2.2.2. Caractères biochimiques

a. Test catalase

Catalase est une enzyme possédant la faculté de décomposer le peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène. Cette enzyme est fort répandue dans la nature. L'importance de la catalase consiste en ce qu'elle paralyse l'activité de l' H_2O_2 qui se forme à l'oxydation des matières organiques, et qui est pernicieux pour les cellules (Dagmara Talce, 1936).

Une goutte de H_2O_2 est déposée sur une lame qui contient une colonie prélevée à partir de la gélose MRS. La décomposition de H_2O_2 est traduite par un dégagement gazeux sous forme de mousse et de bulles, selon la réaction suivante (Guiraud, 2003).



Au terme de cette étude macroscopique et microscopique seules, les souches à Gram positif de forme bacille et à catalase négative sont retenues pour le reste du travail.

b. Production de gaz

Les tubes de 10ml de bouillon MRS, contenant une cloche de Durham (il faut vider les cloches) ont été ensemencés avec une colonie bien distincte, puis incubés à 37°C pendant 48h (**Figure 20**).

Le développement d'une bactérie hétérofermentaire se manifeste par l'apparition de gaz dans la cloche de Durham, qui est absente chez les bactéries homofermentaires (**Bourgeois et al., 1991**).

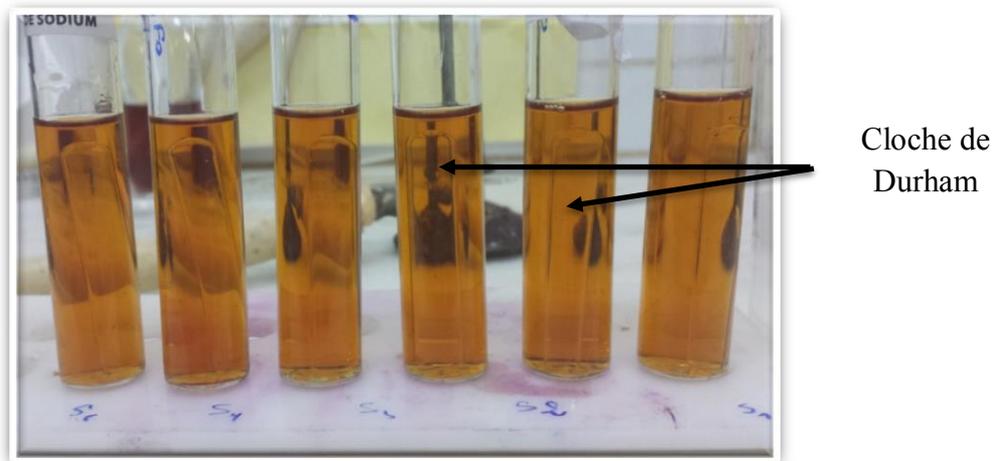


Figure 20 : Présentation d'une Série de tubes contenant la cloche de Durham

c. Fermentation des sucres

Les lactobacilles possèdent la capacité de dégrader différentes sources de carbone et ceci constitue un critère indispensable dans l'identification.

Le test est réalisé en cultivant les souches (une colonie) dans 2ml de bouillon MRS sans extrait de viande et sans glucose, qui est remplacé par le sucre à tester introduit en solution à une concentration finale de 1%.

Les carbohydrates utilisés sont : maltose, saccharose, fructose et L-arabinose. Le choix et le nombre des sucres ont été effectués selon leur disponibilité. Les solutions de sucres sont préparées au laboratoire, on ajoutant 1gramme de sucre dans 100 ml de bouillon MRS. Après inoculation du milieu MRS à 1% de sucre, il est recouvert d'une fine couche de l'huile de paraffine afin d'assurer les conditions d'anaérobiose (**Figure 21**).

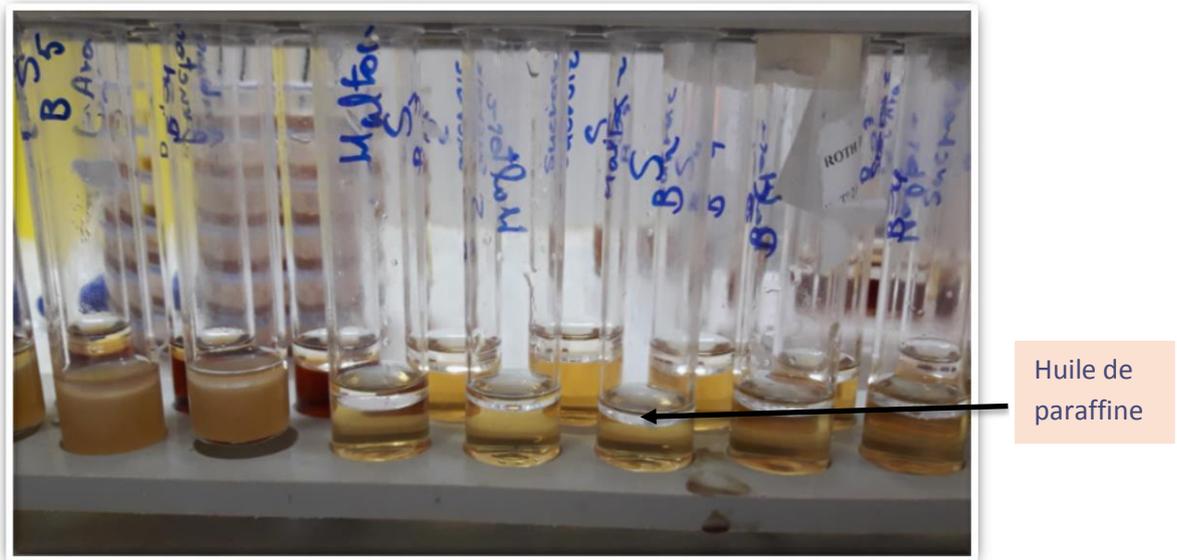


Figure 21 : Test de fermentation des sucres

Après incubation pendant 48h, la fermentation des sucres se traduit par un trouble du milieu accompagné par le virage de couleur du pourpre vers le jaune. Dans le cas d'absence de virage de couleur, on en déduit que le sucre testé n'est pas fermenté par la souche (Tourneur, 1972; Samelis et al., 1994).

2.2.3. Tests physiologiques

a. Croissance à différentes températures

Ce test est important de point de vue taxonomique, car il permet de distinguer les bactéries lactiques (lactobacilles) mésophiles des bactéries lactiques thermo tolérantes (Leveau et al., 1991).

Ce test a été réalisé après inoculation du bouillon MRS par des cultures fraîches des 12 souches des lactobacilles déjà obtenue. Les cultures ont été incubées à différentes températures 15°C, 30°C, 37°C et 44°C.

La croissance est révélée par un trouble du milieu après 24 à 48 heures en comparaison avec un témoin non ensemencé (Guiraud et Galzy, 1980).

b. Croissance en présence de différentes concentrations de NaCl

Ce test permet de déterminer la résistance des souches au stress salin (**Larpen et al., 1990 ; Samelis et al., 1994**).

Pour chaque souche, quatre tubes stériles contenant 5 ml de bouillon MRS à 2%, 4%, 6,5% et 10% de NaCl ont été ensemencés par une colonie de Lb, incubé à 37 °C pendant 48h.

La croissance de ces bactéries se manifeste par un trouble du milieu en comparaison avec un tube témoin non ensemencé (**Guiraud, 2003**).

c. Croissance à pH 4, 5 et 9.6

Ce test a été réalisé sur bouillon MRS, dont le pH est ajusté à 4 et 9,6, et cela en ensemencant un tube stérile contenant 1ml du bouillon MRS à pH voulue avec une colonie prise de la gélose MRS.

La première étape c'était de mesurer le pH de notre bouillon MRS. Ce dernier a été ajusté à pH=4 avec une quantité du bouillon MRS suffisante pour l'ensemencement de 12 souches de lactobacilles. Pour diminuer le pH à 4, ont été ajoutés quelques gouttes de HCL. Une autre quantité du bouillon MRS est ajustée après à 9,6 en ajoutant du NaOH.

La croissance se traduit par un trouble du milieu après 24 à 48 heures à 30°C (**Guiraud et Galzy, 1980**).

2.2.4. Tests technologiques

Nous avons effectué une étude technologique de ces souches afin de pouvoir les utiliser ultérieurement dans l'industrie laitière. Parmi les tests technologiques réalisés :

a. Thermo résistance : à 60,5°C

Le test de thermo résistance permet de sélectionner des espèces thermorésistantes. Des tubes contenant du bouillon MRS sont inoculés par les souches isolées de 48h, ensuite les tubes sont déposés dans un bain marie à 60,5°C pendant 30 min, puis soumis à un choc thermique à l'eau froide, ensuite, elles sont incubées à 37°C pendant 48 à 72 h. Un résultat positif se traduit par un trouble (**Figure 22**) (**Badis et al., 2005**).



Figure 22 : Test de thermorésistance

b. Activité protéolytique

Selon **Van den berg et al., (1993)**, l'activité est recherchée en milieu MRS gélosé additionné de lait écrémé à 1% et 2%.

Un volume de 5µl d'une culture fraîche de chaque souche été déposé en spots puis les boites ont été incubées à 37°C pendant 48h en anaérobiose. La protéolyse se manifeste par une zone claire autour des spots (**Figure 23**) (**Moulay et al., 2006**).

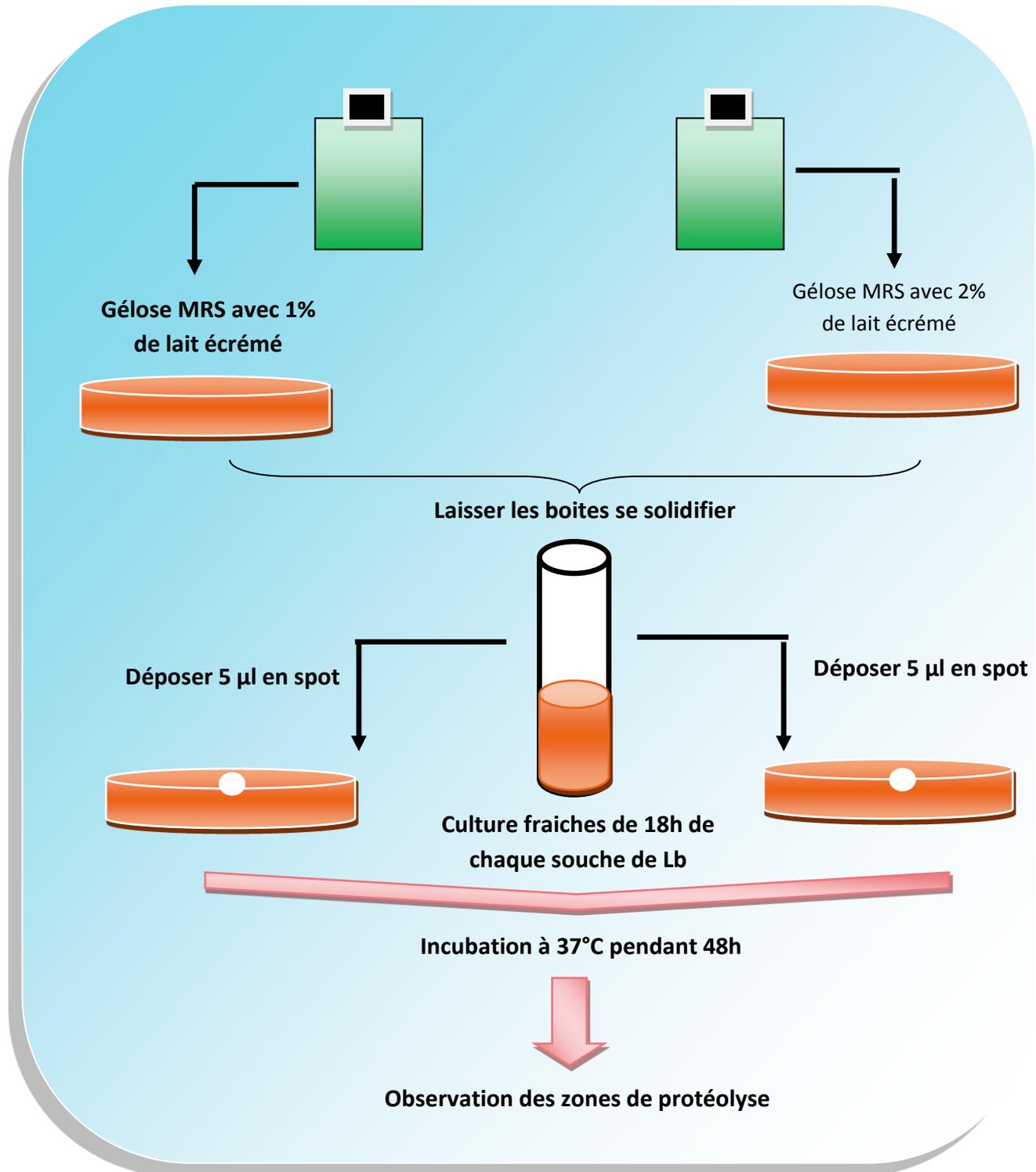


Figure 23 : Schéma de l'étude du pouvoir protéolytique.

c. Effet antimicrobien

Ce test permet d'étudier la capacité des lactobacilles à inhiber les souches pathogènes par la méthode de double couche. Cette activité est mise en évidence par le test de spots (**Fleming et al., 1975**). Le test est adopté avec quelques légères modifications.

i. Standardisation des inoculas

Le but de la standardisation de l'inoculum bactérien, est d'avoir le même nombre de cellules bactériennes dans 1 ml de culture durant toute l'expérimentation.

Dans un premier temps, nous avons vérifié la pureté des souches pathogène par observation macroscopique et microscopique. Des repiquages des colonies sur gélose nutritive ont été réalisés avec incubation de 24h.

Après 24h d'incubation sur gélose nutritive, six colonies identiques et bien isolées de chaque souche (*Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Escherichia coli* ATCC 25912, *Pseudomonas sp* ATCC 27812, *Bacillus cereus*, *Proteus mirabilis*) ont été repiquées dans 9ml de bouillon nutritive et cultivées à 37°C pendant 18 à 24h.

La même procédure a été répétée avec les souches *Lb*. Après incubation à 37°C durant une période de 48h, six colonies identiques et bien isolées de chaque souche ont été repiquées dans 9ml de bouillon MRS.

i. Méthode des spots

5 µl de la suspension de chaque souche des lactobacilles à tester provenant d'une culture fraîche (18h) à raison de 10⁹ UFC/ml a été déposés en spot sur la gélose MRS (à raison de trois spots par boîtes). Les spots ont été séchés 10 min devant le bec benzène. Pour permettre le développement de colonies visibles macroscopiquement, les géluses sont incubées pendant 24 h à 37°C en aérobiose.

