

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمار ثليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie appliquée

THEME

Présenté par :

Devant le jury :

Président(e) :,Nom et Grade

Rapporteur :,Nom et Grade

Co-Rapporteur :,Nom et Grade

Examineur(ric)e(s) :,Nom et Grade

Soutenu publiquement le :.....2018.

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمار ثليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Microbiologie appliquée

THEME

**Etude des aptitudes technologiques et probiotiques
de la souche *Lactobacillus casei* LB isolée à partir
du lait de brebis.**

Présenté par :

Mlle. Bendjemaa Nour El Houda.

Mlle. Boukhouredj Fatiha.

Devant le jury :

Président : Mr. Rahmani Mokhtar

Université Amar Télidji-Laghouat

Rapporteur : Mr. Krantar Kamel

Université Amar Télidji-Laghouat

Examineur : Mr. Gacem Mohamed Amine

Université Amar Télidji-Laghouat

Soutenu publiquement le : 20 juin 2018.

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمار ثليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Parasitologie

THEME

Présenté par :

Devant le jury :

Président(e) :,Nom et Grade

Rapporteur :,Nom et Grade

Co-Rapporteur :,Nom et Grade

Examineur(rice)s :,Nom et Grade

Soutenu publiquement le :.....2018.

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمار ثليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière :Sciences Biologiques

Option : écologie et environnement

THEME

Présenté par :

Devant le jury :

Président(e) :,Nom et Grade

Rapporteur :,Nom et Grade

Co-Rapporteur :,Nom et Grade

Examineur(rice)s :,Nom et Grade

Soutenu publiquement le :.....2018.

Dédicaces

Je dédie le fruit de mes 19 bougies d'études aux plus précieux des trésors :

Aux êtres les plus chers à mon cœur dans ce monde, mes parents en hommage à leur sacrifices. Je leur demande de me pardonner pour tous les soucis que je leur ai causés.

Que Dieu leur donne santé et longue vie.

A celui qui m'a toujours soutenu moralement et matériellement au cours de mes études, notamment au cours de mes moments difficiles, à qui j'ai éprouvé un profond respect.

« **Mon adorable père** ».

A celle qui a sacrifié tout ce qu'elle a de cher pour me prodiguer une éducation, un soutien, une assistance et un encouragement pour enfin devenir ce que je suis maintenant.

Dieu merci tout simplement la plus grande des ses fiertés. « **Ma chère mère** ».

A la mémoire de mes très chers grand parents « **Ferhat, Ahmed** » et grand-mère « **Aicha** » qui aurait été fière de ma réussite (Allah yarhamhoum inshallah).

A mes sœurs : « **Anna, Bouchra, Roumaïssa et Ikhlassa** ».

A mon grand-mère : « **Hadda benzoubir** ».

A mon chère petit-fils de la famille « **Dabdoub** » **Abd el Kader**.

A mes chères tantes (de mon père) : « **Messaouda et Fatima** ».

A mon oncle (de mon père) : **Mohamed** et sa familles : « **Fatna, Khadîdja, Hamida, Mebarka, Ahmed, Aicha, Roufaïda, Abd el Rahman** ».

A ma chère tante (de ma mère) : **Amel** et sa familles : « **Aïssa, Abdel basset, Nessrine, Khadîdja, Fatima, Hadjer** ».

A mon cher oncle (de ma mère) : **Moussa** et sa familles : « **Fatna, Ferhat, Mohamed, Abdelhamid, Abdel Rahman** ».

A tous ceux qui m'ont aidé dans mes études particulièrement : « **Kacem** ».

A toutes mes camarades de 2^{ème} année master microbiologie appliqué (2017-2018).

A tous ceux qui sont chers et que j'ai omis involontairement de citer.....

Et bien sûr Merci à **Moi-même** ^_^

Enfin à mon très chéré pays « **L'Algérie** », j'espère pouvoir être à la hauteur pour lui rendre tous ce qu'il m'a donnés et plus inshallah.

Nour el Houda

Dédicaces

A mon très chère « **Papa** » et ma très chère « **Mama** », pour leur sacrifices, leur soutien moral, Ils m'ont offert tout pour que réussisse, je ne les remercierai jamais assez pour tout ce qu'ils m'ont fait, j'espère qu'ils sont fiers de moi.

A mon très chère frère « **Lachen Boukhourdj** » de leur tendresse de leurs encouragements tout au long de mes études et durant ce mémoire.

Aux êtres les plus chère a mon cœur dans ce monde ma sœur « **Messaouda Serghini** » qui mon donné l'aide, l'amour et courage de surmonter toutes les épreuves.

A mes très chère sœurs : « **Khadija, khadra , Amina, marwa, khadra** »

A mes très chère frère : « **Hocine, Aziz, Abdou, khaled,** »

A mes enfants de ma famille : « **Haythame, Hichem, Mohamed, Rimasse, Lamisse, Rihabe, Fatna,** »

A mes très chère des amis : « **Kaltoum, Khadidja, Saida** »

Et plus particulièrement à« **bendjemaa nour el houda**», mon ami et mon binôme pour son sérieux et son soutien.

Le plus grand merci dédicace à une personne chère à mon cœur « **assia Rennane**» qui m'a beaucoup soutenue et ca de puis mon master merci et mille merci.

Fatiha

Remerciements

Avant tout nous remercions « **Allah** » tout puissant qui nous a donné le courage, la volonté, la santé, et la force pour accomplir ce modeste travail dans de meilleures conditions. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

Nous commençons tout d'abord, par remercier **Mr « Krantar Kamel »** pour avoir encadré ce travail, pour son aide, ses conseils scientifiques et sa patience et son suivi durant la période de la réalisation de ce travail malgré ses charges professionnelle. Merci de m'avoir éclairé par votre savoir, votre générosité.

Nos remerciements et notre sincère gratitude s'adressent aux membres de jury qui ont accepté de nous honorer par leur présence en tant qu'examineurs de ce modeste travail.

Le plus grand remerciement à une personne cher à mon cœur mon amies « **Kacem** » qui m'a beaucoup soutenue pour avoir toujours été là pour moi depuis le début mes études universitaires, merci pour tes conseils et ton soutien continu. Merci et mille mercis.

J'adresse aussi mes vifs remerciements à tous nos « **professeurs** » qui ont contribué à notre formation tout au long de ces cinq ans.

Je remercié beaucoup « **ma famille** » pour leurs aides durant mes études et leurs soutiens moral, encouragements et surtout leur patience pour la réalisation on de ce modeste travail.

Enfin, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué pour mener à bien ce travail.

Sommaire

Table des matières

Dédicace

Remerciements

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Résumé

Introduction.....01

I- Etude bibliographique

I.1- Généralités sur les bactéries lactiques.....03

I.1.1- Définition et caractéristiques.....03

I.1.2- Habitat03

I.2- Classification des bactéries lactiques.....05

I.3- Les principaux genres des bactéries lactiques.....09

I. 3.1- Les genres *Lactococcus* et *Streptococcus*.....09

I.3.2- Le genre *Leuconostoc*.....10

I.3.3- Le genre *Lactobacillus*.....11

I.4- Métabolisme des bactéries lactiques.....14

I.4.1- Le métabolisme des sucres.....14

I.4.2- La protéolyse.....16

I.5- Intérêts technologiques des bactéries lactiques.....18

I.5.1- Activité acidifiante (production d'acide lactique).....18

I.5.2- Activité protéolytique.....18

Sommaire

I.5.3- Pouvoir aromatisant et pouvoir gazeux.....	20
I.6- Les bactéries lactiques et les protéolytique.....	20
I.6.1-Activité bactériostatique	20

II- Matériels et Méthodes

II.1- objectif du travail	22
II.2- Lieu d'étude.....	22
II.3- Matériels biologiques.....	22
II.4- Milieux de culture.....	23
II.5- Préparation d'inoculum.....	23
II.6- Conservation des souches.....	23
II.7- Tests d'identification de la souche LB.....	23
II.7.1- Observation macroscopique.....	23
II.7.2- Observation microscopique (coloration de Gram).....	24
II.7.3- Tests biochimiques.....	24
II.7.3.1- Test de la Catalase.....	24
II.7.3.2- Type fermentaire.....	25
II.7.3.3- Croissance à différentes températures.....	25
II.7.3.4- Croissance à différents pH.....	25
II.6.3.5- Thermorésistance.....	25
II.6.3.6- Test des sucres (Galerie Api 50CHL).....	25
II.8- La mise en évidence de quelques aptitudes technologiques.....	27
II.8.1- Mesure du pH et de l'acidité totale (°D).....	27

Sommaire

II.8.2- L'activité protéolytique.....	27
II.8.3- Test de sensibilité au différent ATB	28
II.8.4- Activité antibactérienne.....	29
III- Résultats et interprétations	
III.1- Identification de la souche LB.....	31
III.1.1- Aspect morphologique.....	31
III.1.2- Aspect culturels	32
III.1.3- Test des sucres.....	33
III.2 - Résultats de sensibilité au ATB	35
III.3 - Caractérisation technologique.....	36
III.3.1- Activité protéolytique.....	36
III.3.2- Activités antimicrobiennes.....	37
III.3.3- Pouvoir acidifiant de la souche LB	38
IV-Interprétation.....	39
Conclusion	42

Références bibliographiques

Annexes

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les différents genres des bactéries lactiques utilisées dans l'industrie agro-alimentaire	5
Tableau 2 : Les différents genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques	8
Tableau 3 : Caractères de différenciation des espèces de <i>Lactococcus</i> sp. et <i>Streptococcus thermophilus</i> d'intérêt laitier	9
Tableau 4 : Les caractères distinctifs des espèces du genre <i>Leuconostoc</i>	11
Tableau 5 : Quelques caractères distinctifs des <i>Lactobacillus</i>	12
Tableau 6 : Quelques exemples de souches appartenant aux trois groupes.....	14
Tableau 7 : Provenance des souches pathogènes étudiées	22
Tableau 8 : Liste des antibiotiques testés sur la souche LB	28
Tableau 9 : Résultats des tests de la caractérisation physiologique.....	33
Tableau 10 : Résultats de la galerie Api 50CHL de la souche LB	34
Tableau 11 : Lecture de l'antibiogramme de la souche LB	35

Liste des tableaux

LISTE DES FIGURES

Figure 01 : Principales voies du métabolisme de glucose par les bactéries lactique.....	15
Figure 02 : Principale voie de dégradation des protéines de caillé au cours de l'affinage des fromages.....	17
Figure 03 : (A) Photo de la Galerie Api50CHL utilisé, (B) Légende des sucres utilisés dans la Galerie Api50CHL.....	26
Figure 04 : Aspects des colonies de la souche LB après repiquages successifs par des stries sur gélose MRS incubées 48 heures à 37°C (Grossissement 20).....	31
Figure 05 : Coloration de Gram et aspect des cellules de la souche LB sous microscopie optique (Grossissement 1000).....	32
Figure 06 : Photo de l'antibiogramme de la souche LB réalisé sur milieu MRS avec les antibiotiques (Tétracycline, Lincomycine, Ampicilline, Amoxicilline, Chloramphénicol et Erythromycine).....	36
Figure 07 : Photo présentant les zones de lyse de la souche LB sur milieu MRS caséine 1%.....	37
Figure 08 : Photo de l'interaction entre la souche LB et <i>Escherichia coli</i> et <i>Staphylococcus aureus</i>	37
Figure 09 : Evolution de l'acidité en pH et °D du MRSG fermenté par la souche LB à 37°C.....	38

Liste des figures

Liste des abréviations

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN :	Acide Désoxyribonucléique.
ADH :	Argénine Déhydrolase.
API :	Appareil Pour Identification.
ARN :	Acide Ribonucléique.
BCP :	Bromocrésol Pourpre.
BM :	Bleu de Méthylène
°D :	degré d'ornic.
EMP:	Emden Meyerhof Parnas.
G+C :	Guanine+Cytosine.
MRS :	milieu Man Rogosa et Sharpe.
sp. :	Espèce non définie.
Subsp	Sous espèce.
ufc :	unité formant colonie.
UI :	Unité International.