Par la suite, nous avons recouvertes les spots par 9ml de gélose nutritive en surfusion ensemencée à raison de 1 ml (10⁹ UFC/ml) des souches cibles. Une fois solidifiées, les boîtes sont incubées à 37°C pendant 18h à 24h (**Figure 24**).

Une zone claire autour du spot de bactéries lactiques est considérée comme une inhibition de la croissance des pathogènes cibles. Cette activité inhibitrice est déterminé par la mesure des diamètres d'inhibition.

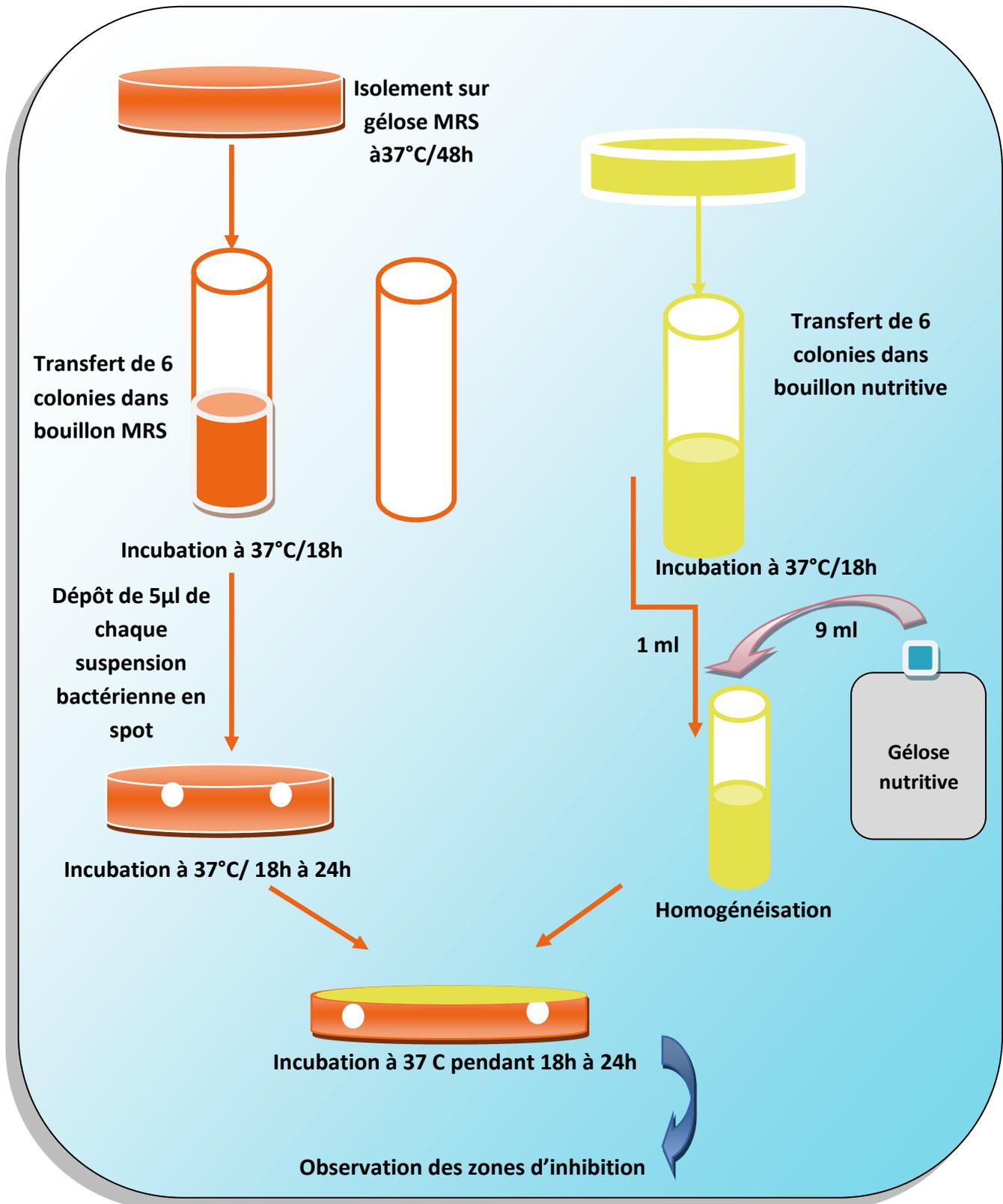


Figure 24 : Schéma de la réalisation du test d'Effet antibactérien

Chapitre III

Résultats et Discussion

I. Résultats et interprétation

1. Résultats d'isolement et de purification

L'isolement et la purification des souches prélevées à partir de 6 échantillons du lait de chèvre provenant de deux régions différents (ALGER/BLIDA), sur bouillon et gélose MRS (ensemencement par strie) a permis d'obtenir 15 isolats purs répondant aux caractéristiques des lactobacilles. Les colonies sont d'un aspect (couleur, taille et forme) typique et homogènes, ils ont été gardés pour la suite de l'étude.

2. Résultats d'identification

L'identification des souches appartient au genre *Lactobacillus* a été étudiée selon les caractéristiques morphologiques, biochimiques (test de catalase, production de gaz, fermentation des sucres), physiologiques (croissance à différentes températures, différentes concentration de NaCl et croissance à différents pH), et technologiques (la thermorésistance à 60.5°C, l'activité protéolytique et l'effet antimicrobien).

2.1. Résultats de l'étude des caractères morphologiques

2.1.1. L'aspect macro et microscopique

➤ Aspect macroscopique

Sur milieu MRS solide, les cultures obtenues des isolats, apparaissent sous différents aspects macroscopiques. Nous avons remarqué des colonies lenticulaires de couleur jaune claire et marron, des colonies rendent parfois bombées de couleurs blanchâtres et transparentes soit de tailles différentes avec une surface lisse ou crémeuse, parmi lesquelles on trouve des colonies à contour régulier (**Figure 25**).

La croissance des bactéries en bouillon, se traduit par une voile microbienne. Chez les cultures pures un précipât microbienne apparait au fond des tubes avec une zone clair au-dessus duquel (**Figure 26**).

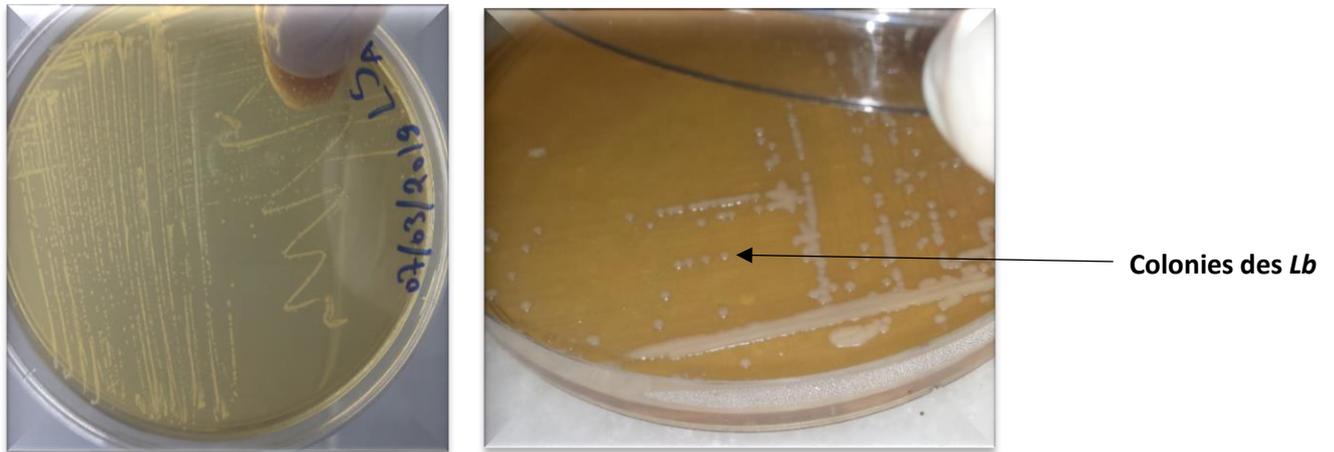


Figure 25 : Aspect macroscopique des isolats sur gélose MRS à l'œil nu.

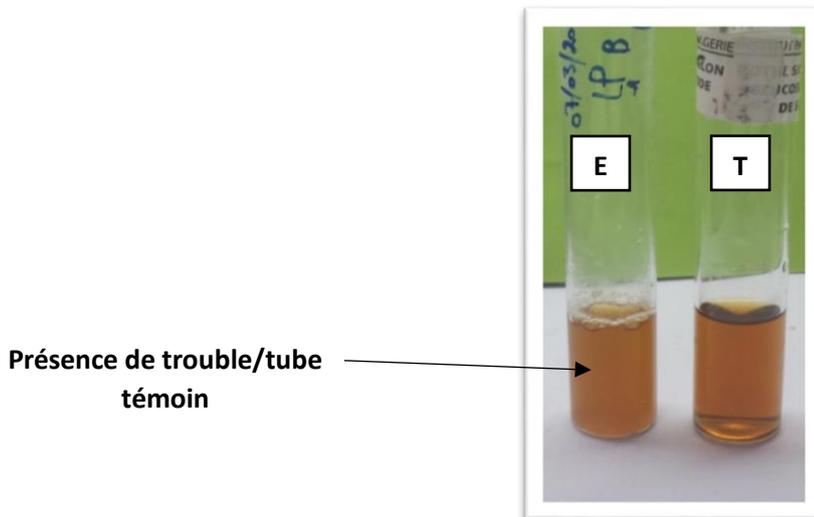


Figure 26: Aspect de culture pure sur bouillon MRS (T : témoin ; E : ensemencé)

➤ Aspect microscopique

L'étude microscopique repose sur les critères de la coloration de Gram : le Gram positif ou négatif, la forme (bacille, coccobacille, cocci ...) et le mode d'association (grappe, chaînette, diplocoque, tétrade...).

Après la coloration de Gram, l'observation microscopique au (Gx10), (Gx40) et (Gx100) avec l'huile à immersion, nous a permis de déterminer le type de Gram des isolats retenus (Gram positif) et qu'ils apparaissent généralement sous formes coccobacille, libre ou en chaînette. Certaines formes des bactéries isolées sont représentées dans les figures suivantes (Figure 27).

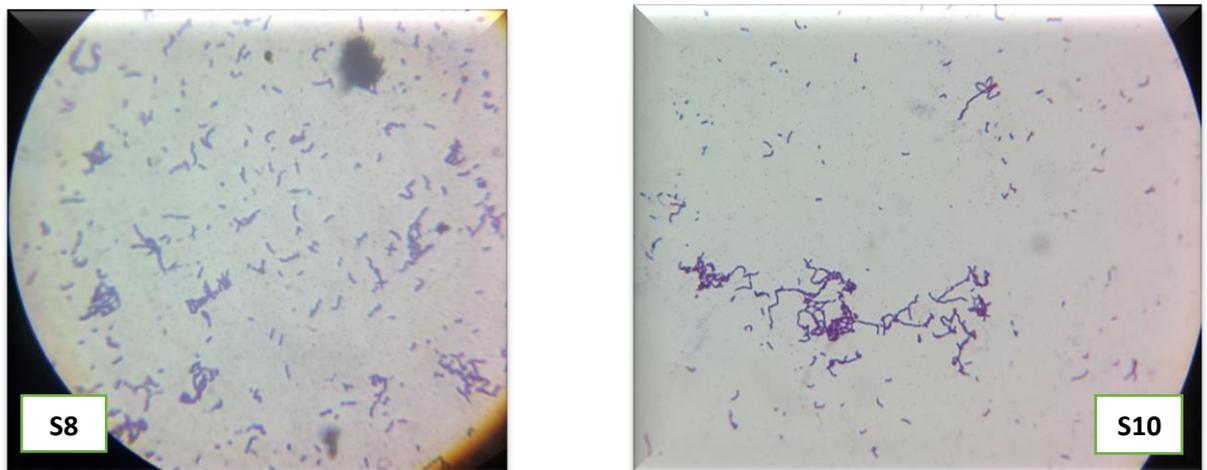


Figure 27 : Aspect microscopique de deux souches lactobacilles S8 et S10 (grossissement $\times 100$).

3. Résultats des tests des caractères biochimiques

3.1. Résultat de test de catalase

Les 15 souches isolées, ont été retenues pour la recherche de la catalase. Sur 15 isolats de bacilles, 12 souches sont catalase négative (absence défervescence) (**Figure 28**). Ce qui nous laisse déduire que les souches isolées sont des *lactobacilles*.

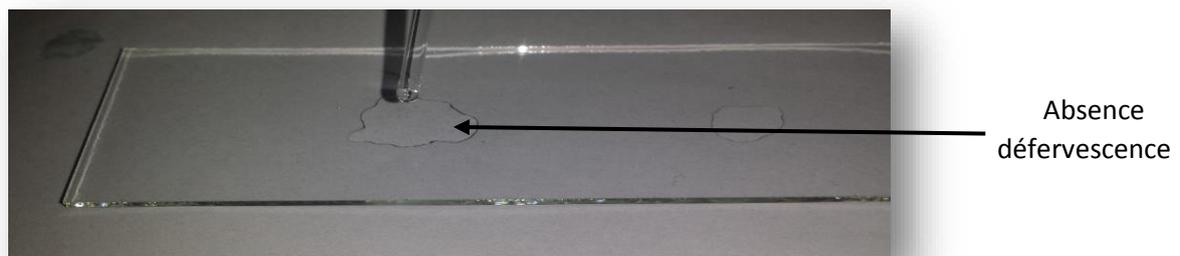


Figure 28 : Exemple d'un résultat négatif du test de catalase.

Toutes les souches catalase positives (S6,S13,S15) ont été éliminées, seule 12 souches à catalase négative sont retenues et conservées pour la suite de l'étude. Les résultats microscopiques des souches correspondent à ceux du genre *Lactobacillus* (**Tableau 9**).

Tableau 9 : Résultats de l'étude microscopique des souches retenues.

Code	Gram	Forme et mode d'association
S1	+	Coccobacille en chaînette/libre
S2	+	Coccobacille en chaînette
S3	+	Coccobacille libre
S4	+	Coccobacille en chaînette/libre
S5	+	Coccobacille en chaînette
S6	+	Coccobacille
S7	+	Coccobacille en chaînette/libre
S8	+	Coccobacille en chaînette
S9	+	Coccobacille libre
S10	+	Coccobacille en chaînette
S11	+	Coccobacille libre
S12	+	Coccobacille en amas/libre
S13	+	Coccobacille
S14	+	Coccobacille chaînette /libre
S15	+	Bacille

(+) : positive ;(-) : négative.

3.2. Résultat de test de Production du gaz

Ce test permet de différencier les isolats homolactiques et hétérolactiques après une incubation à 37°C pendant 24 heures jusqu'à 48 heures (Figure 29).

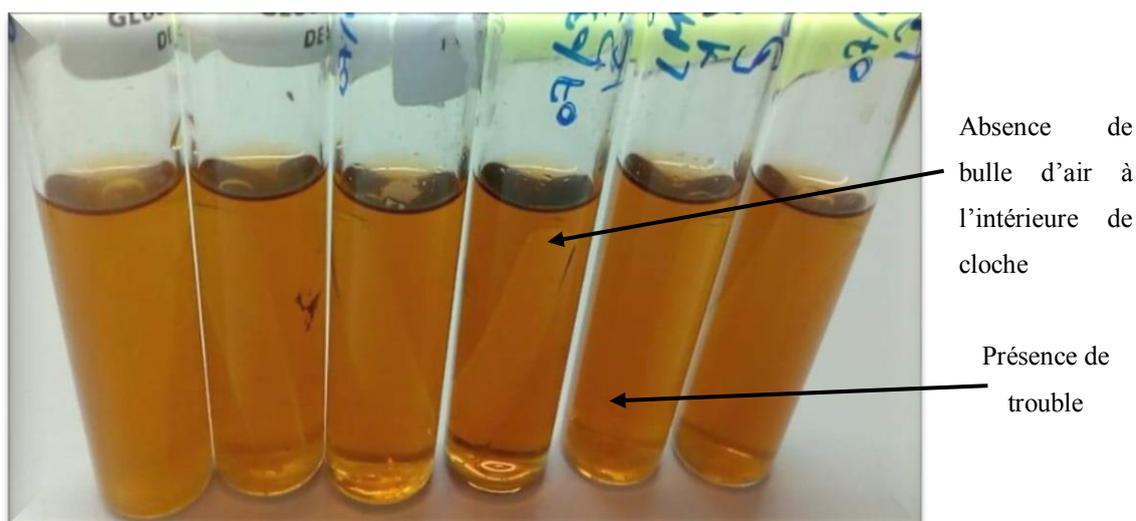


Figure 29 : Résultat du Test de production de gaz

D'après nos résultats, la répartition selon le type fermentaire était inégale entre les souches. 11 sur 12 sont homofermentaires représentant presque totalité contre une souche (S12) hétérofermentaire.

3.3. Résultat de test de fermentation des sucres

La détermination des genres et des espèces bactériennes, réside essentiellement dans leur capacité à fermenter les sucres en acide lactique et autres acides organiques.

L'analyse des profils fermentaires, révèle une diversité métabolique des isolats retenus vis à vis des carbohydrates. Les souches S1, S3, S7 ont la capacité de fermenter les quatre sucres utilisés dans notre étude (maltose, saccharose, fructose et L-arabinose). Les souches S2 et S4 fermentent tous les sucres sauf le L-arabinose. Le Maltose n'est pas fermenté par les souches S5, S9, S11, S12 et S14, et les souches S8, S10 fermentent que le fructose et L-arabinose (Tableau 10, Figure 30).

Tableau 10 : Profile fermentaire des isolats

	S1	S2	S3	S4	S5	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S14
Maltose	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Saccharose	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L- arabinose	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+

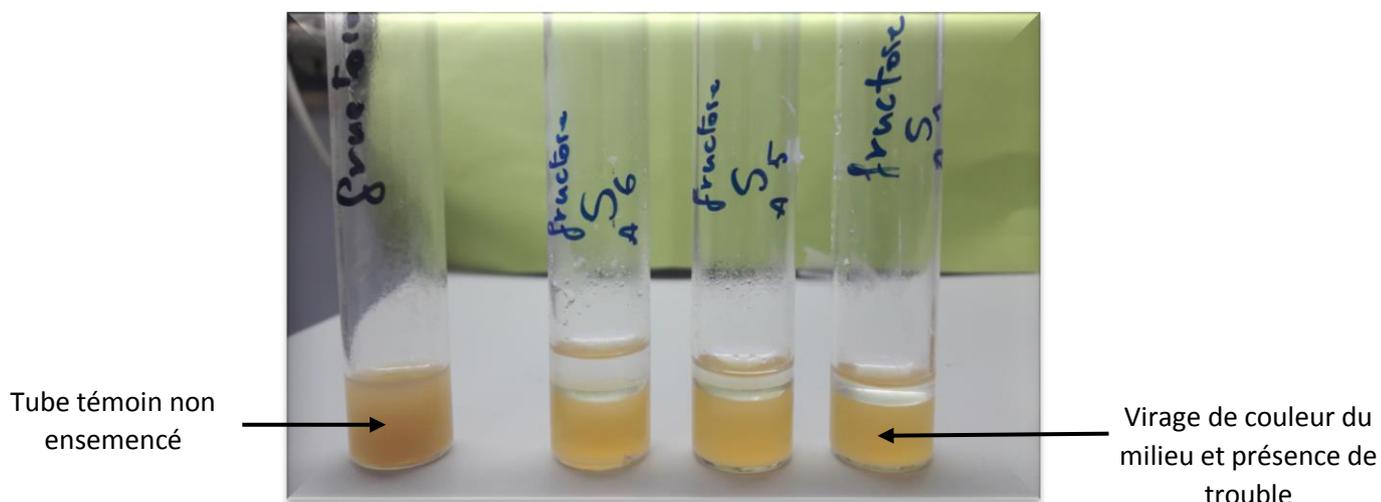


Figure 30: Exemple de résultat positif du test de fermentation des sucres.

Cependant, le nombre de sucres utilisés ne permet pas de déterminer l'espèce des souches étudiées.

4. Résultats de l'étude des caractères physiologiques

4.1. Résultats de Croissance à différentes températures

Ce test permet de faire la différence entre la flore thermophile et mésophile. La croissance des isolats a été testée à 15°C, 37°C et 44°C.

Nos résultats montrent que la majorité des souches testées sont signalées mésophile, elles poussent bien à 15°C et 37 après 48h d'incubation sauf la souche S1 qui est incapable à se développer à 15°C. Les souches S1, S3, S4, S5, S7, S8 sont incapable à se développer à 44°C (Tableau 11, Figure 31).

Tableau 11 : Résultats du test de croissance à différentes températures.

Souches		S1	S2	S3	S4	S5	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S14
Température	15 °C	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	37 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	44 °C	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

(+) : positive, (-) : négative

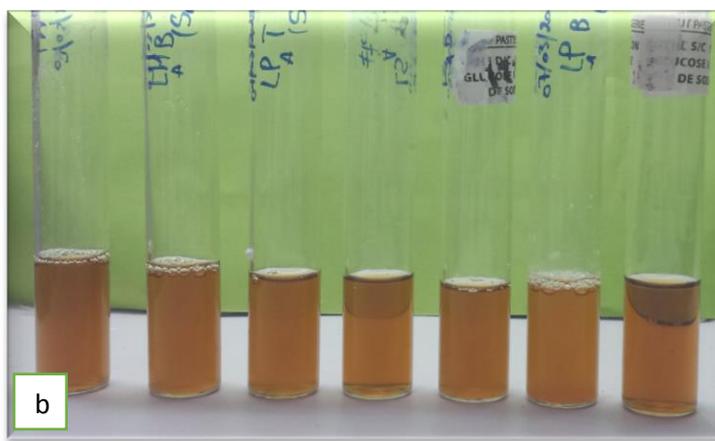


Figure 31 : Exemple de résultat positif du test de croissance à différentes températures : (a) T = 15°C, (b) T= 44°C.

L'emploi des tests (croissance à différentes températures, recherche du type fermentaire) nous ont permis d'établir une pré-identification pour les souches, nous avons subdivisé ces dernières en deux groupes (**groupe 1 : homofermentaires et hétérofermentaires, groupe 2 : mésophiles et thermophiles**).

4.2. Résultats de croissance à différentes concentration de NaCl

Les lactobacilles, isolés dans notre travail, ont montré des comportements très différents vis-à-vis de leur sensibilité aux différentes concentrations de NaCl.

Les résultats obtenus montrent que les souches S5 et S7 présentent une très bonne croissance en 2% de NaCl, les souches S9 et S5 en 4% de NaCl et la souche S7 en présence de 10% de NaCl. En présence de 6.5% de NaCl, seulement les souches S2,S3, S4, S5 et S7 qui présentent une croissance, comparativement aux souches S1, S8, S9, S10, S11, S12 et S14 qui ont montré une incapacité à croître à ce taux (**Tableau 12, Figure 32**).

Tableau 12 : Résultats du test de croissance à différentes concentration de NaCl.

Souche		S1	S2	S3	S4	S5	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S14
Concentration	2%	-	-	-	-	+++	+++	-	+	-	-	+	-
De	4%	-	-	-	+	++	+	-	+++	-	+	-	-
NaCl	6.5%	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	10%	-	+	-	-	-	+++	-	+	+	-	-	-

(+) : positive, (-) : négative

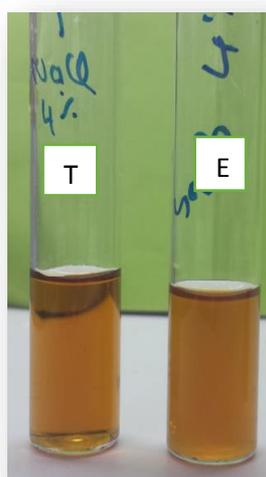


Figure 32 : Exemple de résultat positif du test de Croissance à différentes concentration de NaCl (T : témoin, E : échantillon).

4.3. Résultats de croissance à différents pH

La mise en culture des souches à pH 4, 5, 9.6 nous a permis d'évaluer leurs aptitudes à croître Aux différentes PH. À pH 4, la croissance diffère d'une souche à une autre, une croissance moyenne à pH=4 pour les souches S7 et S9, et les souches S1, S3, S4, S5, S8, S11, S12 et S14 ont présenté une légère croissance, par contre les souches S2 et S10 ne présentent aucune croissance. A ph 5, seulement les souches S4 et S9 ont donné une croissance sur milieu MRS comparativement aux souches S1, S3, S7, S8, S9, S12 et S14 qui croient à pH= 9.6 (Tableau 13, Figure 33).

Tableau 13: Résultats du test de croissance à différentes pH.

Souche		S1	S2	S3	S4	S5	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S14
PH	4	+	-	+	+	+	++	+	++	-	+	+	+
	5	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
	9.6	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+

(+) : positive, (-) : négative

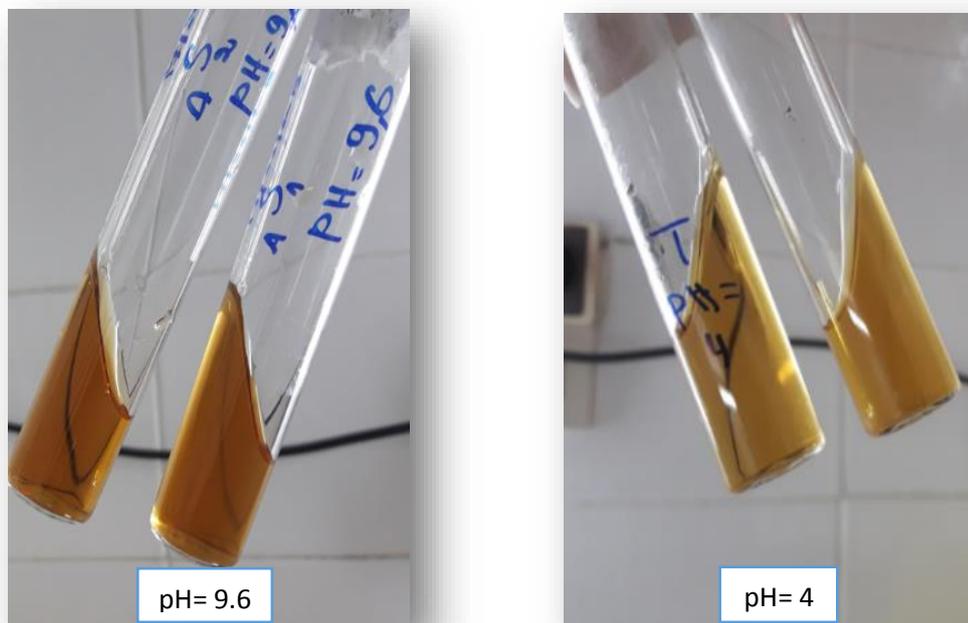


Figure 33 : Résultat du test de croissance à pH 4 et pH 9.6.

5. Résultats de l'étude des caractères technologiques

5.1. Résultats de test de thermorésistance

D'après les résultats de thermorésistances. La moitié des souches sont thermorésistantes, révélée par une croissance sur bouillon MRS après un traitement thermique pendant 30 minutes à 60,5°C (**Figure 34**).

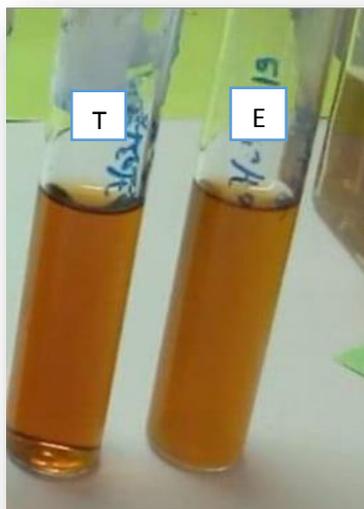


Figure 34: Résultat de la thermorésistance (T: témoin, E: échantillon)

5.2. Résultats de l'activité protéolytique

Aucunes souches ne possèdent une activité protéolytique dans le milieu MRS à 1 et à 2% de lait écrémé (pas de zone clair autour des spots).

5.3. Résultats de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des souches de lactobacilles a été étudiée par la technique des spots contre un groupe de germes pathogènes : *Escherichia coli* ATCC 25912, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas sp* ATCC 27812, *Bacillus cereus*. D'après nos résultats, les Lb possèdent un spectre d'activité inhibiteur très important et varié. L'effet inhibiteur des *Lactobacillus* a été déterminé par la mesure des zones d'inhibition (en mm). Les résultats sont représentés dans le **tableau 14**.

Tableau 14. Résultats des diamètres des zones d'inhibitions des lactobacilles en (mm).

Souches <i>Lb</i> Souches pathogènes	S1	S2	S3	S4	S5	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S14
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25912	15	18	18	15	15	15	-	-	15	15	8	-
<i>Proteus mirabilis</i>	3	35	3	-	25	28	25		3	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-	25	3	28	17	15	-	-	35	13	15
<i>Pseudomonas sp</i> ATCC 27812	-	-	35	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	15	45	-	3	-	-	-	-	35	2	-

(-) absence d'activité antimicrobienne, diamètre = 0.