Résumé :

Etude des aptitudes technologiques et probiotiques de la souche *Lactobacillus casei* LB isolée à partir du lait de brebis.

Dans le cadre de la recherche de nouvelles souches pour enrichir la diversité des ferments lactiques ; les résultats obtenus dans notre travail montrent que la souche LB isolée à partir du lait de brebis appartient au genre *Lactobacillus* et présente une grande similarité avec l'espèce *Lactobacillus casei*. Elle est protéolytique et possède un pouvoir antibactérien contre les 2 souches pathogènes testées. Le diamètre des zones d'inhibition a atteint 40 mm pour *Escherichia coli*, et 17 mm pour *Staphylococcus aureus*. *Lactobacillus casei* LB convertit le glucose en acide lactique par la voie homofermentaire. Durant la fermentation lactique sur glucose en tant que seule source de carbone, la production de l'acide lactique en degré dornic et les valeurs de pH finales ont été respectivement 135°D et 4. *Lactobacillus casei* LB c'est montré sensible aux antibiotiques suivants : Tétracycline, Lincomycine, Ampicilline, Amoxicilline, Chloramphénicol et Erythromycine.

Mots clés : bactéries lactiques, *Lactobacillus casei*, acide lactique, ferments, antagonisme.

Summary:

Study of the technological and probiotic abilities of the *Lactobacillus casei* LB strain isolated from sheep's milk.

As part of the search for new strains to enrich the diversity of lactic ferments. The results of this study showed that the strain LB isolated from the ewe's milk belongs in the *Lactobacillus* genus and present a big similarity with the species *Lactobacillus casei*. This strain was proteolytic and has an antibacterial activity against the 2 tested pathogenic strains. The diameter of the inhibition zones reaches 40 mm for *Escherichia coli*, and 17 mm for *Staphylococcus aureus*. *Lactobacillus casei* LB converts glucose in lactic acid by the homolactic way. During the lactic fermentation on glucose as only source of carbon, the production of the lactic acid in degree dornic and the final values of pH were respectively, 135°D and 4. *Lactobacillus casei* LB it is shown susceptible to the following antibiotics: Tetracycline, Lincomycin, Ampicillin, Amoxicillin, Chloramphenicol and Erythromycin.

Key words: Lactic acid bacteria, *Lactobacillus casei*, lactic acid, starters, antagonism.

ملخص :

دراسة القدرات التكنولوجية والمحفزات الحيوية لسلسلة *Lactobacillus casei* LB المعزولة من حليب الأغنام.

كجزء من البحث عن سلالات جديدة لإثراء تنوع الخمير اللاكتيك. تبين النتائج المتحصل عليها في هذه الدراسة أن السلالة LB المعزولة من حليب النعجة تنتمي إلى جنس *Lactobacillus* حيث أنها تظهر تشابه كبير مع النوع *Lactobacillus casei* وهي تتميز بالخصائص التالية: هدم البروتينات ولها القدرة على تثبيط نمو سلالتين من البكتيريا الممرضة. أقطار أقراص التثبيط المتحصل عليها تأتي كالتالي: 40 مم *Escherichia coli*, 17 مم *Staphylococcus aureus*. السلالة *Lactobacillus casei* LB تحول الغلوكوز إلى حمض اللبن عن طريق التخمر المتجانس وتعطي النتائج التالية: 135 درجة حموضة بالنسبة للوسط الذي يحتوي على الغلوكوز مع قيم الأس الهيدروجيني 4 على الترتيب. *Lactobacillus casei* LB يظهر أنها عرضة للمضادات الحيوية التالية: تتراسيكلين، لينكوميسين، أمبيسلين، أموكسيسيلين، كلورامفينيكول وإريثروميسين.

الكلمات المفتاحية : البكتيريا اللبنية - *Lactobacillus casei* - حمض اللبن - خمائر - التضاد.

INTRODUCTION

Introduction

Depuis des milliers d'années, les bactéries lactiques sont utilisées pour fabriquer divers produits alimentaires fermentés, y compris des produits laitiers. Les produits fermentés renferment plusieurs souches, de genres et d'espèces différents, ayant pour point commun la production d'acide lactique.

De part leur métabolisme, les bactéries lactiques permettent d'allonger la durée de conservation des denrées alimentaires, et leur confèrent une saveur et une texture différentes. Elles peuvent aussi apporter des bienfaits au niveau santé et nutrition **(Desmazeaud, 1992)**.

Vu leur importance économique et alimentaire, les bactéries lactiques ont reçu l'attention nécessaire de la technologie industrielle notamment les industries agro-alimentaires. La recherche se dirige vers la sélection et le développement de nouvelles souches des bactéries lactiques pour la production des ferments industriels dont le métabolisme rendra le produit fini encore plus stable et attractif **(Cleveland et al., 2001 ; Drouault et Corthier, 2001)**.

L'étude de l'acidification est un élément principal pris en considération par les industriels fromagers, pour le choix des souches lactiques qui devront servir à la fabrication des fromages. D'autres caractéristiques d'une grande importance technologique devront également intervenir dans le choix de ces micro-organismes, en particulier l'aptitude à la protéolyse qui est l'une des caractéristiques intervenant lors de l'affinage des fromages **(Desmazeaud, 1992)**.

Les bactéries lactiques interviennent dans de nombreuses transformations du lait (crème maturée, laits fermentés comme le yaourt, fromages frais et affinés), mais également dans la vinification (fermentation malolactique), la fabrication des salaisons, la fermentation des végétaux (choucroute et ensilages) et en boulangerie traditionnelle. Les technologies laitières représentent toutefois le principal secteur d'application des bactéries lactiques **(Papamanoli et al., 2003)**.

Introduction

Les bactéries lactiques présentent un caractère déterminant pour leur utilisation : un important polymorphisme, qui se traduit par l'existence au sein des espèces de nombreuses souches possédant des propriétés technologiques différentes, et par l'instabilité des souches elles-mêmes. Cette variabilité, due à une organisation particulière du matériel génétique des bactéries, accroît la gamme des utilisations, mais aussi les risques d'instabilité technologique. **(François et al., 2007).**

L'utilisation des procédés de fermentation a augmenté durant ces dernières années et inclue maintenant beaucoup de types d'alimentation que ce soit pour les humains ou les animaux **(Ross et al., 1999; Schnürer et Magnusson, 2005)**. L'utilisation des ferments, d'une part, a été énormément positive en ce qui concerne la qualité du produit, mais d'autre part, elle a diminué la diversité des produits laitiers fermentés **(Cogan, 1987; Fitzsimmons et al., 1999; Scannell et al., 2001; Lee et al., 2006)**.

Puisque l'industrie laitière explore de nouvelles possibilités pour augmenter la diversité de sa gamme de produits, par l'enrichissement de leur collection de ferments lactiques.

Notre travail s'inscrit dans le cadre d'une contribution à l'enrichissement de la diversité de ces ferments en caractérisant une nouvelle souche de lactobacille isolée à partir d'un écosystème naturel, de lait brebis.

Pour atteindre cet objectif, notre travail comporte les étapes suivantes :

- L'identification de la souche lactique isolée à partir du lait de brebis.
- Evaluer quelques aptitudes technologiques de cette souche (production de l'acide lactique, diminution du pH et l'activité protéolytique).
- Evaluer quelques aptitudes probiotiques (pouvoir antimicrobien contre des germes pathogènes et résistance aux ATB).

Synthèse bibliographique

I.1- Généralités sur les bactéries lactiques :

I.1.1- Définition :

Le groupe des bactéries lactiques englobe un ensemble de micro-organismes morphologiquement hétérogène caractérisées par leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique D(-), L(+), DL. Selon **(Orla-Jensen, 1919)**, La fermentation est dite homolactique si l'acide lactique est pratiquement le seul produit formé et hétérolactique si d'autres composés sont aussi présents (acide acétique, éthanol, CO₂, etc...). D'autre part les bactéries sont dites : homofermentaires si elles empruntent dans le métabolisme glucidique la voie d'Embden Meyerhof Parnas (Glycolyse) de telle sorte que l'acide lactique soit le seul produit final, par contre, si elles réalisent la voie des Pentoses phosphate elles sont donc hétérofermentaires **(Leveau et al., 1991)**. Les bactéries lactiques présentent des caractéristiques communes qui expliquent leur regroupement.

Ce sont des bactéries Gram (+), généralement immobiles, non sporulantes, catalase et oxydase négatives et généralement nitrate réductase négative. Anaérobies facultatives, micro-aérophiles, capables de fermentation en aérobiose comme en anaérobiose, sont aussi dépourvues de cytochromes et inaptés à toute respiration aérobie ou anaérobie. Toute leur énergie vient de la fermentation. Chimio-organotrophes, poly-auxotrophes pour divers acides aminés, bases nucléiques, vitamines, acides gras. Ce qui explique leur faible capacité de biosynthèse. Alors que la majorité des souches se développent à pH 4,0-4,5, certaines sont en activité à pH 9,6 et d'autres à pH 3,2 **(Novel, 1993 ; Jozala et al., 2005)**.

I.1.2- Habitat :

Bien qu'elles servent à de nombreux procédés concernant l'industrie laitière et agro-alimentaire, les bactéries lactiques habitent de nombreux milieux qui peuvent être probablement leur réservoir naturel **(Desmazeaud, 1992; Novel, 1993)**. Les bactéries lactiques du lait proviennent de l'organisme de l'animal producteur (vaches, brebis, chèvres et chamois) ou des plantes. De nombreuses souches de *Lactococcus*, *Lactobacillus* et *Leuconostoc* ont été isolées à partir de différents laits de vaches, brebis et

Synthèse bibliographique

chèvres (Cheriguene et al, 2006 ; Chougrani et al., 2006 ; Rouissat et Bensoltane, 2006).

Les espèces du genres *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Leuconostoc*, peuvent être isolées chez l'homme, la peau et le poil des animaux, les oiseaux, des matières fécales, des poussières, de l'ensilage du foin, des grains et des ustensiles de domiciles et industriels en quantités considérable (Petransxiene et Lapied, 1981; Desmazeaud, 1992).

Les lactocoques comme les Streptocoques du groupe N non pathogènes peuvent être isolées du lait et des végétaux. *Lactococcus lactis* subsp *lactis* est facilement isolée du lait cru et des végétaux par contre *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* est exclusivement isolée du lait (Guiraud et Galzy, 1980).

Les *Leuconostocs* habitent plusieurs milieux : Lait et produits laitiers, fruits et légumes en particulier la betterave d'où leur ancien nom *Betacoccus* (Leveau et al, 1991). On les isole même des produits de panification, des solutions visqueuses dans les sucreries tandis que l'espèce *Oenococcus oeni* ne peut être isolée que du vin (Larpent et al, 1990; Novel, 1993).

Les lactobacilles sont, quantitativement, les plus importantes du groupe des bactéries lactiques. Elles sont très hétérogènes et ces diverses espèces présentent des caractères phénotypique et génotypique variés. Cette variété se reflète dans le pourcentage de G+C qui peut aller de 32 à 53%. (Falsen et al., 1999).

Les espèces mésophiles qui ont un large spectre de fermentation sont présentes dans le lait, laits fermentés, fromages, végétaux fermentés, on les isole également du vin, de la bière, des produits de panification et mêmes des viandes fraîches ou fermentées (Petransxiene et Lapied, 1981; Desmazeaud, 1992). Par contre on remarque que les espèces thermophiles qui sont caractérisées par un spectre d'acidification étroit peuvent être obtenues des laits fermentés, yaourt, lait traité par la chaleur et certains fromages à des températures dépassant 40°C (Novel, 1993).

Lactobacillus acidophilus se trouve dans l'intestin de l'homme et des animaux, par sa nature, elle résiste à des pH très bas, ainsi qu'aux sels biliaires. (Desmazeaud,

Synthèse bibliographique

1992). Enfin les espèces du genre *Pediococcus* ne peuvent être isolées qu'à partir des végétaux et rarement des vins, bières et parfois des laits fermentés (Desmazeaud, 1992; Novel, 1993).

I.2- Classification des bactéries lactiques :

Groupe hétérogène, les bactéries lactiques sont représentées par plusieurs genres d'importance différente. Deux types de morphologies se distinguent (Tableau 1) :

1/ Les cocci (0,5 à 1,5 μm de diamètre) qui comprennent les *Leuconostocs*, les *Lactocoques* et les *pediocoques* (De Roissart, 1986).

2/ Les bacilles (0,5 à 2 μm de diamètre et 1,5 à 10 μm de longueur) comprenant les *lactobacilles*.

Tableau 1 : Les différents genres des bactéries lactiques utilisées dans l'industrie agro-alimentaire (Novel, 1993).

	Cellules		Fermentation	ADN GC%
	Formes	arrangement		
<i>Streptococcus</i>	Coque	chaînes	homolactique	34-46
<i>Leuconostoc</i>	Coque	chaînes	hétérolactique	36-43
<i>Pediococcus</i>	Coque	tétrades	homolactique	34-42
<i>Lactobacillus</i>	bacille	chaînes	homo- hétéro lactique	32-53
<i>Bifidobacterium</i>	Variée	variée	acétique et lactique	55-67

Ils se distinguent en plus par leur type de fermentation qui peut être un critère de classification. On trouve :

1/ Les homofermentaires, pour lesquels l'acide lactique représente 90% du lactose fermenté. Tous les *lactocoques* et une partie des *lactobacilles* ainsi que tous les *pediocoques* peuvent être rattachés à ce groupe.

Synthèse bibliographique

2/ Les hétérofermentaires, qui fermentent le lactose en acide lactique 50 % avec production d'une importante quantité de CO₂, les leuconostocs et l'autre partie des lactobacilles appartiennent à ce groupe (**Tableau 1**).

Il y a aussi une différence si on considère le critère de la température optimale de croissance comme un élément de distinction on aura alors :

1/ Les bactéries mésophiles, ayant une croissance optimale aux températures voisines de 20°C et 30°C.

2/ Les bactéries thermophiles, avec une croissance optimale aux températures voisines de 40°C à 45°C (**Bissonnette et al., 2000**).

Cette classification peut être mieux affinée si on considère le pourcentage en base (GC%) de l'ADN des espèces qui permet de connaître l'homogénéité des genres. Le pourcentage du GC% de l'ADN montre une composition assez proche chez les genres *Streptococcus* (34-36%), *Leuconostoc* (36-43%) et *Pediococcus* (34-42%) (**Farrow et Collins, 1984 ; Schleifer et al., 1985**), par contre le genre *Lactobacillus* est caractérisé par l'hétérogénéité de ces espèces (32-53%). Chez les *Bifidobacterium* le pourcentage de GC% varie de 55 à 67% (**Scardovi, 1986**).

➤ On distingue deux types de classification :

1- Classification classique :

Elle s'appuie sur les caractères phénotypiques distinctifs de l'espèce et du genre; la première classification était donc basée sur la morphologie, la température de croissance, le mode de fermentation du glucose et la forme de l'acide lactique produit (**Orla Jensen, 1919**).

En 1957, le Bergey's Manual, a regroupé les bactéries lactiques dans la famille des *Lactobacteriaceae*, mais cette classification a été remise en question et totalement simplifiée (**Desmazeaud, 1992**).

2- Classification moderne :

Cette classification est mieux affinée car elle s'appuie principalement sur les techniques d'électrophorèse des protéines et des acides nucléiques, la définition du pourcentage GC de l'ADN, ce qui permet de définir une souche bactérienne du point de vue de la taxonomie moléculaire, et de connaître l'homogénéité des genres. La taxonomie actuelle investie le progrès de la génétique (hybridation ADN-ADN, ADN-ARN), de l'écologie (découverte des bactéries de milieux externes), elle inclue également les techniques modernes de séquençage d'ADN, de micro galeries d'identification, des banques de données informatisées (**Bugnicourt, 1995**).

Les bactéries lactiques sont un vaste ensemble des microorganismes procaryotes qui se rattachent à deux filiations généalogiques, ou phylum :

Le phylum de Clostridium, dont l'ADN des chromosomes contient un pourcentage de G+C inférieur à 50%. Ce phylum comprend le groupe des bactéries lactiques au sens strict qu'on rencontre dans les aliments, soit en forme de coque (*Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* et *Enterococcus*), soit en forme de bâtonnet (*Lactobacillus* et *Carnobacterium*).

Le phylum des Actinomycètes, dont l'ADN des chromosomes contient un pourcentage de G+C supérieur à 50%. Ce phylum comprend des genres apparentés, qu'on range souvent au sens large (*Bifidobacterium*, *Propionobacterium*).

Cependant les genres *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, et *Streptococcus*, dont le G+C% de l'ADN est inférieur à 50% peuvent être regroupés dans la branche des Clostridium avec *Bacillus* et *Clostridium* est séparé de la branche des actinomycétales au G+C supérieur à 50% et comprenant *Propionobactérium* et *Bifidobactérium* (**Kandler et Weiss, 1986 ; Stackebrandt et Goebel, 1994 ; Stackebrandt et al., 2002**).

Le rassemblement de ces 5 genres dans un même groupe est confirmé par la taxonomie moléculaire ; l'analyse de la séquence nucléotidique de leur ARN ribosomique (ARN16S) permet de réunir dans un même grand groupe phylogénétique les genres : *Lactobacillus-Pediococcus-Leuconostoc-Streptococcus-Bacillus-Clostridium-Propionobactérium-Bifidobactérium* (**Scardovi, 1986**).

Synthèse bibliographique

Le **tableau 2** regroupe les principales caractéristiques des 12 genres les plus étudiés des bactéries lactiques : *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus*, *Weissella*. Les bactéries du genre *Bifidobacterium* ne sont pas considérées comme des bactéries lactiques typiques, mais leur usage est très répandu en industrie laitière (Isolauri et al., 2001).

Tableau 2 : Les différents genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques (Dellaglio et al., 1994).

Genre	Morphologie	Fermentation	T° Opt	Habitats principaux
<i>Lactobacillus</i>	Bacilles	Homofermentaires ou Hétérofermentaires	Thermophiles ou Mésophiles	Homme Produits laitiers, carnés, végétaux ...
<i>Carnobacterium</i>	Bacilles	Hétérofermentaires	Psychrotrophes peu acidotolérants	Produits carnés, poissons, produits laitiers
<i>Lactococcus</i>	Coques	Homofermentaires	Mésophiles	Produits laitiers, végétaux
<i>Streptococcus</i>	Coques	Homofermentaires	Mésophiles ou Thermophiles	Produits laitiers
<i>Enterococcus</i>	Coques	Homofermentaires	Mésophiles	Intestin de l'homme et des animaux, produits laitiers
<i>Vagococcus</i>	Coques mobiles	Homofermentaires	Mésophiles	
<i>Pediococcus</i>	Coques en tétrades	Homofermentaires	Mésophiles	Bière, produits végétaux, saucissons
<i>Tetragenococcus</i>	Coques en tétrades	Homofermentaires	Mésophiles	Saumures
<i>Leuconostoc</i>	Coques	Hétérofermentaires	Mésophiles	Produits végétaux, produits laitiers
<i>Oenococcus</i>	Coques	Hétérofermentaires	Mésophiles	Vin
<i>Bifidobacterium</i>	Forme en Y (Bifid)	Acide acétique et lactique	Mésophiles	Intestin de l'homme et des animaux
<i>Weissella</i>	Coques	Hétérofermentaires	Mésophiles	Produite végétaux, produits laitiers

T° Opt : température optimale de développement

I.3- Les principaux genres des bactéries lactiques :

I.3.1- Les genres *Lactococcus* et *Streptococcus* :

Avant, les bactéries du genre *Lactococcus* été appelées les streptocoques mésophiles ou du groupe N (**Tableau 3**). Elles sont morphologiquement sphériques (cocci) de 0,5 à 1µm de diamètre généralement groupées en chaînes parfois en paires (diplocoque).