➤ *Escherichia coli*

Les résultats montrent que neuf souches (S1, S2, S3, S4, S5, S7, S10, S11, S12) possèdent une activité antimicrobienne contre *Escherichia coli* ATCC 25912, dont le diamètre de la zone d'inhibition varie entre 8 à 18 mm enregistrés respectivement par S12 et S2 / S3 (figure 35,36).

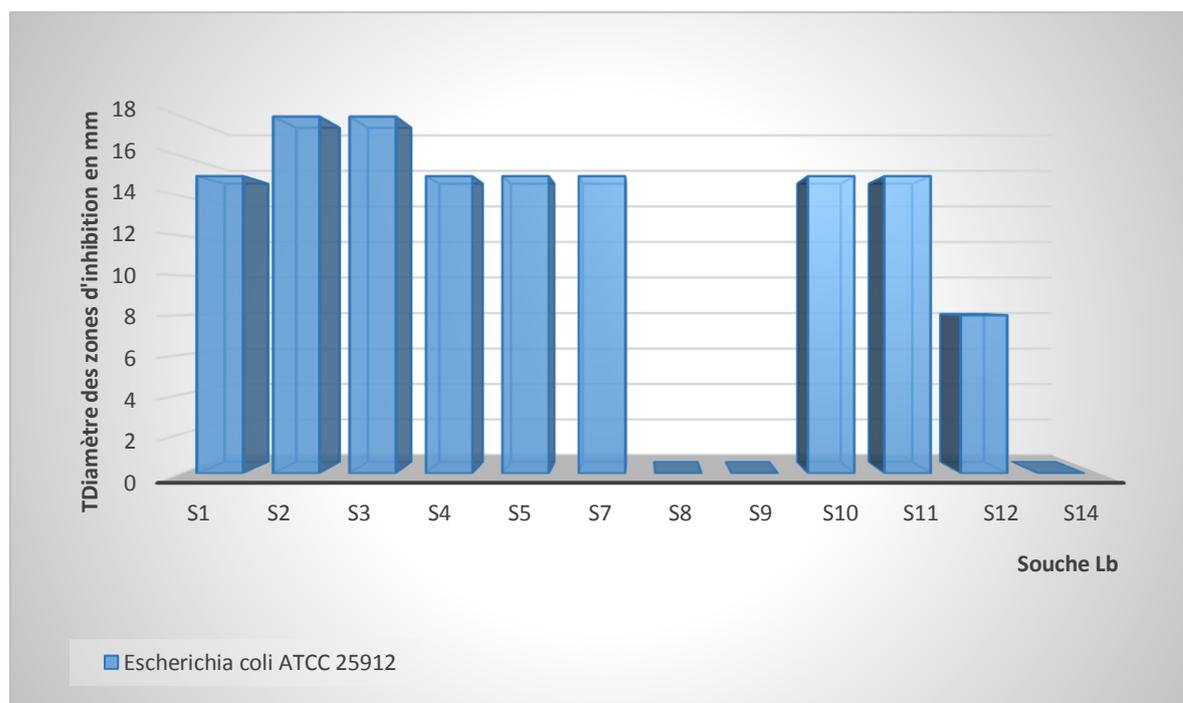


Figure 35 : Résultat de l'effet antimicrobien de *Lb* sur *Escherichia coli* ATCC 25912.

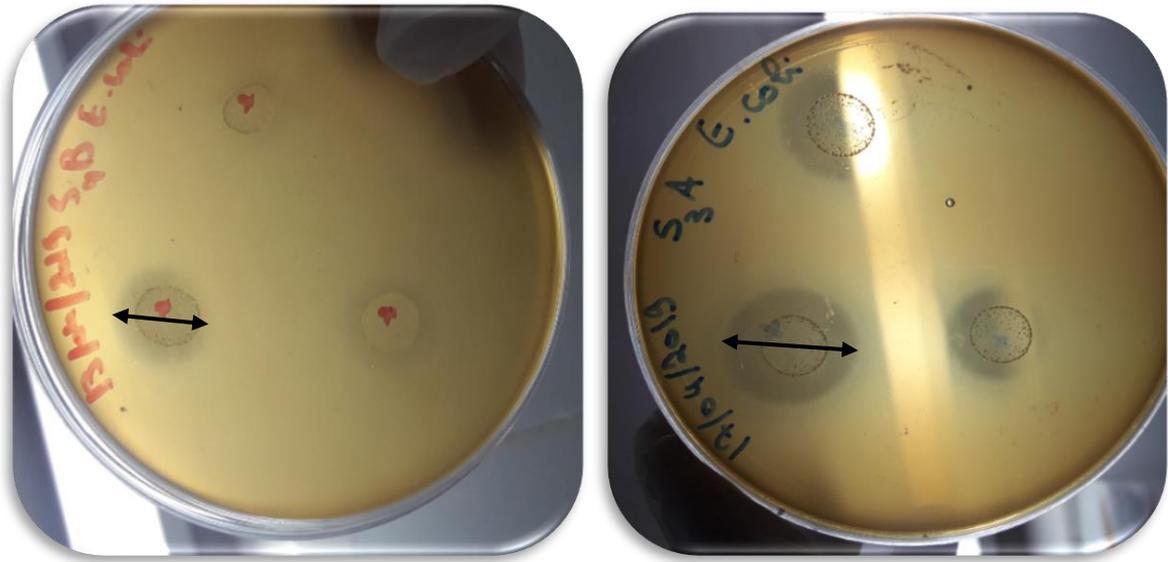


Figure 36 : Observation de la zone d'inhibition de l'activité antibactérienne de *Lactobacillus sp* vis-à-vis *Escherichia coli* ATCC 25912.

➤ *Pseudomonas sp*

Seule la souche S3 a montré une activité contre *Pseudomonas sp* ATCC 27812 avec un diamètre de 35 mm (figure 37).

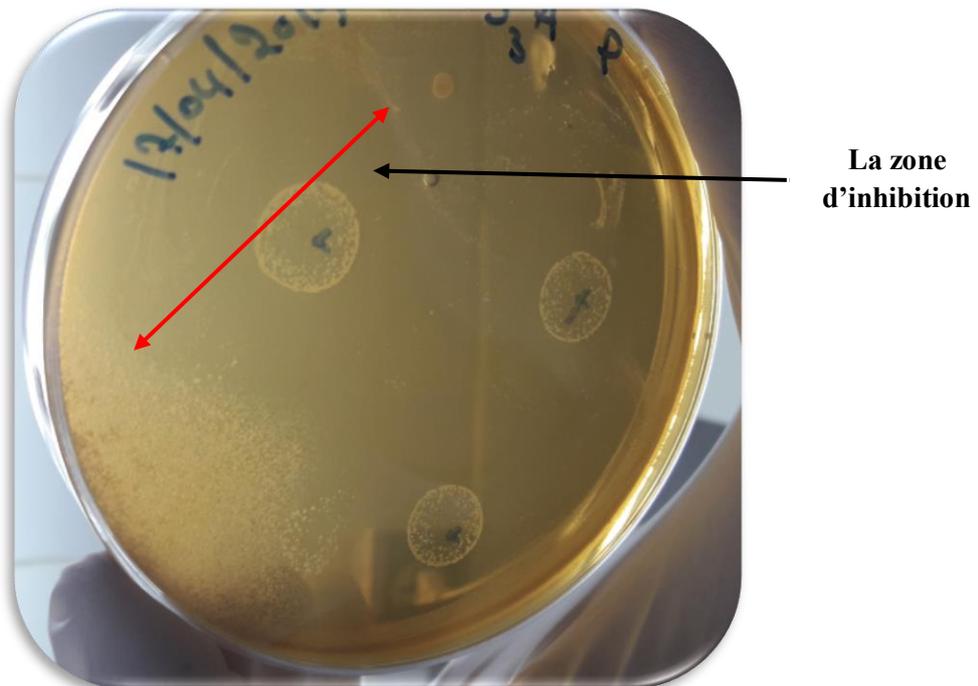


Figure 37 : Observation de la zone d'inhibition de l'effet antimicrobien de *Lb* sur *Pseudomonas sp*.

➤ *Proteus mirabilis*

Un diamètre maximal de 35 mm a été obtenu avec la souche S2 à l'égard de *Proteus mirabilis*. La souche S7 vient en deuxième position avec un diamètre de 28 mm. Un diamètre de 25 mm a été observé par les souches S5 et S8, et de 3 mm par les souches S1, S3 et S10 (figure 38,39).

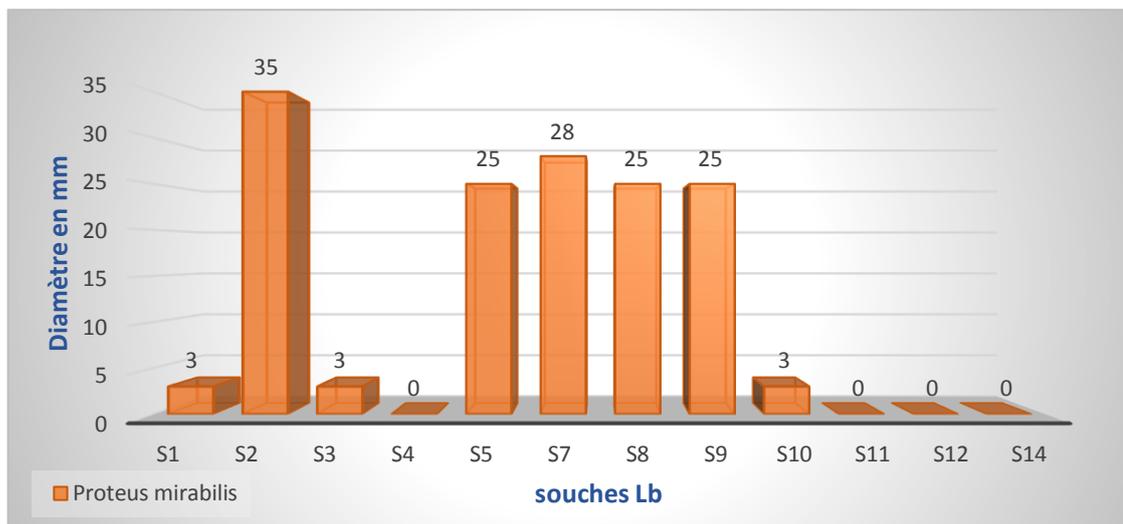


Figure 38: Résultat de l'activité antibactérienne de *Lactobacillus sp* vis- à – vis *Proteus mirabilis*

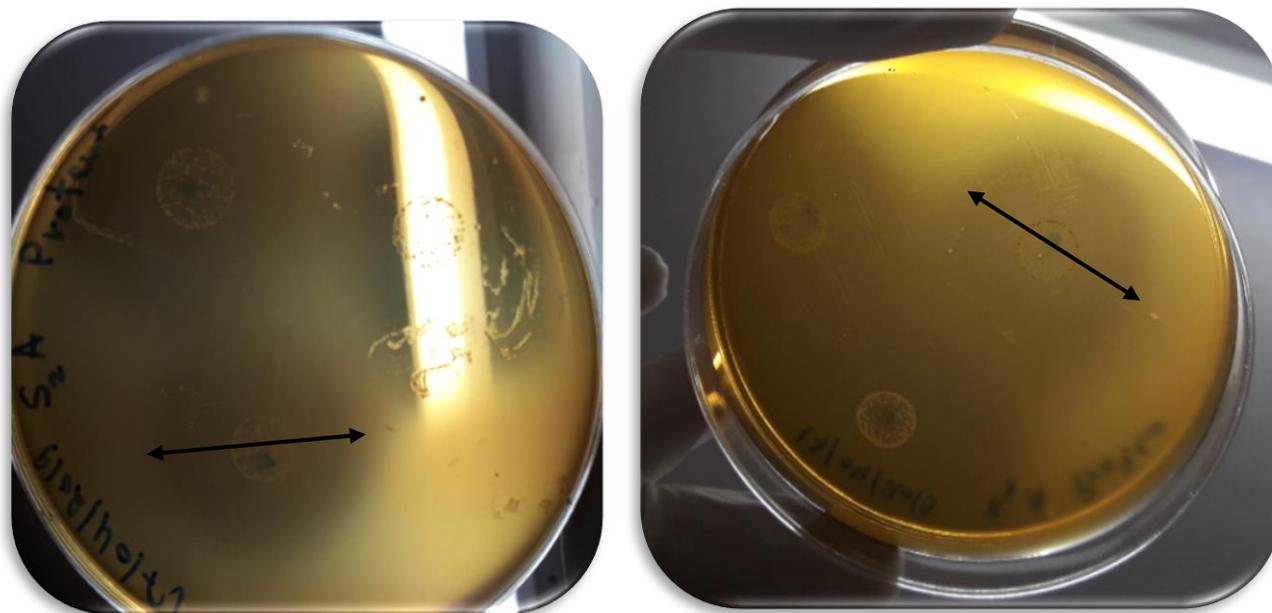


Figure 39 : Observation de la zone d'inhibition de l'activité antibactérienne de *Lactobacillus sp* vis- à – vis *Proteus mirabilis*.

➤ *Staphylococcus aureus*

Huit souches de *Lactobacillus sp* ont la capacité d’inhiber la croissance de *Staphylococcus aureus ATCC 25923* avec un diamètre qui varie entre 3 et 35 mm. Les souches S1, S2, S9 et S10 n’ont pas une activité antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus ATCC 25923* (figure 40,41).