Tableau 3 : Caractères de différenciation des espèces de *Lactococcus* sp. et *Streptococcus thermophilus* d'intérêt laitier (**Sandine, 1988**).

Caractères	<i>Lactococcus Lactis</i>			<i>Lactococcus</i>	<i>Streptocoques</i>
	<i>lactis</i>	<i>cremoris</i>	<i>diacetylactis</i>	<i>raffinolactis</i>	<i>thermophilus</i>
Culture 10°C	+	+	+	+	-
Culture 40°C	+	+	+	-	+
Culture 45°C	-	-	-	-	+
Lait 1%BM	+	+	+	ND	-
Lait 0,3%BMα	+	+	+	-	-
NaCl 2,5%	+	+	+	+	+
NaCl 4%	+	+	+	-	-
NaCl 6,5%	v	-	v	-	-
Réductase	+	+	+	+	-
Citratase	-	-	+	ND	-
Acetoine	-	-	+	ND	-
Arginine	+	-	+	-	-
Hémolyse	□	□	□	□	α
Groupe sérologique	N	N	N	N	-

(+) = réaction positive, (-) = réaction négative, v = variable, ND = nom déterminé;

Le genre *Lactococcus* est formé de bactéries dont les cellules, en forme de coques, sont associées par paires ou en chaînettes de longueur variable. Ce sont des bactéries homofermentaires ne produisant que de l'acide lactique L (+). Ces bactéries sont thermosensibles et ne peuvent pas croître en présence de 6,5% de NaCl ou à pH 9,6. Leur

Synthèse bibliographique

température optimale de croissance s'étend de 25 à 35°C respectivement pour les souches de *Lc. cremoris* et *Lc. lactis*. Les *Lactococcus* sont capables de croître à 10°C mais pas à une température supérieure à 40°C (**Dellaglio et al., 1994**).

Par contre le genre *Streptococcus* comprend essentiellement des espèces d'origine humaine ou animale dont certaines sont pathogènes comme *S. pyogenes* et *S. agalactiae* d'autres sont impliquées dans la formation de la plaque dentaire (*S. mutans*). L'espèce thermophile *Streptococcus therhermophilus* se différencie par son habitat (lait et produits laitiers), et son caractère non pathogène. Du fait de ses propriétés technologiques, c'est la seule espèce considérée comme un streptocoque lactique (**Carr et al., 2002**).

I.3.2- Le genre *Leuconostoc* :

La famille des *leuconostocaceae*, contient des coques ovoïdes, pouvant être allongés ou elliptiques. Ce sont des cellules sphériques qui se disposent en paire ou en chaîne, elles sont caractérisées par un métabolisme hétérofermentaire en convertissant le glucose en D-lactate et éthanol ou en acide acétique par la voie de transcétolase, elles sont incapables de dégrader l'arginine ce qui les distingue des lactobacilles hétérofermentaires (**Gonzalez et al., 2000**).

On range habituellement les leuconostocs dans les anaérobies facultatifs, mais certains les considèrent comme des anaérobies aérotolérants. Ils sont exigeants et présentent souvent une auxotrophie pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels minéraux et les glucides (**Dellaglio et al., 1994**).

Ce genre comprend les espèces suivantes : *Ln. mesenteroides* avec ces sous espèce *mesenteroides cremoris* et *dextranicum* et *Ln. lactis* et *Ln. pseudomesenteroides* et *Ln. paramesenteroides* (**Collins et al., 1993**).

Les principaux critères proposés pour la différenciation des espèces et sous espèces reposent sur quelques caractères phénotypiques présentés par **Garvie, (1986)** dans le Bergey's Manual (**Tableau 4**).

Synthèse bibliographique

Tableau 4 : Les caractères distinctifs des espèces du genre *Leuconostoc* (Garvie, 1986).

Caractères	1	2	3	4	5	6
Production d'acide à partir de :						
D-xylose	+	v	-	v	-	-
Arabinose	+	-	-	v	-	v
Cellulose	v	v	-	v	-	v
Fructose	+	+	-	+	+	+
Lactose	v	v	v	v	v	-
Saccharose	+	+	-	+	+	-
Tréhalose	+	+	-	+	-	+
Hydrolyse de l'esculine	v	+	-	v	-	+
Formation de dextrans	+	+	-	-	-	-
Croissance à pH 4,8	-	-	-	v	-	+
Croissance éthanol 10 %	-	-	-	-	-	+
Acétoïne (Citrate)	-	-	+	-	-	-
G + C %	39	37	38	39	44	39
G-6 PDH (NAD)	+	+	+	+	+	-
Besoin TJF	-	-	-	-	-	+

(1) *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides* ; (2) *Leuconostoc mesenteroides* subsp.*dextranicum*, (3) *Leuconostoc mesenteroides* subsp *cremoris* ; (4) *Leuconostoc paramesenteroides* ; (5) *Leuconostoc lactis* ; (6) *Leuconostoc oenos* ; (v) Caractère variable ; (+)Caractère positive ; (-) Caractère négative ; G-6 -PDH = Glucose 6 Phosphate déshydrogénase ; TJF = Tomato juice factor (Glucopanthoténate).

I.3.3 - Le genre *Lactobacillus* :

Il regroupe de nombreuses espèces dont l'hétérogénéité est illustrée par la variation du G + C % : 32 à 53 %. Il s'agit des bacilles Gram (+) aéro-anaérobies facultatifs, sont des cellules souvent longues et étroites (0,5-1,2 µm à 1-10 µm), certaines espèces apparaissent courtes et larges, ce qui leur donne un aspect cocobacilles (**Kandler et Weiss, 1986**), elles sont pour la plus part immobiles, toute fois certains espèces peuvent présenter une mobilité par ciliature piliotriches (**Bourgeois et Leveau, 1991**).

Ce sont des souches généralement anaérobies facultatives, c'est à dire qu'elles poussent sous une atmosphère pauvre en oxygène et par conséquent leur métabolisme est fermentaire; quelques espèces sont aéro-tolérantes et peuvent utiliser l'oxygène à l'aide d'enzymes (flavoprotéine oxydase), alors que d'autres sont strictement anaérobies (**Kandler et Weiss, 1986**).

Synthèse bibliographique

Leur croissance est optimale pour une température de 30 à 40 °C et à un pH de 5,5-5,8. Cependant d'une manière générale, elles peuvent se développer à un pH inférieur à 5,0 et sur une gamme de température allant de 5–53 °C (**Hofvendahl et Hahn-Hägerdal, 2000**).

Le **tableau 5** présente quelques caractères distinctifs des espèces du genre *Lactobacillus*.

Tableau 5 : Quelques caractères distinctifs des *Lactobacillus* (**Leveau et al., 1991**).

Espèces \ Croissance	à 15°C	à 45°C.	Lactose.	sacc.	glucose	ribose	xylose	ADH
<i>Lb.delbrueckii ssp delbrueckii</i>	-	+	-	+	-	-	-	±
<i>Lb.delbrueckii ssp bulgaricus</i>	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>Lb. delbrueckii ssp lactis</i>	-	+	+	+	-	-	-	±
<i>Lb. acidophilus</i>	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>Lb. gasseri</i>	-	+	±	+	-	-	-	-
<i>Lb. crispatus</i>	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>Lb. helveticus</i>	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>Lb. plantarum</i>	+	-	+	+	+	+	±	-
<i>Lb. casei ssp casei</i>	+	-	+	±	+	+	-	-
<i>Lb.casei ssp pseudoplantarum</i>	+	-	+	+	+	+	-	-
<i>Lb. casei ssp tolerans</i>	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>Lb. curvatus</i>	+	-	±	+	+	+	-	-
<i>Lb. brevis</i>	+	-	±	±	+	+	±	+
<i>Lb. fermentum</i>	-	+	+	-	+	+	±	+
<i>Lb. Kefir</i>	+	-	+	+	+	+	-	+
<i>Lb. confusus</i>	+	-	-	+	+	+	+	+
<i>Lb. viridescens</i>	+	-	-	±	-	-	-	-

(-) : réaction négative. (+) : réaction positive.(±) réaction tardive. *Lb.*: *Lactobacillus*

De plus, ces microorganismes ont des besoins nutritifs complexes ce qui rend leur culture difficile et ces besoins vont varier d'une espèce à une autre (**Rogosa et al., 1961**; **Charalampopoulos et al., 2002**). En effet, les bactéries lactiques sont auxotrophes pour de nombreux facteurs de croissance (**Dellaglio et al, 1994** ; **Fitzpatrick et O'Keeffe, 2001**) comme ; les acides aminés, les peptides, les vitamines, les dérivés d'acides nucléiques, les sels minéraux, les esters d'acides gras et les hydrates de carbone.

Synthèse bibliographique

En 1919, **Orla-Jensen** a proposé de diviser le genre en trois sous-genres : "*Thermobacterium*", "*Streptobacterium*" et "*Betabacterium*". Cette nomenclature n'a pas été validée et retenue par les Approved Lists of Bacterial Names, et par conséquent elle n'a pas de statut dans la nomenclature.

La classification de **Orla-Jensen** ne correspondait à aucune réalité taxonomique toutefois, elle est toujours utilisée en pratique même si les noms des sous-genres sont remplacés par des qualificatifs illustrant les caractéristiques de la fermentation.

Ce genre comprend 167 espèces et 27 sous espèces selon la nouvelle classification du Bergey's Manual dont la plupart sont définies par **Orla -Jensen, 1919 (Euzéby, 1997)** On distingue trois groupes classés en fonction de leurs caractéristiques fermentaires (**Kandler et Weiss, 1986 ; Bustos et al, 2005**) (tableau 6).

Groupe 1: Les Lactobacilles homofermentaires stricts: (ancien sous-genre : *Thermobacterium*) qui utilisent le glucose grâce à la voie homofermentaire d'Embden-Meyerhof-Parnas. Leur seul produit final étant l'acide lactique (D(-), L(+) ou DL. Ils ne métabolisent pas les pentoses et ne dégagent pas de CO₂ lors de la fermentation du glucose ou du gluconate. La production en acide lactique est supérieure à 85% à partir du glucose.