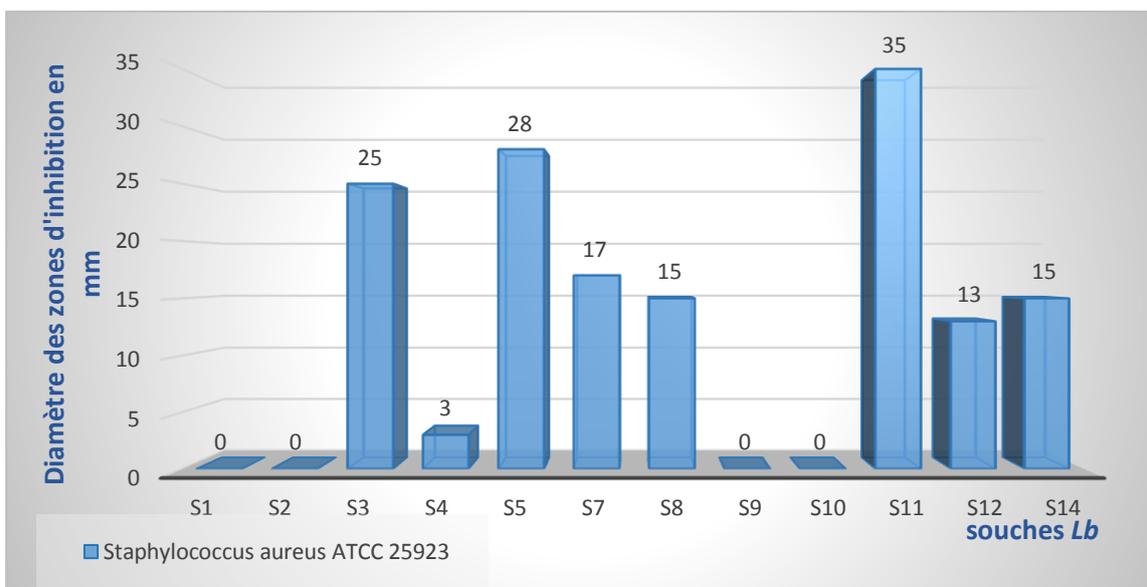


Figure 40 : Résultat de l’activité antibactérienne de *Lactobacillus sp* vis- à – vis *Staphylococcus aureus ATCC 25923*

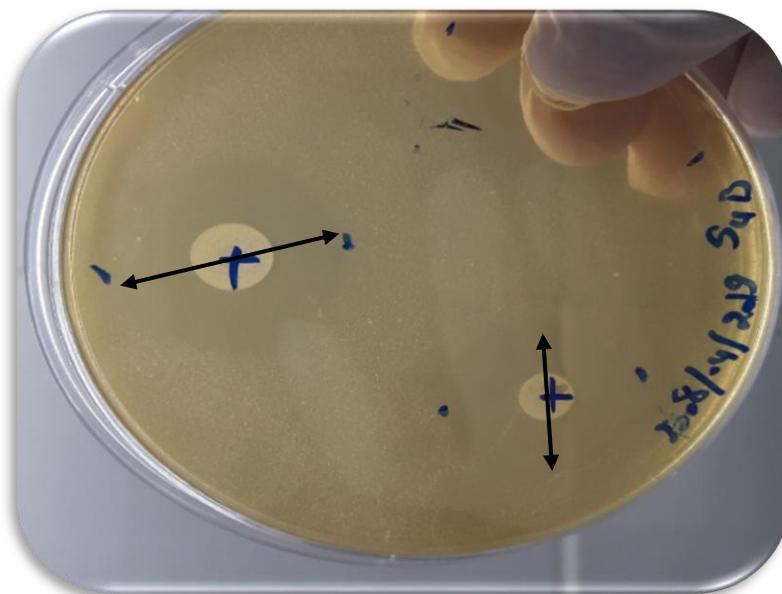


Figure 41 : Observation de la zone d’inhibition de l’activité antibactérienne de *Lactobacillus sp* vis- à – vis *Staphylococcus aureus ATCC 25923*.

➤ *Bacillus cereus*

La zone d'inhibition a été remarqué seulement par cinq souches S2, S3, S5, S11 et S12 vis – à – vis de *Bacillus cereus* avec des diamètres différents. Le faible diamètre (2 mm et 3 mm) est marqué respectivement par la souche S12 et S5. Le plus important diamètre d'inhibition est obtenu par la souche S3 vis-à-vis *Bacillus cereus* de 45 mm (**figure 42,43**).

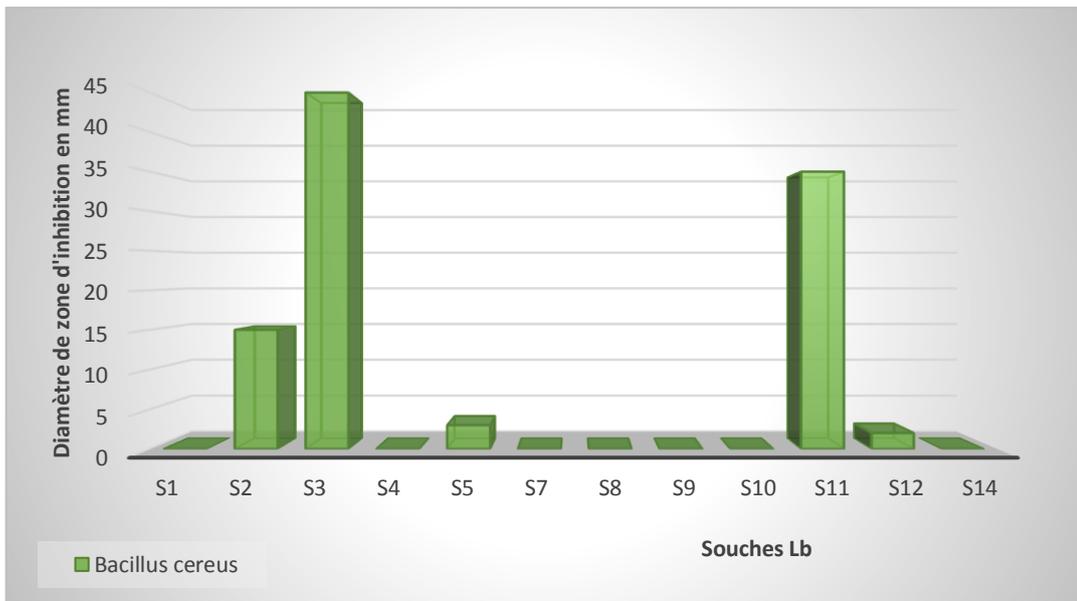


Figure 42 : Résultat de l'activité antibactérienne de *Lactobacillus sp* vis- à – vis *Bacillus cereus*.

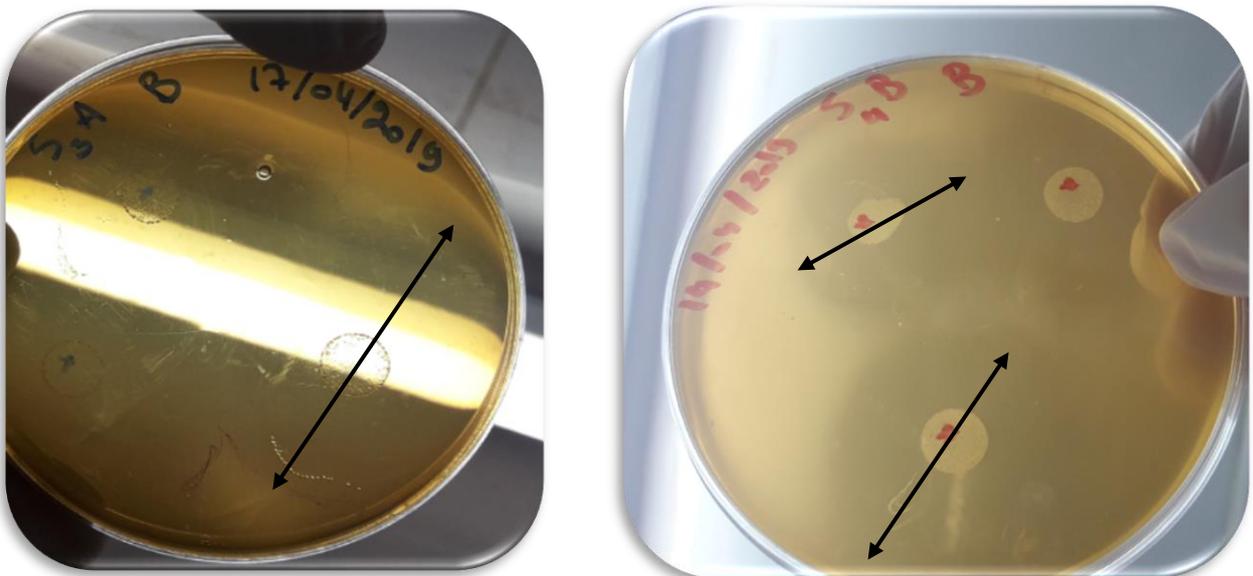


Figure 43 : Observation de la zone d'inhibition de l'activité antibactérienne de *Lactobacillus sp* vis- à – vis *Bacillus cereus*.

II. Discussion

Le lait de chèvre pourrait constituer une source intéressante d'isolement des bactéries lactiques pourvues de propriétés industrielles importantes. L'identification phénotypique des bactéries nous permet d'identifier rapidement et simultanément un nombre élevé des souches bactériennes et d'étudier leur propriété biotechnologique. elle présente un pouvoir discriminant qui s'étend du groupe à l'espèce et dans une moindre mesure à la sous-espèces et à la souche (Curk *et al.*, 1994).

Dans notre étude, l'isolement et la purification des bactéries lactiques sur milieu MRS gélosé a conduit à une collection de 15 souches. Afin de les différencier, des caractères macroscopiques, microscopiques et biochimiques ont été étudiés. L'identification du genre est d'abord orientée par la morphologie, puis par le type fermentaire et les conditions physiologiques de croissance.

Nos résultats concorde avec ceux de Sutra *et al.*, (1998), les colonies obtenus étaient circulaire ou lenticulaire de couleur blanchâtre, rugueuses ou lisse. Selon Sutra *et al.*, (1998), les colonies appartenaient via ces critères au genre lactobacillus.

D'autres examens microscopiques et biochimiques ont étaient réalisés, telle que le teste de GRAM qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne et classifier les bactéries selon le type et la forme, et le teste de catalase qui est important pour la première orientation dans l'identification d'une souche pure. Ces tests ont permis d'obtenir 12 souches à GRAM positive et à catalase négative. Selon Axelsson (1998), les lactobacilles, sont des bactéries Gram(+), Catalase (-), leur morphologie va de cocci plus ou moins allongées à des formes longues. Les 12 souches positives à la coloration de Gram et possèdent une catalase négative, de formes bacillaires et cocciques ont été retenues pour la suite de l'étude.

Après les teste d'identification microscopiques, d'autres analyses ont été effectués sur les 12 souches pour la détection des espèces. L'analyse du type fermentaire permet de diviser les souches en différents groupes selon leur métabolisme énergétiques en homofermentaires (homolactiques) ne produisant que l'acide lactique et d'autres hétérofermentaires (hétérolactiques) produisant de l'acide acétique, de l'acétaldéhyde, de l'éthanol et du dioxyde de carbone (CO₂) à côté de l'acide lactique (De Vos *et al.*, 2009 ; Nanatani *et Abe*, 2011). Le test réalisé ne détermine pas le caractère obligatoire ou facultatif du type fermentaire. Notre analyse a révélé que toutes les souches étaient homofermentaires, seule la souche S12 était

hétérofermentaires. Par ailleurs, les *Lactobacillus* retrouvés dans notre étude se subdivisent selon leur type fermentaire en deux groupes en suivant la classification d'**Orla-Jensen** remaniée par **Kandler** et **Weiss** et donnée par le **Bergey's** Manuel de la Systématique Bactérienne « les *Firmicutes* » (**De Vos et al., 2009**) en :

- *L.acidophilus*, *L. gasseri*, *L. ruminis* et *L. salivarius* sont **homofermentaires obligatoires**,
- *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. reuteri* et *L. vaginalis* sont **hétérofermentaires obligatoires**.

La détermination des espèces bactériennes réside essentiellement dans leur capacité à fermenter les sucres en acide organiques. Le teste de profil fermentaire permet de classer les souches étudiés en espèces selon leur capacité à dégrader les différents sucres. Dans notre étude 4 sucres ont été utilisés : maltose, fructose, saccharose, L-arabinose (selon leur disponibilité). L'analyse des profils fermentaires a révélé une certaine diversité métabolique chez les isolats retenus. Seul les souches S1, S3, S7 ont donné des résultats positives à tous les sucres utilisés. Notre analyse du profil fermentaire et les caractères étudiés durant notre travail était insuffisante pour pouvoir identifier les souches sélectionnées à l'échelle espèce.

L'utilisation des techniques moléculaires d'identification à travers l'utilisation des séquences d'ADN spécifiques des micro-organismes cibles est nécessaire afin de les identifier et de les dénombrer telle que l'analyse de la séquence ARNr 16S qui permet l'identification bactérienne universelle et l'analyse de la séquence du gène *rpoB* qui est un outil universel complémentaire d'identification. L'utilisation de la plaque API 50 CHL est nécessaire aussi pour différencier les espèces, puisque elle est constituée de 50 microtubes permettant l'étude de la fermentation de substrat, appartenant à la famille des hydrates de carbone et dérivés (hétérosides, polyalcools, acides uroniques) et l'identification se fait selon la composition enzymatique pour dégrader les différents sucres .

Pour but de discriminer les souches selon le caractère physiologiques, le teste de croissance à différentes températures a été réalisé. Ce test permet de faire la différence entre la flore thermophile et mésophile (**Carr et al.,2002**). Dans notre étude les résultats des souches testées concordent avec ceux de **Tailliez.,(2004)**. La plupart des lactobacilles testés se multiplient dans une gamme de températures comprise entre 15 °C et 44 °C. Selon **Carr et al.,(2002)**, les 12 souches sont signalées mésophile.

Pour la sélection des souches à des fins biotechnologiques, des tests technologiques ont été réalisés. Le teste de croissance à différente concentration de NaCl, nous a permis de déterminer les souches résistantes au stress salin. Dans notre étude seule souche S7 tolère toutes les

concentrations de NaCl. D'après **De Angelis et Gobbett., (2004)**, cette souche peut être placée au rang de microorganisme facilement inductible en industrie laitière vu que la plupart de ces paramètres sont des facteurs limitant dans le cas de plusieurs lactobacilles.

Le pH est un paramètre essentiel en terme technologique qui permet de divisé la souche en plusieurs groupes selon leur adaptation aux différentes pH. Dans notre étude les bactéries retenues ont été testés pour leur pouvoir à résister et de se croitre à différentes pH (4, 5, et 9.6). Toute les souches poussent à pH 4, sauf les souches S2 et S10 qui étaient négative aux différentes pH utilisés. D'autre part seule les souches s4 et s9 poussent à un pH 5, par contre les souches S1, S3, S7, S8, S9, S12, et S14 poussent à pH 9.6.

D'après **Federighi et al., (2005)**, les lactobacilles qui croient à pH 4 sont des acidotolérants dont de nombreuses espèces sont impliquées dans des fermentations alimentaires ,et Selon **Leveau et Bouix., (1993)**, les lactobacilles résistent à des pH acides allant jusqu'à 3,5 . Cette acidité est due à la sécrétion des métabolites de la part de plusieurs ferments lactiques dans les milieux utilisés. Les variations du ph sont reliées à des variations physiologiques tell que la température du milieu. Selon **Guillouard,et al., (2004)** , le mécanisme d'adaptation des lactobacilles est dû à la sécrétion des protéines lors du stress .Cela est confirmé par le marquage , l'extraction des protéines du milieu et l'analyse par électrophorèse .