Groupe 2: Les Lactobacilles hétérofermentaires facultatifs: (ancien sous-genre : *Streptobacterium*) peuvent changer de voie en fonction du substrat. Ils métabolisent le glucose en acide lactique grâce à la voie homofermentaire d'Embden-Meyerhof-Parnas et dégradent les pentoses par la voie hétérofermentaire des pentoses phosphate. Ils ne produisent pas de CO₂ lors de la fermentation du glucose, mais ils en produisent lors de la fermentation du gluconate (**Hofvendahl et Hahn-Hägerdal, 2000**).

Groupe 3: Les Lactobacilles hétérofermentaires stricts: (ancien sous-genre : *Betabacterium*) qui fermentent le glucose en acide lactique, CO₂ et acide acétique ou éthanol via la voie hétérofermentaire de la 6-phosphogluconate déshydrogénase/phosphocétolase et qui dégradent les pentoses en acide acétique et en acide lactique via la voie hétérofermentative de la glycéraldéhyde-3-phosphate/pyruvate kinase/lactate déshydrogénase.

Synthèse bibliographique

Ces bactéries produisent du CO₂ lors de la fermentation du glucose et du gluconate. La production en acide lactique est d'environ 50% avec des quantités importantes en acide acétique, éthanol et CO₂.

Tableau 6 : Quelques exemples de souches appartenant aux trois groupes (Salminen et al., 1998).

	Groupe I: Homofermentaires obligatoires	Groupe II: Hétérofermentaires facultatifs	Groupe III: Hétérofermentaires Obligatoires
Souches	<i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. delbrueckii</i> <i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. Salivarius</i>	<i>Lb. casei</i> <i>Lb. curvatus</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. sake</i>	<i>Lb. brevis</i> <i>Lb. buchneri</i> <i>Lb. fermentum</i> <i>Lb. Reuteri</i>

I.4- Métabolisme des bactéries lactiques :

I.4.1- Le métabolisme des sucres :

Les bactéries lactiques nécessitent une source d'hydrate de carbone fermentescible pour la production d'énergie cellulaire (ATP) et leur croissance. Le lactose présent dans le lait est un disaccharide composé de glucose et de galactose, atteint des concentrations de 4 à 5%. La **Figure 1** présente les principales voies de la glycolyse chez ces bactéries.

Chez les lactocoques, le transport membranaire du lactose et du glucose est assuré par le système phosphotransférase-phosphoenol pyruvate dépendant (système PEP-PTS). Le transport du galactose est effectué par le système PEP-PTS et une perméase d'affinité élevée. Suite à leur transport dans la cellule, les composés glucidiques libres ou modifiés sont catabolisés selon 3 voies; la voie glycolytique principale de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), la voie du D-tagatose-6-phosphate ou la voie de Leloir (**Desmazeaud, 1992**).

Synthèse bibliographique

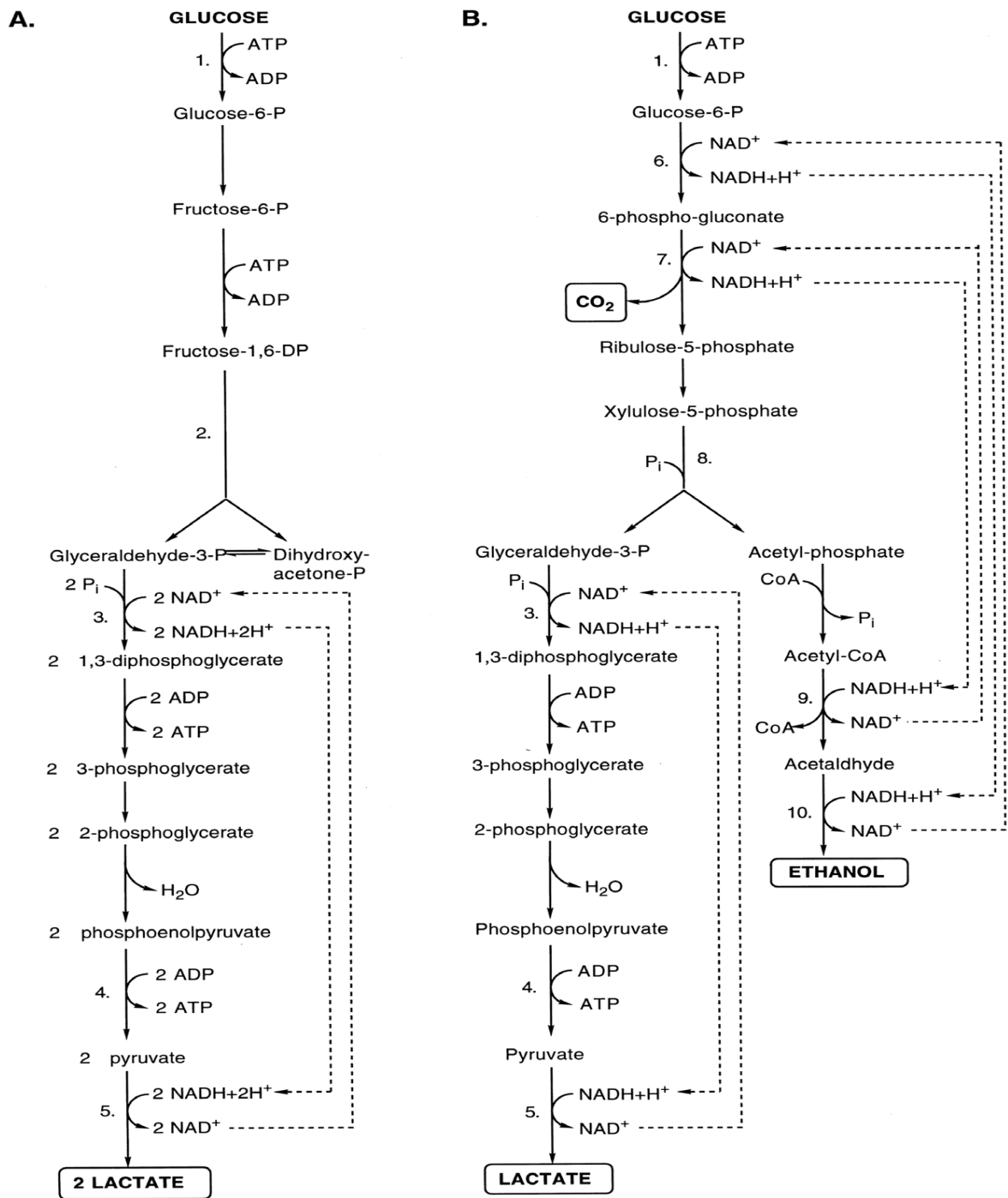


Figure 1 : Principales voies du métabolisme de glucose par les bactéries lactiques. (A) voie homofermentaire (B) voie hétérofermentaire (Thompson et Collins, 1989).

Synthèse bibliographique

Les lactocoques utilisent la voie EMP dans la dernière étape de la glycolyse et convertissent le pyruvate en acide lactique. Le métabolisme des sucres est soumis à une régulation par des mécanismes de répression et de rétro inhibition. Le Co-métabolisme du citrate peut être observé chez certaines espèces lors de la fermentation des sucres (**Schmitt et al, 1990**).

En technologie laitière, l'acidification lactique joue de multiples rôles : elle participe à la coagulation du lait, active la synérèse du caillé et la solubilisation du calcium micellaire qui ont une influence déterminante sur la texture des fromages.

Elle contribue aussi aux qualités organoleptiques des produits fermentés et inhibe la croissance des microorganismes nuisibles. Selon la variété de fromage et la flore pressente, les produits issus de la glycolyse peuvent être métabolisés selon différentes voies pour la formation de composés aromatiques variés (**Zhennai, 2000**).

I.4.2-La protéolyse :

Les enzymes impliquées dans la dégradation des caséines du lait durant la maturation incluent la présure, les protéases indigènes du lait (la plasmine) et les enzymes du ferment et de la flore secondaire (**Lane et Fox, 1996**). La protéolyse est considérée comme étant l'événement biochimique le plus important durant la maturation fromagère.

La **Figure 2** présente les principales voies de dégradation des protéines du caillé au cours de l'affinage des fromages.

L'incapacité des bactéries lactiques à synthétiser les acides aminés nécessaires à la synthèse protéique nécessite un fonctionnement actif de leur système protéolytique dans les environnements où les protéines constituent la principale source d'azote (**Law et Haandrikman, 1997**). Ces systèmes sont complexes de part le nombre et la nature des protéases et peptidases pressentes, mais également de part leur localisation cellulaire (**Juillard et al., 1996**).

Synthèse bibliographique

Le système protéolytique des bactéries lactiques est composé de protéases associées à la paroi cellulaire, qui catalysent l'hydrolyse de protéines en peptides contenant de 7 à 16 résidus aminés (Law et Haandrikman, 1997).

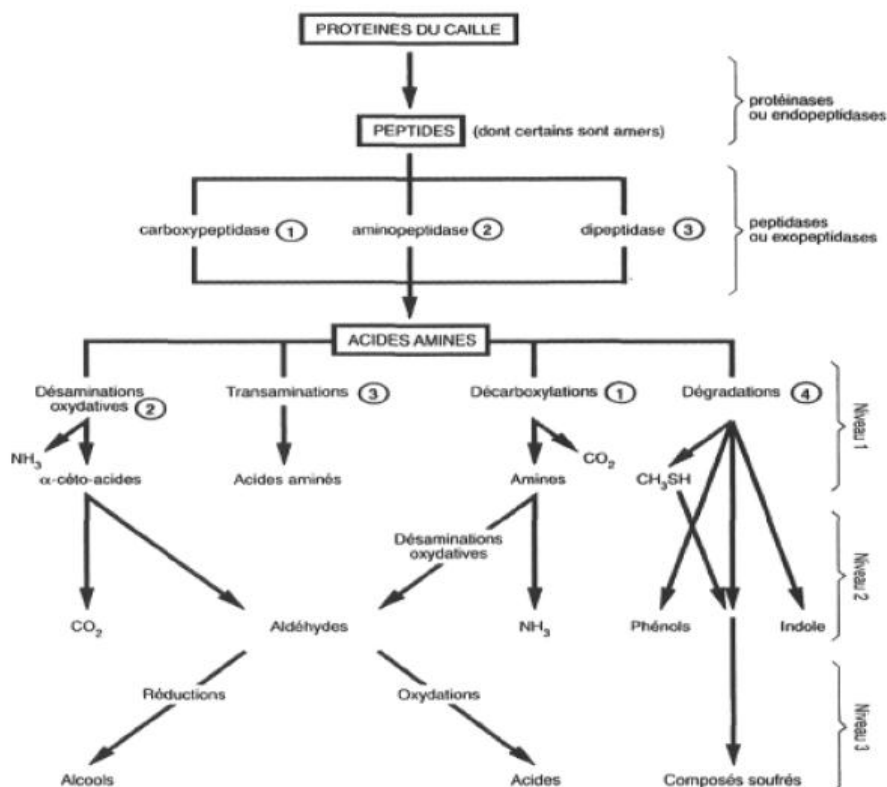


figure 2 : Principale voie de dégradation des protéines du caillé au cours de l'affinage des fromages : 1. Décarboxylases 2. Désaminases 3. Transaminases 4. Lyases (Topisirovic et al., 2006).

Ces peptides sont ensuite dégradés par des endopeptidases ou exopeptidases en unités transportables d'acides aminés et de petits peptides. Des études comparatives effectuées sur la protéolyse du cheddar fait avec ou sans ferments lactiques ont démontré l'importance de ces bactéries pour la libération de petits peptides et d'acides aminés libres durant la maturation fromagère (Lane et Fox, 1996). Les acides aminés libres contribuent directement ou comme composés précurseurs d'arômes. Le facteur limitant la production

Synthèse bibliographique

de composés aromatiques serait relié à la capacité bactérienne de conversion des acides aminés en ces composés, caractéristique variable selon les souches. Les voies cataboliques responsables de cette conversion sont principalement les voies initiées par les réactions d'élimination et de transamination impliquant une quantité variable d'enzymes : lyases, décarboxylases, désaminases et transaminases (**Topisirovic et al., 2006**).

I.5- Intérêt technologique des bactéries lactiques :

I.5.1-Activité acidifiante (production d'acide lactique) :

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; l'inhibition de la croissance des bactéries nuisibles (**Papamanoli et al., 2003**).

Il existe 2 grands types de fermentation bactérienne qui produisent de l'acide lactique :

La fermentation malolactique dans le vin : il s'agit de l'acide malique, naturellement contenu dans le vin, est dégradé en acide lactique sous l'action de la bactérie *Oenococcus oeni* (**Shirai et al., 2001**).

La fermentation lactique dans le lait et les produits laitiers : l'acide lactique provient de la dégradation du lactose par les bactéries lactiques. Plus un lait est frais, moins il contient d'acide lactique. La concentration en acide lactique dans un lait s'exprime en degré Dornic (°D) : 1°D correspond à 0,1 g d'acide lactique par litre de lait. Un lait frais contient de 15 à 18°D, il caille à 60-70°D. (**Shirai et al., 2001, Papamanoli et al., 2003, Ammor et al., 2004**).

I.5.2-Activité protéolytique :

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**).

Les bactéries lactiques sont incapables de synthétiser plusieurs acides aminés, mais sont pourtant bien adaptées à un environnement riche en protéines et pauvre en acides aminés libres ; comme le lait ; grâce à un système protéolytique bactérien complexe (**Shirai et al., 2001 ; Francois et al., 2007**).

Dans la plupart des genres de bactéries lactiques (Lactobacilles, Lactocoques), le système protéolytique met en œuvre une protéase liée à la paroi cellulaire grâce aux ions Ca^{+2} qui réalise la première étape du processus de dégradation des protéines. Les peptides résultant seront hydrolysés en acides aminés par différentes peptidases membranaires et cytoplasmiques après leur transport dans le cytoplasme, (**Fig.02**) (**Monnet et al, 1993**).

Technologiquement l'activité protéolytique constitue un caractère très important qui fait des bactéries lactiques les seuls agents microbiens d'affinage de la majorité des fromages à pâte pressée (Cheddar, fromage de Hollande...), des fromages sans croûte ou à croûte artificielle et des fromages frais.

Durant la phase d'affinage, le fractionnement des caséines modifie la texture de la pâte, certains peptides et acides aminés libérés sont des précurseurs de substances aromatiques (**Georgalaki et al, 2002**).

La libération des courts peptides hydrophobes conduit à l'apparition du défaut d'amertume ; ce dernier est éliminé grâce aux peptidases qui hydrolysent ces peptides amers en acides aminés (**Georgalaki et al, 2002 ; Francois et al, 2007**).

Dans les fromages, l'activité des enzymes protéolytiques des bactéries lactiques est fondamentale car elle va participer à la formation du goût ou des arômes ; la protéolyse due aux bactéries lactiques va surtout conduire à des peptides courts et à des acides aminés libres. Ces derniers sont des précurseurs pour de nombreux produits d'arôme. En effet, la méthionine peut conduire à des composés soufrés caractéristiques. Ceci après leur dégradation par la flore d'affinage (**Hemme et al., 1981**).

I.5.3-Pouvoir aromatisant et pouvoir gazeux :

Certaines bactéries lactiques sont capables de produire des composés d'arômes qui participent aux qualités organoleptiques des fromages. La plupart des composés d'arôme sont issus du métabolisme du citrate, l'acétoïne et le diacétyle sont les plus importants (Georgalaki *et al.*, 2002, Francois *et al.*, 2007).

I.6 les bactéries lactique et la protéolytique :

I.6.1 activité bactériostatique :

Les bactéries lactiques produisent des substances antimicrobiennes de nature protéique appelées bactériocines. Cette caractéristique est utilisée industriellement pour inhiber la croissance 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 ; Zambunelli et Chiavari, 2002), contribuant ainsi à la préservation de l'équilibre microbien et organoleptique du fromage (Harris *et al.*, 1989 ; Georgalaki *et al.*, 2002).

Les bactériocines, telles que la nisine ou la pédiocine, sont des molécules de nature protéique dont l'action bactériostatique est spécifique de quelques espèces bactériennes (Tagg *et al.*, 1976).

Aujourd'hui, les " bons amis " probiotiques sont utilisés aussi dans un grand choix de laitages fermentés qui vont du kéfir (boisson liquide) jusqu'au yaourt (plus consistant).

Les probiotiques sont des micro-organismes qui lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent un effet théoriquement bénéfique sur la santé de l'hôte. Les probiotiques sont des bactéries ou levures, ajoutées comme compléments à certains produits alimentaires, comme les yaourts ou les céréales par exemple, et qui aident à la digestion des fibres, stimulent le système immunitaire et préviennent ou traitent la diarrhée. (Isolauri *et al.*, 2001).

Synthèse bibliographique

Pour que les probiotiques aient un effet bénéfique sur la santé, il faut que plusieurs conditions soient réunies : qu'ils soient vivants (ou lyophilisés) ; que les bonnes souches soient sélectionnées pour l'effet recherché par exemple, chez *Lactobacillus acidophilus*, il existe des milliers de souches dont chacune a un effet différent, il faut qu'au moins 1 milliard soient ingérés par jour et qu'elles aient montré leur résistance à l'acidité gastrique et à la bile, les cures doivent durer au moins 10 jours par mois. Et enfin que la démonstration de leur bénéfice ait été faite tant chez l'être humain sain que chez le malade. **(Isolauri et al., 2001).**

L'ingrédient garantissant la survie et l'efficacité des probiotiques : humidité relative résiduelle moins de 4%.

Parmi les microorganismes utilisés en termes de probiotique on retrouve souvent des bactéries lactiques, hôtes naturels de l'intestin de l'homme. Les probiotiques les plus étudiés appartiennent aux deux genres : *Bifidobacterium sp* plus particulièrement les espèces *Bifidobacterium bifidum* (bifidus), *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve* et *Lactobacillus sp.* plus particulièrement *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*.

La levure *Saccharomyces boulardii* a également été largement étudiée en tant que probiotique. Elle est le seul probiotique à avoir montré une réelle efficacité dans la prévention des diarrhées post-antibiotiques et les colites à *Clostridium difficile* **(Samona et Robinson., 1991).**

Matériel et Méthodes

II- Matériel et méthode

II.1. Objectif du travail :

Pour atteindre les objectifs précédemment fixés à savoir : L'identification de la souche lactique isolée à partir du lait de brebis, l'évaluation de ses quelques aptitudes technologiques dans différents milieux de culture, ainsi que son pouvoir antimicrobien contre des germes pathogènes, nous avons suivi les étapes décrites au fur et à mesure dans la partie ci-dessous.

II.2- Lieu d'étude :

Cette étude a été faite, au niveau du Laboratoire de Microbiologie du Département de Biologie, Université Ammar Thelidji Laghouat.

II.3- Matériel biologique :

Origine des souches testées:

La souche de bactérie lactique étudiée est LB est isolée à partir du lait de brebis.

Les souches bactériennes pathogènes testées lors de notre étude sont : *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300) (**Tableau 7**); elles sont entretenues par repiquage sur gélose nutritive favorable à leur croissance.

Tableau 7 : Provenance des souches bactériennes étudiées.

Souches bactériennes	Origine
LB	isolée au Laboratoire de Microbiologie de l'université Amar Thelidji de Laghouat à partir d'un lait de brebis.
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 43300)	Hôpital de Ahmed ben adjila de Laghouat.
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	Hôpital de Ahmed ben adjila de Laghouat.

ATCC: American Type Culture Collection.

II.4- Milieux de cultures :

Les milieux de culture utilisés lors de notre travail étaient soit liquides, soit solides par addition d'Agar : 0.7% pour la gélose semi solide et 1.5 à 2% pour la gélose solide. Les milieux sont stérilisés par autoclavage à 120°C pendant 20mn sauf pour le milieu MRS + 1% caséine qui est stérilisé à 110° C pendant 10 min. Les milieux de cultures utilisés sont : MRS, MRS sans citrate, et MRS sans sucre. La composition pour un litre de ces différents milieux de culture est mentionnée dans l'annexe (à la fin du manuscrit).

II.5- Préparation d'inoculum :

Pour déterminer l'inoculum utilisé lors de l'ensemencement des cultures qui serviront à l'étude de la croissance et au suivi de l'acidification ; des dilutions décimales ont été réalisées à l'aide d'une solution d'eau physiologique 0,9 %, après homogénéisation, on étale 0,1 ml de chaque dilution sur le milieu MRS. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 24h à 48h, et en utilisant un compteur de colonies, on retient seulement les boîtes contenant 30 à 300 colonies.

II.6-Conservation des souches:

Elle a été réalisée par ensemencement de la souche isolée sur gélose MRS inclinée en tube à essai, la culture pure a été conservée à + 4°C à l'obscurité.

De même un autre tube contenant le milieu MRS liquide avec 30% glycérol (agent cryoprotecteur) a été conservé à -20°C, l'ensemencement sur milieu liquide permet une conservation plus longue.