Un autre testes technologiques de la thermo résistance a été réalisé sur les souches retenues. Les variations des températures influent d'une manière importante sur la stabilité de l'espèce bactérienne (**Kurtmann et al., 2009**). Ce test nous a permis d'obtenir 6 souches S2, S3, S7, S9, S10, S11 qui résistent à la température 60.5 et qui poussent après refroidissement direct. Selon **Klein et al (1998)**, les 6 souches obtenues appartiennent au groupe des thermobacteria.

La membrane plasmique joue un rôle essentiel dans la physiologie bactérienne en assurant l'interface entre le milieu intérieur et extérieur. Elle est le siège de nombreux transports actifs et passifs assurant l'équilibre osmotique et l'apport de nutriment à la cellule. Ces fonctions ne peuvent être assurées que si elle est dans un état fluide (**Mansilla et al., 2004**). Un changement de température (un choc ou une chute thermique), entraîne la transition d'un état fluide (désordonné) vers un état non fluide (ordonné) dont le résultat est une rigidification de la membrane. Un déséquilibre sur les fonctionnalités membranaire peut limiter la croissance bactérienne et nuire à la qualité de la production à l'échelle industrielle.

Suite au testes précédentes, nous avons réalisé un autre teste du pouvoir protéolytique, il est important à l'échelle biotechnologique et industriel. La protéolyse est l'un des processus biochimiques les plus importants impliqués dans la fabrication de beaucoup de produits laitiers

fermentés. La capacité de produire des protéinases extracellulaires est une caractéristique très importante des bactéries lactiques. Ces enzymes hydrolysent les protéines du lait, en fournissant les acides aminés essentiels pour la croissance. Il est connu que le système protéolytique des bactéries lactiques dégrade les protéines et par conséquent, change la texture, le goût et les arômes des produits fermentés (**El-Ghaish et al., 2011**). Dans notre étude toutes les souches utilisées étaient signalées négatives au test de la protéolyse.

Les bactéries lactiques produisent une variété de composés antimicrobiens qui sont utilisés dans la fermentation et la bio conservation des aliments (**Labioui et al., 2005**). Dans notre étude, le test d'activité antimicrobienne révèle l'aptitude des 12 souches de lactobacilles à inhiber un large groupe de bactéries pathogènes (*Escherichia coli* ATCC 25912, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas sp* ATCC 27812, *Bacillus cereus*). Le choix de ces espèces pathogènes est basé sur leur origine et leur action indésirable sur la santé humaine et les produits alimentaires.

D'après nos résultats, seule la souche S3 avait une action antimicrobienne sur tous les germes pathogènes utilisés avec un diamètre le plus important de 35mm vis à vis *Pseudomonas sp* ATCC 27812 et de 45mm vis-à-vis *Bacillus cereus*. La zone d'inhibition est en générale plus large lorsque on utilise *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* car les bactéries lactiques sont surtout actives sur les bactéries pathogènes à Gram positives (**O'sullivan et al., 2002**).

Les bactéries à Gram positives sont généralement plus sensibles à l'effet bactéricides des bactéries lactiques (**Biswas et al., 1991**). Dans notre étude cette activité antimicrobienne est due probablement à la synthèse des substances inhibitrices. Selon **Loso (2007)**, l'apparition des zones d'inhibitions peut être justifiée par l'effet des substances antibactériennes produites par les *Lactobacilles* comme les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyle ainsi que des substances de nature protéique comme les bactériocines. Les plus connues de ces dernières sont : la nisine, la diplococcine, l'acidophiline et la bulgaricane (**Ogunbanwo et al., 2003 ; Dortu et Thonart, 2009**). La plupart des bactériocines produites par les bactéries lactiques partagent le même mode d'action, basé sur la formation de pores dans la membrane de la bactérie cible (**Leroy, 2007 ; Kumari et al., 2009**). D'autre part les acides organiques, comme l'acide lactique, l'acide acétique ou l'acide propénoïque, élaborés lors de la fermentation des glucides, peuvent aussi inhiber des levures, des moisissures et des bactéries, tandis que le peroxyde d'hydrogène produit par les lactobacilles s'accumule dans l'environnement et peut inhiber certains microorganismes pathogènes.

Les bactéries lactiques hétérofermentaires, notamment les lactobacilles hétérofermentaire synthétisent du dioxyde de carbone comme métabolite secondaire. Son accumulation dans le milieu extérieur crée une anaérobiose qui s'avère toxique pour certains microorganismes aérobies présents dans l'aliment. Le diacétyle peut inhiber la croissance des bactéries à Gram négatif, des levures et des moisissures (**Alakomi et al , 2000 ; Ammor et al , 2006**).

Conclusion

Les bactéries lactiques sont largement utilisées dans les industries agro-alimentaires dans le but d'exploiter leur activité aromatisants et acidifiantes. On les emploie surtout dans la fabrication des fromages et de yaourts. Une autre activité a été envisagé ces dernières années sur ces germes lactiques est celle de leur capacité d'inhiber certains microorganismes indésirable. Ce qui a intéressé les chercheurs et les investisseurs afin d'augmenter la durée de conservation des produits alimentaires telle que les produit laitier par l'utilisation de ces bactéries bio conservatrices.

Au terme de notre étude qui porte sur l'isolement et caractérisation des bactéries lactiques du genre *Lactobacillus* à partir de le lait de chèvre et l'étude de leur pouvoir antimicrobien sur des souches contaminants des produits laitier, il ressort :

Qu'après isolement, purification et détermination des caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques (identification), 12 souches correspondants aux caractéristiques de lactobacilles ont était retenues. Ces dernières ont été signalées acidotolérantes, appartiennent au groupe des mésophiles et elles tolèrent aussi la température de 60.5° C. Les 12 souches étaient du type homofermentaire contre une souche hétérofermentaire. Cependant, aucune de ces souches n'étaient positives au test de la protéolyse. La présence d'une seule souche qui tolère la salinité à différente concentration nécessite de la classer comme souche performante. Les 12 souches testées avaient de bonnes fonctionnalités technologiques. Ces dernières peuvent faire l'objet d'une étude plus poussée pour être destinées à l'utilisation comme cultures starters en industrie laitière.

L'étude de l'activité antimicrobienne réalisé par la méthode des spots a permis d'avoir des résultats importants en point vue des diamètres des zones d'inhibition. Toutes les souches testées avaient des résultats importants contre au moins une souche cible. Une seule souche de *lactobacilles* (S3) qui a montré une activité antimicrobienne vis à vis de toutes les souches cibles (100%) dont l'activité la plus importante a été signalée contre *Bacillus cereus* avec un diamètre de 45mm.

D'après nos résultats, nous pourrons déduire qu'une exploitation biotechnologique de ces souches à la place des produits chimiques comme bioconservateur des produits laitiers est intéressante pour éviter les pertes des produits laitiers et assurer sa qualité à l'échelle industrielle et aussi pour minimiser les dégâts des intoxications et les problèmes de santé pour l'homme.

Cette étude reste préliminaire, Il faudrait alors en perspective :

- Etablir une identification des souches isolées en utilisant des galeries biochimiques (la galerie APIC50 CH).
- Identification génotypique des isolats
- Etudier d'autres propriétés technologiques tel que : le pouvoir acidifiant, aromatisant, texturant, épaississant...
- Élargir la gamme des germes cibles
- L'extraction et l'identification des molécules impliquées dans l'activité antimicrobienne.

Références Bibliographiques

A

- **A.P.H.A. (American public Health Association), 1992** - Standard Methods for the examination of dairy products. 16th. Ed, American public Health Association, New York. In : AZHAR MOHAMED HASAN AHMED and LUBNA MOHAMED IBRAHIM ELWY., 2015 - EFFECT OF LACTIC ACID PRODUCING BACTERIA ON SOME POTENTIAL PATHOGENS IN SAUSAGE. *Rev. Assiut Vet. Med. J.* 61(144), p 240-247.
- **Abbott S L., 2007** – Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas, and other Enterobacteriaceae. In P.R.Murray, E.J.Baron, J.H.Jorgensen, M.L.Landry & M.A. Pfaller : Ed, Manual of Clinical Microbiology (9th, pp 698-711), Washington, USA : ASM Press.
- **Abee T., Krockel L., Hill C., 1995** - Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Rev. International Journal Food Microbiology.* 28(2), p169-185.
- **Abee T., T R Klaenhammer., L Letellier., 1994** - Kinetic studies of the action of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus johnsonii* that forms poration complexes in the cytoplasmic membrane. *Rev. Applied Environmental Microbiology.* 60(3), p 1006-13.
- **Aiba Y., Suzuki N., Kabir AM., Takagi A., Koga Y., 1998** - Lactic acid-mediated suppression of Helicobacter pylori by the oral administration of Lactobacillus salivarius as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *The American Joernal of Gastroenterology.* 93(11), p 2097-2101.
- **Ait-Belgnaoui A., Iamine F., Han W., Eutamene H., Fioramonti J., Bueno L., Theodorou V., 2006** - Lactobacillus farciminis treatment suppresses stress induced visceral hypersensitivity: a possible action through interaction with epithelial cell cytoskeleton contraction. *Rev. Gut.* 55(8), p 1090-1094.
- **Alakomi H L., Skytta E., Saarela M., Mattila-Sandholm T., Latva-kala K., et Helander I M., 2000** - Lactic acid permeabilizes gram-negatif bacteria by disrupting the outer membrane. *Rev. App. Env. Microbiol.* 66(5), p 143-148.
- **Alakomi HL., Skytta E., Saarela M., Mattila-Sandholm T., Latva-Kala K., Helander IM., 2000**- Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Rev. Applied and Environmental Microbiology.* 66(5), p 2001-2005.
- **Ammor S., Rachman, C., Chaillou S., Prévost H., Dousset X., Zagorec M., Dufour E., Isabelle Chevallier I., 2005** - Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages. *Rev. food microbiology.* p 373-382.
- **AMMOR S., TAVERON G., DUFOR E., et CHEVALIER I., 2006**- Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 1-Screening and characterization of antibacterial compound. *Rev. Food Control.* 17, p 454-461.

Liste des références

- **Archer J., 2013** - Centres américains de contrôle et de prévention des maladies - Illustrateur médical.
- **Axelsson L., 2004** - Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: Salminen, S., Wright, A.V. and Ouwehand, A : Ed, Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, 3rd Edition, Marcel Dekker, New York. pp 1-67.
- **Axelsson L., 1998** - Lactic acid bacteria: Classification and physiology. *In*: Lactic acid

B

Bacteria : Ed. S. Salminen and A. von Wright. Marcel Decker. pp 1-72.

- **Badis A., Guetarni D., Kihal M et Ouzrout R., 2005** - Caractérisation phénotypique des Bactéries lactiques isolées à partir de lait de chèvre de deux populations locales "Arabia et Kabyle». *Rev. Scien &Tech. C(23)*, p 30-37.
- **Badis A., Guetarni D., Kihal M. et Ouzrout R., 2005** - Caractérisation phénotypique des Bactéries lactiques isolées à partir de lait de chèvre de deux populations locales "Arabia et Kabyle». *Rev. Sciences &Technologie. 23*, p30-37.
- **Badis A., Guetarni D., Kihal M., et Ouzrout R., 2005** - Caractérisation phénotypique des Bactéries lactiques isolées à partir de lait de chèvre de deux populations locales "Arabia et Kabyle». *Rev. Scien&Tech .C(23)*, p 30-37.
- **BenhamoucheN., 2005** - *sélection de bacteries lactiques productrices de substances antimicrobiennes de la collection du laboratoire de microbiologie appliquée (L.M.A)*. thèse pour l obtention du diplôme de magistère en microbiologie appliquée., Université d Oran. pp 1-90.
- **Benoit V., A Lebrihi., J B Milliere., G Lefebvre., 1997** - Purification and partial amino acid sequence of brevicin 27, a bacteriocin produced by *Lactobacillus brevis* SB27. *Rev. Current Microbiology. 34(3)*, p 173.
- **Bergy's manual., 2009** - Systematic of bacteriology, Second Edition, Volume three the fermicutes : Ed, springer.
- **Bernier L., 2010** - Les probiotiques en 2010 : une revue de la littérature. 2010. Thèse Pharmacie, Angers, 166.
- **Biswas S.R., Ray B.1991**-Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH from *pediococcus acitilactici* H. *Rev. Applied and Enviromental Microbiology. 57(4)*, p 1265-1267.
- **Boudie J F., et Luquet F M., 1981** - Dictionnaire laitier., Technique et documentation., Paris. p 150.
- **Bourgeois C.M. et Larpent J.P., 1996** - Microbiologie Alimentaire : Aliments fermentés et fermentation alimentaire : Ed, LAVOISIER et TEC ET DOC, Sciences et techniques agroalimentaires. p523.
- **Bourgois CM., Mescle M., et Zucca JF., 1996** - Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments.In Microbiologie alimentaire : Ed : Tec et Doc, Paris, Lavoisier. pp 139 -290.
- **Busarcevic M., M Kojic., M Dalgalarrrondo., J M Chobert., T Haertle., et L Topisirovic., 2008** - Purification of bacteriocin LS1 produced by human oral isolate

Liste des références

Lactobacillus salivarius BGHO1. *Rev. Oral Microbiology and Immunology*. 23(3), p 254-258.

- **Busarcevic, M., et M Dalgalarrrondo., 2012** - Purification and genetic characterisation of the novel bacteriocin LS2 produced by the human oral strain *Lactobacillus salivarius* BGHO1. *Rev. International Journal Antimicrobial Agents*. 40(2), p 127-134.

C

- **Carr FJ., Chill D., et Maida N., 2002** - the lactic acid bacteria : A Literature Survey. *Rev. critical reviews in microbiology*. 28(4), p 281-370.
- **Chammas, G.I., Saliba R., Béal C., 2006** - Characterization of the fermented milk—Labanl with sensory analysis and instrumental measurements. *Rev. Journal of Food Science*. 71(2), p 156–162.
- **Cheftel J.C., cheftel H., 1992** - Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. In : Ingénieurs praticiens : Ed, Tech & Doc Lavoisier, Paris. pp 43.
- **Cho IJ., Lee, NK., et Hahm YT., 2009** - Characterization of *Lactobacillus* spp. isolated from the feces of breast-feeding piglets. *Rev Journal of Bioscience and Bioengineering*, 108 (3), p 194-198.
- **Coker C., Poore C A., Li X., et Mobley H L., 2000** – Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. *Rev. Microbes and Infection / Institut Paster*. 2(12), p 1497-1505.
- **Colette Tourneur., 1972** - Aptitude à la protéolyse des lactobacilles présents dans les fromages et les lactosérums de fromagerie. *Le Lait. Rev, INRA*. 52 (513_514), p 149-174.
- **Condon S., 1987** - Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *Rev. FEMS Microbiology Letters*. 46(3), p 269-280.
- **Corrieu G., Luquet F M., 2008** - Bactéries lactiques : De la génétique au ferment, Paris : Ed, Tec et Doc . pp 849.
- **Corrieu G., Luquet F M., 2008** - bactéries lactiques de la génétique aux ferments : Ed. Lavoisier. Paris. France, pp 472 -849.
- **Cotter P D., Hill C., Ross R P., 2005** - Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Rev. Nature Reviews Microbiology*. 3(10), p 777-788.
- **Coudeyras S., Jurie G., Vermerie M., Forestier C., 2008** - Adhesion of human probiotic *Lactobacillus rhamnosus* to cervical and vaginal cells and interaction with vaginosis- associated pathogènes. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*.
- **Coveney J., Damton-Hill I., 1985** - Goat's milk and infant feeding. *Med J Aust* 143. p 508-510.
- **Curk M C., Hubert J C., et Bringel F., 1994**- *Lactobacillus paraplantarum* sp. Nov., a new species related to *Lactobacillus plantarum*, *Rev. International Journal of Systematic and Evolutionary microbiology*. 46, p 595-598.