II.7- Tests d'identification de la souche LB:

L'identification a été établie en se basant sur des caractères morphologiques, physiologiques et divers caractères biochimiques : croissance à différentes températures et pH, production de gaz carbonique, fermentation de divers sucres.

II.7.1- Observation macroscopique :

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies sous loupe binoculaire permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification.

Matériel et méthode

- Les éléments d'identification macroscopique sont :
- La forme des colonies : allongé, spirale, sphérique, ronde.
- La taille des colonies : petite, grande, moyenne.
- La chromogénèse : production de pigments.
- L'élévation : convexe, concave, plate.
- L'opacité : opaque, translucide ou transparente.
- La surface : lisse, rugueuse, sèche, muqueuse.

II.7.2- Observation microscopique (Coloration de Gram):

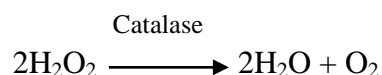
On réalise un frottis à partir d'une colonie isolée d'une culture pure. Une fois le frottis fixé à la chaleur est coloré pendant une minute au *violet de gentiane*; il est ensuite rincé rapidement à l'eau courante, traité pendant une minute par une solution de *Lugol*, et de nouveau rincé rapidement. On soumet alors le frottis coloré à une étape de décoloration en le traitant avec l'éthanol 95%. Il s'agit de l'étape critique: la lame est maintenue inclinée et on fait couler l'éthanol 95% sur le frottis jusqu'à ce que le colorant cesse de s'échapper librement du frottis. Celui-ci est alors immédiatement rincé à l'eau courante.

À ce stade les cellules Gram négatives seront incolores, les cellules Gram positives seront de couleur violettes. On soumet ensuite le frottis à une contre coloration de 1 minute à la *fushine* pour colorer les cellules Gram négatives. Après un bref rinçage, on sèche le frottis au buvard et on l'examine à l'objectif 100 à immersion.

II.7.3- Tests biochimiques:

II.7.3.1-Test de la catalase :

Pendant leur respiration aérobie certaines bactéries produisent du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) celui-ci est très toxique et certaines bactéries sont capable de le dégrader grâce aux enzymes qu'elles synthétisent et notamment la catalase. Cette enzyme est capable de décomposer l'eau oxygénée selon la réaction :



Une colonie est mise en suspension avec une ou deux gouttes d'eau oxygénée sur une lame propre. La réaction positive se traduit par un dégagement gazeux du dioxygène qui se manifeste par l'apparition de bulles de gaz visibles.

II.7.3.2-Type fermentaire:

Dans un tube à essai on a versé un milieu MRS sans citrate et entreposé une cloche de Durham pour mettre en évidence la production de gaz. Ensuite on a ensemencé la souche LB puis incubé à 37°C pendant 48h. Une réaction positive se traduit par une accumulation du gaz carbonique au moins le 1/10 du volume de la cloche. La souche homofermentaire va produire 90% d'acide lactique et seulement 10% de CO₂, par contre la souche hétérofermentaire va produire l'acide lactique et le CO₂ à proportions égales.

II.7.3.3-Croissance à différentes températures:

La souche LB a été incubée sur bouillon MRS pendant 24h à 48h à 37°C, 42°C, 45°C et la croissance se traduit par un trouble.

II.7.3.4-Croissance à différents pH:

La souche LB étudiée a été incubée dans des tubes à essai contenant le bouillon MRS à différents pH 2; 4,5 ; 9 ; 9.6 et puis laissé incubé pendant 48h et la croissance se traduit par un trouble.

II.7.3.5-Thermorésistance:

Un tube contenant le milieu MRS (10ml) a été inoculé par une colonie isolée sur MRS solide, incubé à 37°C pendant 48h, jusqu'à l'apparition d'un trouble microbien. Ce tube a subi un traitement thermique dans un bain-marie à 63,5°C pendant 30 min, après refroidissement brusque à 4°C, le tube a été ensuite incubé à 37°C pendant 48h. Un résultat positif se traduit par un trouble .

II.7.3.6-Test des sucres (Galerie Api 50CHL) :

Pour le test des sucres, on a utilisé les sucres de la galerie Api 50CHL (**Bio Mérieux, France**), (**Fig. 3**). Le milieu MRS sans sucre est additionné de l'indicateur coloré BCP à raison de 25 mg/L, qui donne la couleur violette au milieu neutre, la production de l'acide lactique dans le milieu donne une réaction révélée par le changement de couleur vers le jaune.

Protocole : nous avons procédé comme suite :

Matériel et méthode

On a centrifugé les souches préalablement cultivées sur milieu MRS à 3000 tours par minutes pendant 20 minutes, puis éliminé le surnageant, et ajouté 10 ml d'eau physiologique stérile au culot de la souche.

Nous avons procédé à une deuxième centrifugation dans les mêmes conditions. (Nous avons répété cette étape 3 fois), nous avons repris le culot obtenu dans 10 ml du milieu MRS sans sucres BCP (Poupre de bromocresole), puis avec ce dernier on a remplis les cupules de la galerie Api 50CHL par pipette pasteur stérile, et à la fin nous l'avons mise à incuber à 37°C pendant 24h à 48h.

Figure 3 : (A) Photo de la Galerie Api50CHL utilisé, (B) Légende des sucres utilisés dans la Galerie Api50CHL.

II.8 - La mise en évidence de quelques aptitudes technologiques :

II.8.1-Mesure du pH et de l'acidité totale (°D):

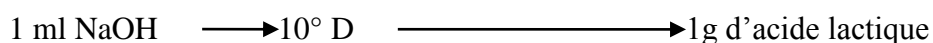
La mesure du pH a été réalisée tous les 4h par un pH-mètre dans un volume de 10 ml des milieux de cultures fermentés par LB.

L'acidité totale a été déterminée par titrage de la concentration molaire en ions H_3O^+ dans les milieux de culture utilisés pour la fermentation par la souche LB. Cette concentration est exprimée en "degrés Dornic".

Le matériel nécessaire est le suivant: un statif avec noix et pince, un Becher de 50 mL, une solution de NaOH N/9 (0,11 M), une burette de 25 ml et un pH-mètre pour mesurer le point de neutralisation (d'équivalence).

Nous avons remplis la burette avec la solution de NaOH N/9 et l'avons fixé au statif. On a réglé le niveau du liquide à zéro. La titration a été réalisée selon le protocole décrit par **Martinez-Villaluenga et Gomez, (2007)** ; à l'aide d'une pipette de 10 ml, nous avons prélevé 10 ml du milieu de fermentation plus 10 ml d'eau distillé dans le Becher de 50 ml et nous avons titré jusqu'à atteindre le point de neutralisation à pH 8,6.

Les résultats obtenus sont exprimés en ml de NaOH, on les transforme en degré Dornic par la formule suivante (**Bourgeois et al, 1996**).



II.8.2- L'activité protéolytique :

Nous avons utilisé pour ce test la gélose MRS plus 1% de caséine. La méthode consiste à ensemencer la souche LB sur le milieu par touche central et à incuber le tout à 37°C pendant 24h. Le résultat attendu est un halo de protéolyse au tour de la colonie bactérienne dont on mesure le diamètre pour évaluer l'intensité de cette action.

II.8.3-Test de sensibilité au différent ATB :

Nous avons utilisé des disques de 6 mm de diamètre imbibés d'antibiotiques à différentes concentrations conditionnés par le fabricant (Institut Pasteur, Alger), fournie par l'Hôpital de Ahmed ben adjila de Laghouat (**Tableau 8**).

Tableau 8 : Liste des antibiotiques testés sur la souche LB.

Charge du disque	Antibiotiques
30 µl	TE (Tétracycline)
2 µl	L (Lincomycine)
10 µl	AMP (Ampicilline)
25 µl	AMC (Amoxicilline)
30 µl	C (Chloramphénicol)
15 µl	E (Erythromycine)

Nous avons suivis les étapes suivantes :

1-Inoculation :

- À partir d'une préculture d'environ 24h à 37°C sur bouillon MRS.

2-Ensemencement :

- À l'aide d'un écouvillon stérile la suspension bactérienne est ensemencée en frottant l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée sèche, de haut en bas, en stries serrées.

- Répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

3-Application des disques d'antibiotiques :

- Il est préférable de ne pas mettre plus de 6 disques d'antibiotiques sur une boîte de 90 mm de diamètre. Les disques d'antibiotiques doivent être espacés de 24 mm, centre à centre.
- Presser chaque disque d'antibiotique à l'aide d'une pince bactériologique stérile pour s'assurer de son application. Une fois appliqué, le disque ne doit pas être déplacé.

4-Incubation :

- Les boîtes sont incubées pendant 24 heures à 37C°.

5-Lecture :

- On mesure avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse graduée sur le fond de la boîte.
- On compare les résultats aux valeurs critiques en utilisant des abaques de l'Institut Pasteur, selon le diamètre d'inhibition, on classe la bactérie dans l'une des catégories : **Sensible**, **Intermédiaire**, ou **Résistante**.

II.8.4-Activités Antibactériennes:

Dans cette partie on réalise des interactions entre la souche LB et deux bactéries pathogènes de références, fournie par le Laboratoire de Hôpital de Ahmed ben adjila de Laghouat, elles sont responsables de toxi-infections alimentaires *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300), *Escherichia coli* (ATCC 25922).

Matériel et méthode

1-Préparation des précultures des bactéries tests (pathogènes) :

Dans un premier temps ces bactéries sont cultivées à 37°C sur 10 ml de bouillon nutritif pendant 18 à 24h. La culture d'une nuit obtenue servirait d'inoculum.

2-Interactions Bactéries lactiques / Bactéries pathogènes :

Méthode décrite par **Fleming et al. (1975)** modifiée: une boîte contenant le milieu MRS estensemencée par touche d'une culture de la souche LB, l'incubation se fait à 37°C jusqu'à l'obtention de colonies confluentes (environ 24h).

Ensuite, un tube contenant 10 ml de milieu MRS semi solide (7g d'Agar/l) est inoculé avec 0,5 ml de la préculture des bactéries pathogènes. Après agitation du tube on coule la deuxième couche de gélose sur les boîtes de Pétri. L'activité antibactérienne est déterminée par mesure des diamètres des zones d'inhibitions après incubation à 37°C pendant 24h.

Résultats et interprétations

III-Résultats et interprétations

III.1-Identification de la souche LB:

III.1.1-Aspect morphologique :

- **L'examen macroscopique** des cultures sur milieux MRS, après 48 h à 37°C montre des colonies généralement bien isolées. Elles sont punctiformes de couleur blanchâtres à contours réguliers, surélevés et opaques, ces caractères cultureux correspondent aux colonies des *Lactobacillus sp.* (**Fig. 4**).