Liste des références

D

- **Dagmara Talce-Niedra., 1936** - LA CATALASE DES BACTÉRIES D'ACIDE LACTIQUE. *Le Lait. Rev. INRA.* 16 (153), p 225-232.
- **De Angelis M et Gobbetti M., 2004** - Environmental stress responses in *Lactobacillus*. *Rev. Proteomics.* 4(1), p 106-122.
- **De Buyser M L., 1996** - Les staphylocoques. In : Microbiologie alimentaire, Tome 1 : ED, C. Bourgeois & J.F. Mescle, Technique et documentation, Lavoisier, Paris. pp 106-119.
- **De Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E., 1960-** A medium for the cultivation of lactobacilli. *Rev. J. App. Bacteriol.* 23 (1), p 130-135.
- **De Vos P., Garrity G M., Jones D., Krieg N R., Ludwig W., Rainey F A., Schleifer K.H., Whitmanet W B., 2009** - Genus *Lactobacillus*, *Bacillus* and *Listeria*. In : Bergey's manual of systematic bacteriology - The Firmicutes .Vol 3. Springer : Ed, New York. pp 19-511.
- **De Vos P., Garrity GM., Jones D., Krieg NR., Ludwig W., Rainey FA., Schleifer KH., 2009** - Une révision approfondie de l'un des travaux les plus importants en taxonomie bactérienne. In : Bergey's manual of systematic bacteriology – The Firmicutes vol 3, Springer : Ed, New York. p 108.
- **Dellaglio F., Felis GE., 2005** - Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Rev. Currents issues in intestinal microbiology.* 8(2), p 44-61.
- **Denis F., poly MC., Bengen E., Quentin R., 2007** - Bactériologie médicale, techniques usuelles : Ed, 2ème, Elsevier Masson, paris. pp 417.
- **Dennis Kunkel., 2004** – Bibliothèque Photographique de sciences et de microscopies.
- **Desmazeaud M., 1996** - L'état des connaissances en matériel de nutrition de bactéries lactiques. *Rev. Le Lait.* 63, p 267-316.
- **Djidel A. 2007** - Production d'acide lactique par *Lactococcus casei subs prhamnosus* sur jus de datte: cinétique discontinues semi-continues et continues. Thèse de doctorat, Institut National Polytechnologique de Lorraine, France. *Rev. Scientific Study & Research.*
- **Dortu C., et Thonart P., 2009** - Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires .*Rev. Biotechnology, Agronomy, Society and Environment.* 13(1), p 143-154.
- **Dortu C., Thonart P., 2009** - Les bactériocines des bactéries lactiques: caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Rev. B. A. S. E.* 13(1), p 143-154.
- **Dortu C., Thonart P., 2009** - Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Rev. Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 13(1), p 143-154.
- **Drider D. et Hevré P., 2009** - Bactéries lactiques : Ed, Economica. pp 235-240.

Liste des références

- **Drider D., Fimland G., Héchard Y., McMullen LM., Prévost H., 2006** - The continuing story of class IIa bacteriocin. *Rev. Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 70(2), p 564-582.

E

- **Eklund T., 1984** - The effect of carbon dioxide on bacterial growth and on uptake processes in bacterial membrane vesicles. *Rev. International Journal of Food Microbiology*.1(4), p 179-185.
- **El-Ghaish S., Ahmadova A., Hadji-Sfaxi I., El Mecherfi K E., Bazukyane I., Choiset Y., Rabesona H., Sitohy M., Popov Y G., A. Kuliev A., Mozzi F., Chobert J.M., et Haertlé T., 2011** - Potential use of lactic acid bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods. *Rev. Trends in Food Science and Technology*. p1-8.
- **Euzéby J P., 2010** – List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature. *Int.J .Syst. Bacteriol*.

F

- **Falgras M.E., et Makris G C., 2009** - probiotic bacteria and biosurfactants for nosocomial infection control .*Rev . Hospital infect* .71,p 301-306.
- **FAO., 1995** - Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine, FAO ,Alimentation et nutrition : Ed. Rome(Italie). p2.
- **FAO., 2007** - Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine, FAO: Alimentation et nutrition n° 28.
- **FAO/OMS., 2002** - Guidelines for the evaluation of probiotics in food.Food and 109 Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization (Organisation Mondiale pour la Santé OMS).Working Group Report. London, Ontario, Canada.
- **FAO/WHO., 2002** - Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. In : Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada, pp 1-11.
- **Federighi M., Magras C., Pilet M F., 2005** - Bactériologie alimentaire: Compendium d'hygiène des aliments. 2ème édition. Paris, p 220.
- **Felis GE., Dellaglio F., 2007** - Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Rev. Current Issues in Intestinal Microbiology*.8(2), p 44-61.
- **Flemin H P., Erchells J L., et Caslilow R N., 1975** - Microbiol inhibition on isolate *Pediococcus* from cucumber bune. *Rev. Applied and Environmental Microbiology*, 30(6), p 1040-1042.
- **Flemin H P., Erchells JL., Caslilow RN., 1975** - Microbiol inhibition on isolate *Pediococcus* from cucumber brines. *Rev Appliedl Microbiology*. 30(6), p 1040-1042.
- **Fleming H P., Etchells J L., Costilow R N., 1975** - Microbiol Inhibition by an Isolate of *pediococcus* from Brines. *Rev. Applied Microbiology*. 30(6), p 1040- 1042.
- **Fleming H.P., Etchells. J L., et Costilow R. N., 1975** - Microbiol Inhibition by an Isolate of *pediococcus* from Brines. *Rev. Applied Microbiology*. 30(6), p 1040- 1042.

Liste des références

- **Fleming HP., Etechells JL., Costilow R.N.,1975** - Microbial inhibition by an isolate of *pediococcus* from cucumber Brines. *Rev. Applied and Enviromental Microbiology*. 30(6), p 1040-1042.
- **Fredereghi M., 2005** - Les bactéries lactiques. In : « Bactériologie alimentaire, Compendium d'hygiène des aliments » : Ed, 2^e édition,Economica, Paris.France. pp 101-130.
- **FREDOT E., 2006** - Connaissance des aliments-Bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique : Ed. Lavoisier,Tec et Doc. pp 397.

G

- **Garry P F., 2010** - Procédes De Bio - Preservation. Disponible sur <https://docplayer.fr/27344187-Procédes-de-bio-preservation.html>
- **Gomes B C., M R Rodrigues., L K. Winkelstroter., A. Nomizo., et E C de Martinis., 2012** - In vitro evaluation of the probiotic potential of bacteriocin producer *Lactobacillus sakei* 1. *Rev. Journal of Food Protection*. 75(6), p 1083-1089.
- **Guessas B., 2007** - Les particularités métaboliques des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre dans le biocontrôle de *staphylococcus aureus*. Thèse pour l'obtention du diplôme de doctorat. Université d'Oran, p 1-156.
- **Guiraud G., Galzy P., 1980** - L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires : Ed, l'Usine nouvelle, 1980, Paris. p 236.
- **Guiraud J P., Rosec J P., 2004** - Pratique des normes en microbiologie alimentaire. AFNOR. p241.
- **Guiraud J.P., Rosec J.P., 2004** - Pratique des normes en microbiologie alimentaire : Ed, AFNOR .pp 241.
- **Guiraud JP., 2003** - Microbiologie alimentaire : Ed, Dunod, Paris. pp 91, 92,292.
- **Guiraud JP., 2003** - Microbiologie alimentaires : Ed, Dunod, Paris. pp 696.
- **Gusils C., Oppezzo O., Pizarro R., et González S., 2003** - *Adhesion of probiotic lactobacilli to chick intestinal mucus*. *Rev. Canadian Journal of Microbiology*. 49(7), p 472–478.

H

- **Hammers WP., Hertel C., 2009** - Genus I. lactobacillus. In: Bergey's manuel of Systematic Bactériology : Ed, Springer Sciences.Busines Media, New York, second edition, vol 3 (The firmicutes) .pp 465-511.
- **Hata T., R. Tanaka., S Ohmomo., 2010** - Isolation and characterization of plantaricin ASM1: a new bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* A-1. *Rev. International Journal of Food Microbiology*. 137(1), p 94-99.
- **Hickey M W., Hillier A J., et Jago G R., 1983** - Enzymatic activities associated with lactobacilli in dairy products. *Rev. Australian Journal of Dairy Technology*.38, p 154.
- **Hickson M., D'Souza AL., Muthu N., Rogers TR., Want S., Rajkumar C., Bulpitt CJ., 2007** - Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhoea associated

Liste des références

with 111 antibiotics: randomised double blind placebo controlled trial. *Rev. Brazilian Journal of Microbiology*. 335(7610), p 80-83.

J

- **J P Cannon., T A Lee., J T Bolanos., L H Danziger., 2005** - Pathogenic relevance of *Lactobacillus*: a retrospective review of over 200 cases. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology.4(1), p 31-40.
- **Janice Carr., 2003** - Laboratoire CDC, Biofilm, DHQP, Chelsea Samaniego Meltzer, membre EID.
- **Jeantet R., Croguennec T., Mahaut M., Schuck P., Brule G., 2008** - Les produits laitiers ,2ème édition Ed, Tec et Doc, Lavoisier.
- **Joerger M C., T R. Klaenhammer., 1990** - Cloning, expression, and nucleotide sequence of the *Lactobacillus helveticus* 481 gene encoding the bacteriocin helveticin J. *Rev. Journal of Bacteriology*. 172(11), p 6339–6347.
- **Joerger M C., et T R Klaenhammer., 1986** - Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *Rev. Journal of Bacteriology*. 167(2), p 439-46.
- **Joffin et Joffin JW., 1999** - Microbiologie alimentaire : Ed, Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine, Bordeaux. pp 132.

K

- **Kalenhammer T R., 1988** - Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Rev. Biochimie*. 70(3), p 337-349.
- **Kandler O., Weiss N., 1986** - Genus *Lactobacillus*. In : Sneath, H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G - *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* : Ed, Williams and Wilkins, Baltimore, M.D. *American Journal of Molecular Biology* . 7(2). pp 1208-1234.
- **Karin Wehrmüller et Stephan Ryffel., 2007** - produits au lait de chèvre et alimentation, Agroscope Liebefeld-Posieux Alp Posieux. *Rev, ALP actuel Suisse*.(28),p 1-3.
- **Kawai Y., T. Saito., H Kitazawa., T Itoh., 1998** - Gassericin A; an uncommon cyclic bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* LA39 linked at N- and Cterminal ends. *Rev. Bioscience Biotechnologie Biochimie*. 62(12), p 2438.
- **Kim B N., Kim N J., Kim M N., Kim Y S., Woo J H., et Ryu J., 2003** – Bacteraemia due to tribe Proteeae : a review of 132 cases during a decade (1991-2000). *Rev. Scandinavian Journal Of Diseases*. 35(2), p 98-103.
- **Klaenhammer T R., 1988** - Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Rev. Biochimie*.70(3), p 337-349.

Liste des références

- **Klaenhammer T R., Azcarate-Peril M A., Altermann E., Barrangour., 2007** - The influence of dairy environment on gene expression and substrate utilization in lactic acid bacteria. *Rev. The Journal of Nutrition Effects of Probiotics and Prebiotics.* 137, p 748-750.
- **Klayraung S., Okonogi S., 2009** - Antimicrobial and antioxidant activities of acid and bile resistant strains of *Lactobacillus fermentum* isolated from maing. *Rev. Brazilian Journal of Microbiology.* 40(4), p 757-766.
- **Klayraung S., Okonogi S., 2009** - Antimicrobial and antioxidant activities of acid and bile resistant strains of *Lactobacillus fermentum* isolated from maing. *Rev. Braz J Microbiology.* 40(4), p 757-766.
- **Klein G., Pack A., Bonaparte C., et Reuter G., 1998** - Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Rev. International Journal of Food Microbiology.* 41(2), p 103-125.
- **Klein G., Pack A., Bonaparte C., Reuter G., 1998** - Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Rev. International Journal of Food Microbiology.* 41(2), p 103-125.
- **Kostinek M., Specht I., Vinod A., Edward., Ulrich Schillinger U., Hertel C., Wilhelm H., Holzapfel., Charles M. A. P., Franza., 2005** - Diversity and technological properties of predominant lactic acid bacteria from fermented cassava used for the preparation of Gari, a traditional African food. *Rev. Systematic and Applied Microbiology,* 28. p 527–540.
- **Kumari A., Makeen K., Garg A P., Marotta F., Gupta1 C., et Divya., 2009** - Effet of the bacteriocin produced by *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCSUB202, on mode of action of *Lactococcus lactis subsp. lactis* MTCC3038. *Rev. International journal prob prebiotics.* 4(3), p1-6.
- **Kurtmann L., Carlsen CU., Risbo J., et SKibsted LH., 2009** - Storage stability of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* (La-5) in relation to water activity and presence of oxygen and ascorbate. *Rev. Cryobiol.* 58, p 175-180.

L

- **Labaoui H., Elmoualdi L., El yahiaoui M ., Ouhssine M., 2005** - Sélection de souches des bactéries lactiques antibacterienne. *Bull. Soc. pHarm. Bordeaux,* 144, pp 237-250.
- **Labioui H., Elmoualdi L., El Yachioui M., et Ouhssine M., 2005** -Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Rev .Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.* 144, p 237-250.
- **Lairini S., Beqqalil N., Bouslamtil R., Belkhoui R., et Zerrouq F., 2014** - Isolement des bactéries lactiques à partir des produits laitiers traditionnels Marocains et formulation d'un lait fermenté proche du Kéfir. *Rev. Afrique SCIENCE.* 10(4), p 267 - 277.

Liste des références

- **LAROUSSE AGRICOLE., 2002.** 767 pages.
- **Larpent J P., 1995** - Les listérioses, les Listeria et les produits alimentaires. In : Les Listeria : Ed, J.P. Larpent, Technique et documentation, Lavoisier, Paris. pp 41-53.
- **Larpent J P., 2000** - Introduction à la nouvelle classification bactérienne. Les principaux groupes bactériens. pp180.
- **Larpent J P., t Larpent G. M., 1990** - Mémento technique de microbiologie : Ed, Lavoisier, technique et documentaire, 2eme Ed. pp 417.
- **Lavermicocca P., Valerio F., Lonigro SL., Di Leo A., Visconti A., 2008** - Antagonistic activity of potential probiotic lactobacilli against the ureolytic pathogen *Yersinia enterocolitica*. *Rev. Current Microbiology*. 56(2), p 175-181.
- **Leer R J., J M van der Vossen., M van Giezen., J M van Noort., P H Pouwels., 1995** - Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Rev. Microbiology*. 141 (7), p1629-35.
- **Leroy S., Lebert I., Chacornac J P., Chevalier I., et Talon R., 2007** - Identification et caractérisation de la flore d'intérêt technologique : bactéries lactiques et staphylocoques à coagulase négative. *Rev. Sci. Tec. V. Prod. Carnés*. **25**(5), p 172.
- **Leveau J Y., et Bouix M., 1993-** Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt Industriel : Ed, Tec & dac-Lavoisier. p 170.171.181.
- **Loso A., 2007-** Chemical Composition and Antibacterial Activity Against Oral Bacteria by the Essential Oil of *Artemisia iwayomogi*. *Rev. Journal of Bacteriology and Virology*. **37**(3), p 129 – 136.
- **Louaileche H., 1998** - Lait et laits fermentés. Centre Universitaire Abderrahmane MIRA-BEJAIA Institut des Sciences de la Nature. P 3-6.
- **Luquet F-M., Corrieu G., 2005** - Bactéries lactiques et probiotiques : Ed, Lavoisier, Paris. pp 307.

M

- **Mahaut M., Jeantet R., Brulé G., et Schuck P., 2000** - Les produits industriels laitiers. Lavoisier Tec et Doc. p 178.
- **Makhloufi K M., 2012** - Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Thèse de doctorat de l'université pierre et marie curie. Spécialité, microbiologie, biochimie.
- **Mami A., 2007** - Le biocontrôle de *Staphylococcus aureus* par les bactéries lactiques du genre *Lactobacillus* isolées du lait cru du chèvre. thèse pour l'obtention du diplôme de magister en microbiologie appliqué. Université d'oran. p1-156.
- **Mansilla M C., Cybulski L E., 2004-** Control of membrane lipid fluidity by molecular thermosensors, *Rev. Journal of Bacteriology*. 186(20), p 6681-6688.
- **Marshall V M., et Cole W M., 1983** - Threonine aldolase and alcohol dehydrogenase activities in *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus* and their contribution to flavor production in fermented foods. *Rev. Journal of dairy. Research*. **50**, p 375.

Liste des références

- **Martínez-Cuesta M C., Kok, J., Herranz E., Peláez C., Requena T., Buist G., 2000** - Requirement of autolytic activity for bacteriocin-induced lysis. *Rev. Applied and environmental microbiology*. 66(8), p 3174-3179 6.
- **Matto J., Alakomi H., Vaari A., Virkajarvi I., et Saarela M., 2006** - Influence of processing conditions on *Bifidobacterium animalis* subsp *subtilis* functionality with a special focus on acid tolerance and factors affecting it. *Rev. Journal of Biotechnology*. 128(3), p 659-667.
- **Michel Lamontagne., Claud P., Champagne., Joelle Reitz- Ausseur., Sylvain Moineau., Nancy Gardner., Maryse Lamoureux., Julie Jean et Ismail Fliss ., 2002** - Microbiologie de lait In : Science et technologie de lait. Ecole polytechnique de Montréal. p 532.
- **Molin G., 2008** - *Lactobacillus plantarum* The Role in Foods and in Human Health. In : the Handbook of Fermented Functional Foods : Ed, Edward R. Farnworth, Second Edition. pp 600.
- **Moulay M., Aggas H., Benmechernene Z., Guessas B., Henni E., et Kihal E., 2006** - Cultivable Lactic Acid bacteria Isolated from Algerian Raw Goat's Milk and Their Proteolytic Activity. *Rev. World Journal of Dairy and Food Sciences*. 1 (1), p 12-18.
- **Moulay M., Aggas H., Benmechernene Z., Guessas B., Henni E., et Kihal E., 2006** - Cultivable Lactic Acid bacteria Isolated from Algerian Raw Goat's Milk and Their Proteolytic Activity. *Rev. World Journal of Dairy and Food Sciences*. 1(1), p 12-18.

N

- **Nanatani K., Abe K., 2011-** Energy generation coupled with decarboxylation reaction in lactic acid bacteria. In : *Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria: Current Progress in Advanced Research* . Sonomoto and Yokota, Caister Academic Press : Ed, Norfolk.
- **NIAID., 2002** - Institut national des maladies allergiques et infectieuses.

O

- **O'sullivan L., Ross R P., et Hill C., 2002** - Potential of bacteriocin producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Rev. Biochimie*. 84(5), p 593-604.
- **Ogunbanwo S T., Sanni A I., et Onilude A A., 2003** - Characterization of bacteriocin produced by *P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., and Holt, J. G, Bergey's manual of systematic bacteriology : 8nd : Ed.* Baltimor. pp 208-1234.
- **O'Sullivan L., Ross R P., Hill C., 2003** - Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Rev. Biochimie*. 84(5-6), p 593-604.

P

- **Patterson CA., 2008** - Probiotiques : bienfaits au-delà des fonctions nutritionnelles de base. AAFC. 1-4.

Liste des références

- **Perry JJ., Staley JT., Lory S., 2004** - Bactéries Gram-Positives: Firmicutes et Actinobacteria. In: « Microbiologie » : Ed, Dunod, Paris, France. pp 471-500.
- **Piard JC., Desmazeaud M., 1991** - Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria: Bacteriocins and other antibacterial substances. *Rev. Le lait.* 72(2), p 113-142.
- **Pilet MF., Magras C., et Federighi M., 2005** - Bactéries lactiques In Bactériologie alimentaire : compendium d'hygiène des aliments. Economica: Ed. Federighi M, pp 219-242.

R

- **Rajagopal S N., et Sandine W E., 1990** - associative growth and proteolysis of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in skim milk. *Rev. Journal of dairy Science.*73(4), p 894-899.
- **RIGHI M, 2006** - Microorganismes en action : le yaourt, PISTES, FSE, Université Laval.
- **Ronald A., 2003** – The etiology of urinary tract infection : traditional and emerging pathogens.*Rev. Disease-a-Month : DM.*49(2), p 71-82.

S

- **Saidi N., Guessas B., Bensalah F., Badis A., Hadadji M., Henni D E., Prcrost H., et Kihal M., 2002** - Caractérisation des Bactéries Lactiques Isolées du lait cru de chèvre des régions arides d'Algérie. *Journal Algérien des régions arides.* 01(1), p 01-10.
- **Samelis J., Maurogenakis F., Metaxopoulos J., 1994** - Characterization of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami. *Rev. int Food Microbiol.* 23(2), p 179-196.
- **Sampo L., Arthur C O., Seppo S., Atte V., 2011** - industrial use and production of lactic acid bacteria. in : lactic acid bacteria, microbiological and functional aspect, Marcel Dekker, third edition. p 444.
- **Savado A et Traoré, A., 2012** - La flore microbienne et les propriétés fonctionnelles des yaourts et des laits fermentés. *Rev. Journal international de sciences biologiques et chimiques.* 5(5), p 2057.
- **Schillinger U., Lücke FK., 1989** - Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolates from meat.*Rev. Applied Environmental Microbiology.* 55(8), pp 1901-1906.
- **Servin AL., 2004** - Antagonistic activity of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *Rev. Fems Microbiology Reviews.* 28(4), p 405-440.
- **Sheu BS., Wu J J., Lo C Y., Wu H W., Chen J H., Lin Y S., et Lin M D., 2002** - impact of supplement with *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* containing yogourt on triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication.*Rev. Alimentary Pharmacology and Therapeutics.*16(9), p 1669-1675.
- **Soomro A H., Masud T., Anwaar K., 2002** - Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health. *Rev. Pakistan Journal of Nutrition.* 1(1), p 20-24.

Liste des références

- **Stiles M.E., et Holzapfel E H., 1997** - Lactic acid bacteria of foods and their current applications and effects. *Rev. International Journal of Food Microbiology*. 36(1), P 1-29.
- **Sutra L., Federighi M., Jouve JL., 1998** - Bactéries lactiques. In: *Manuel de bactériologie alimentaire*. Polytechnica : Ed, Paris. France. pp 235-260.

T

- **Tailliez P., 2004** - Les lactobacilles : propriétés, habitats, rôle physiologique et intérêt en santé humaine .*Rev. Actualités microbiologiques*. p 35-41.
- **Tailliez P., 2004** - Les lactobacilles : propriétés, habitats, rôle physiologique et intérêt en santé humaine .*Rev. Actualités microbiologiques*. pp 35-41.
- **Tichaczek P S., R F Vogel., W P Hammes., 1993** - Cloning and sequencing of curA encoding curvacin A, the bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* LTH1174.*Rev. Archives of Microbiology*. 160(2), p 279-283.
- **Todorov SD., Dicks LM., 2004** - Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ST34BR, a strain isolated from barley beer. *Rev. Journal of Basic Microbiology*. 44(4), p 305-316.
- **Todorov SD., Dicks LMT., 2005**- Characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from spoiled black olives. *Rev. Journal of Basic Microbiology*.45(4), p 312-322.

U

- **U Schillinger et F K Luke., 1989** - Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Rev. Applied and Environmental Microbiology*, 55(8), p 1901–1906.
- United kingdom. pp 67-88.

V

- **Van Den Berg J C., Smith A., Pot B., Ledeeboer A M., Keresters K., Verbakel J.M.A. and Verrips C T., 1993**- Isolation, screening and identification of lactic bacteria from traditional food, fermentation processes and culture collection. *Rev. Food Biotechnology*. 7(3), p 189-205.

W

- **Wallace T. D., Bradley S., Buckley N D., Green-Johnson J H., 2003** - Interactions of lactic acid bacteria with human intestinal epithelial cells: Effects on cytokine production. *Rev. Journal of Food Protection*. 66 (3), p 466-472.
- **WGO: World Gastroenterology Organisation., 2008** - Probiotiques et prébiotiques. Recommandation pratique.
- **Whitmanet WB., 2009** - Genus *Lactobacillus*, *Bacillus* and *Listeria*. In : *Bergey's manual of systematic bacteriology - The Firmicutes* Vol 3. Springer : Ed., New York., p 19-511.

Liste des références

- **Whitmanet WB., 2009** - Genus Lactobacillus, Bacillus and Listeria. In : « Bergey's manual of systematic bacteriology .The Firmicutes » : Ed, Springer, New York. pp.19-511.
- **Wilson A R., Sigeo D., et Epton H A., 2005** - anti-bacterial activity of lactobacillus plantarum strain SKI against lister monocytogenes is due to lactic acid production. *Rev. Journal of applied microbiology* .99, p 1516 -1522.
- **Wood B J Braien., W Holzaofel., 1995** - The Lactic acid Bacteria vol 2. The genera of Lactic Acid Bacteria, Blackie Academie & Professional London.

Υ

- **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. *Rev. International Journal of Dairy Science*. 3(4), pp 194-199.

Z

- **Zamfir M., Vancanneyt M., Makras L., Vaningelgem F., Lefebvre K., Pot B., Swings J., aDe Vuyst L., 2006** - Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products. *Rev. Systematic and Applied Microbiology*. 29(6), p 487–495.
- <https://www.amazon.fr/lactobacillus-rhamnosus>

Annexe

Annexe 1

Matériel non biologique

1. Composition des milieux de culture

1.1. Composition de bouillon MRS (Guiraud, 2003)

Composant	Quantité
Peptone	10 g
Extrait de viande	10 g
Extrait de levure	5 g
Glucose	20 g
Tween 80	1 ml
Phosphate bipotassique	2 g
Acétate de sodium	5 g
Citrate d'ammonium	2 g
Sulfate de magnésium, 7H ₂ O	0,2 g
Sulfate de manganèse, 4H ₂ O	0,05 g
Eau distillée	1000 ml
pH final	6,5 +/- 0,1
Autoclaver à 120°C pendant 20 minutes	

✚ La composition de la gélose MRS : Bouillon MRS plus 15 g d'agar.

Annexe 1

1.2. composition du bouillon nutritif (Guirand, 2003)

Composant	Quantité
Extrait de viande	5 g
Peptone	10 g
Chlorure de sodium	5 g
Eau distillée	1000 ml
pH final	7,2
Autoclaver à 120°C pendant 20 minutes	

➤ La composition de **la gélose nutritive** : Bouillon nutritif plus 15 g d'agar.

1.3. Eaux physiologie (Guiraud, 2003)

Composant	Quantité
NaCl	9g
Eau distillé	1000 ml
Autoclaver à 120°C pendant 20 minutes	

1.4. Eau peptonnée g/L

- Peptone exempte d'indole 10 g
- Chlorure de sodium 5 g
- pH 7,2

Annexe 1

- Bouillon MRS sans extrait de viande et sans glucose, utilisé pour l'étude de la fermentation des sucres.
- La gélose MRS additionnée du lait écrémé (1%, 2%), utilisé pour l'étude du pouvoir protéolytique.

2. Produits chimiques, réactifs et autres :

- **Les colorants** : Violets de Gentiane, fuschine.
- **Les acides et bases** : NaOH, HCL, pour ajuster le pH des milieux utilisés.
- **Alcool et autres** : lugol, l'eau oxygénée H₂O₂, huile de paraffine (pour assurer les conditions d'anaérobiose).
- **NaCl en poudre** : utilisé pour l'étude de la croissance en présence de différentes concentrations de NaCl.
- **Les carbohydrates** : maltose, saccharose, fructose, L-arabinose, utilisés pour l'étude de fermentation des sucres.

3. Outils et appareil de la microbiologie

- Bec benzène
- Boite pétri
- Falcons (100ml, 50ml)
- Pipette Pasteur
- Lame et lamelle
- Microscope optique
- Tubes à essai
- Cloche de Durham
- Etuve d'incubation
- Réfrigérateur
- Agitateur
- Balance
- Pince
- Portoirs pour tubes

Annexe 1