Figure 4 : Aspects des colonies de la souche LB après repiquages successifs par des stries sur gélose MRS incubées 48 heures à 37°C (Grossissement 20).

- **L'observation microscopique** nous permet d'authentifier la souche utilisée dans notre étude. La souche est un Bacille Gram positive, de forme allongée, en chaînettes plus ou moins longue (**Fig. 5**).

L'uniformité des cellules confirme la purification parfaite de cette souche étudiée.

Figure 5 : Coloration de Gram et aspect des cellules de la souche LB
Sous microscopie optique (Grossissement 1000).

III.1.2-Aspect cultureux :

- * Test catalase : conformément au genre *Lactobacillus sp.* la souche LB est catalase négative.
- * Type fermentaire : La souche LB ne produit pas du gaz carbonique à partir du glucose ; donc elle est Homofermentaire.
- * La souche LB a le pouvoir de croître dans le bouillon MRS à pH 2 et à pH 9, mais elle ne pousse pas à pH 9,6.
- * La souche LB pousse à 37°C et 42°C car après 24 heures d'incubation on a obtenu un trouble dense par contre elle possède une croissance lente à 45°C.
- * La souche LB est thermorésistante, où on observe une croissance dans le bouillon MRS après un traitement thermique de 63,5 °C pendant 30 minutes.

[Résultats et interprétation]

Le tableau 9 résume les résultats des tests effectués :

Tableau 9 : Résultats des tests de la caractérisation physiologique.

Type fermentaire	Homofermentaire	
Température de croissance °C	37	+
	42	+
	45	Lente
Catalase	Négative	
Thermorésistante à 63,5°C/30min	+	
Croissance à différents pH.	2	+++
	4,5	++
	9	+
	9,6	-
NaCl 0,4 %	-	

+ Croissance ; - Pas de croissance.

III.1.3-Test des sucres:

C'est une étape confirmative indispensable dans l'identification des souches. Après 48h d'incubation, il a été remarqué un virement de la couleur du milieu de culture dans 15 cupules de la galerie API 50CHL utilisée pour ce test, du pourpre au jaune ce virement est attribué à la production d'une quantité plus ou moins forte d'acide lactique par la souche LB en utilisant les sucres fermentescibles (**Tableau 10**).

[Résultats et interprétation]

Tableau 10 : Résultats de la galerie Api 50CHL de la souche LB.

Sucre	LB
D-Glucose	+
Galactose	+
N-Acetyl Glucosamine	+
Lactose	+
Glycerol	-
Erythritol	-
D-Arabinose	-
L-Arabinose	-
Ribose	+
D-Xylose	-
L-Xylose	-
Adonitol	-
β Methyl-D-xyloside	-
Fructose	+
D-Manose	+
L-Sorbose	+
Rhamnose	-
Dulcitol	-
Inositol	-
Mannitol	+
Sorbitol	-
α Methyl-D-mannoside	-
Amygdaline	-
Arbutine	-
Esculine	-
Salicine	+
Cellobiose	+
Maltose	-
Melibiose	-
Saccharose	-
Trehalose	+
Inuline	-
Melezitose	+
D-Raffinose	-
Amidon	-
Glycogene	-
Xylitol	-
β - Gentiobiose	-
α Methyl-D-Glucoside	-
D-Turanose	+
D-Tagatose	+
D-Fucose	-
L-Fucose	-
D-Arabitol	-
L-Arabitol	-
Gluconate	-
2 ceto-gluconate	-
5 ceto-gluconate	-

[Résultats et interprétation]

L'interprétation de ces tests a été faite par l'utilisation du logiciel PIBWin (Probabilistic Identification of Bacteria For Windows) (Bryant, 2004) qui suggère une appartenance de la souche LB au genre *Lactobacillus* donnant une identité de 100% avec le profile fermentaire des sucres de la galerie API 50 CHL de l'espèce *Lactobacillus casei*.

III.2- Résultats de sensibilité au ATB :

La figure 6 montre les zones d'inhibition des 6 antibiotiques utilisés pour tester la sensibilité de la souche LB, les résultats de l'antibiogramme sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 11 : Lecture de l'antibiogramme de la souche LB (selon les abaques de l'Institut Pasteur Edition 1995) In Joffin et Leyral, (1996).

ATB	charge du disque μ l	Diamètres d'inhibition en (mm)	Résultats
TE (Tétracycline)	30 μ l	37	S
L (Lincomycine)	2 μ l	40	S
AMP (Ampicilline)	10 μ l	37	S
AMC (Amoxicilline)	25 μ l	43	S
C (Chloramphénicol)	30 μ l	40	S
E (Erythromycine)	15 UI	40	S

S:sensible.

D'après le **tableau 11**, nous remarquons que notre souche est sensible à la plupart des antibiotiques testés.

Figure 6 : Photo de l'antibiogramme de la souche LB réalisé sur milieu MRS avec les antibiotiques (Tétracycline, Lincomycine, Ampicilline, Amoxicilline, Chloramphénicol et Erythromycine).

III.3- caractérisation technologique :

III.3.1-Activité protéolytique :

L'activité protéolytique est également une caractéristique technologique importante chez les bactéries lactiques puisqu'elle leur confère la capacité de croître efficacement dans le lait. La souche LB s'avère une souche protéolytique comme le montre la **figure 7**, le diamètre de la zone de lyse est de 21 mm

Figure 7 : Photo présentant les zones de lyse de la souche LB sur milieu MRS caséine 1%.

III.3.2-Activités antibactériennes :

La **figure 8** montre que la souche LB possède un pouvoir inhibant vis à vis des 2 souches pathogènes utilisées (*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*).

E.coli

S.aureus

Figure 8 : Photo de l'interaction entre la souche LB et *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

[Résultats et interprétation]

Les diamètres des zones d'inhibitions sont représentés dans la **figure 8** où on remarque que la souche *Lactobacillus casei* LB possède un grand potentiel d'inhibition vis à vis des bactéries pathogènes avec une forte sensibilité de la souche *Escherichia coli* (40 mm) ; et (17 mm) pour la souche *Staphylococcus aureus*.

III.3.3-Pouvoir acidifiant de la souche LB :

Le suivi d'évolution du pH et de l'acidification en degré Dornic (°D) pendant 24h de fermentation à 37°C par la souche *Lactobacillus casei* dans le milieu fermenté. Les valeurs des pH obtenus après 24 heures de fermentation ont atteint respectivement 6.5 ; 5,8 ; 4,8 ; 4,1 et 4.

La production de l'acide lactique a atteint après 24h de fermentation les valeurs suivantes : 30 °D, 60 °D, 78 °D, 110 °D et 135 °D pour le milieu fermenté respectivement.

Figure 9 : Evolution de l'acidité en pH —■— et °D —◆— du MRSG fermenté par la souche LB à 37°C.

IV- Interprétation

Nos résultats ont révélé que la souche LB isolée à partir du lait de brebis appartient au genre *Lactobacillus* et présente une grande similarité avec l'espèce *Lactobacillus casei*.

Nous avons remarqué qu'elle se développe à pH 2 et pH 9 ainsi qu'à des températures de 42°C et 45°C donc elle tolère des conditions extrêmes d'acidité et de thermorésistance, caractères très prisés dans l'industrie laitière. Selon les travaux de **Kacem et Karam, (2006)**, les analyses de pH des produits laitiers présentent des valeurs de pH qui varient entre 3,10 et 4,87. Certaines normes françaises imposent généralement un pH inférieur à 4,5 ou 4,6 pour le lait fermenté (**Luquet et Corrieu., 2005**) alors que notre souche pousse à pH 2.

Les résultats de l'antibiogramme ont montré que notre souche est sensible aux Tétracycline, Chloramphénicol et Erythromycine et confirment les résultats trouvés dans les travaux de **Ziane et al. (2008)**. ce résultat peut être expliqué par l'acquisition d'un plasmide portant le gène de résistance à cet antibiotique comme l'explique dans ses travaux **Karam et al. (2009)**.

Le pouvoir acidifiant (production d'acide lactique) de la souche LB dans le milieu fermenté et a atteint 30°D avec un pH égal à 6.5 pour les premiers deux heures et 135 °D avec un pH égal à 4 pour les derniers d'heures. En général, chez les bactéries lactiques, le métabolisme du glucose diffère de celui du fructose. En effet, il a été montré que l'utilisation de chaque sucre est directement liée au mécanisme de transport du sucre correspondant (**Özen et Özilgen, 1992**). Nos résultats coïncident avec ceux trouvés dans les travaux de **Nancib et al. (2004)**.

Le résultat de la protéolyse nous a permis de confirmer le caractère protéolytique de la souche LB. L'activité des enzymes protéolytiques est fondamentale, car elle complète l'action de la présure dans le caillé. La protéolyse due aux bactéries lactiques va surtout conduire à des précurseurs pour de nombreux produits d'arômes (**Desmazeaud, 1992, Sanni et al, 2002**). Les bactéries lactiques protéolytiques participent donc à l'amélioration de la qualité organoleptique du produit fini.

[Résultats et interprétation]

Les bactéries lactiques peuvent être employées comme conservateurs dans les aliments fermentés par inhibition des germes pathogènes tels qu'*E. Coli* et *S. aureus*, qui sont généralement responsables de la détérioration de la nourriture, des toxi-infections alimentaires et des intoxications (**Karam, 1995**).

La capacité de compétition des bactéries lactiques résulte de leurs activités fermentaires associées à la production de divers composés antimicrobiens dans le but d'inhiber la prolifération de microorganismes. De nombreuses substances à activité antimicrobienne produites par les bactéries lactiques ont régulièrement été mises en évidence (**Rodrigues et al, 2002 ; Mansour et al, 2004**).

Au laboratoire de microbiologie en exploitant les potentialités inhibitrices naturelles par des tests d'interaction entre les bactéries pathogènes et les isolats de bactéries lactiques, on a pu remarquer que le diamètre des zones d'inhibition vari selon l'espèce (**Prioult, 2003**).

Les microorganismes pathogènes testés dans notre étude sont impliqués dans les toxi-infections alimentaires appartiennent aux espèces suivantes : *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. Les résultats des interactions montrent que la souche LB possède un effet inhibiteur contre les 2 souches pathogènes utilisées. Nous avons remarqué que la souche LB est plus active sur *Escherichia coli* 40 mm.

Pour l'autre souche (*Staphylococcus aureus*), le diamètre de la zone d'inhibition est 17 mm. Cette valeur est supérieure aux valeurs trouvées dans les travaux de **Bouزيد, (2008)**, où les diamètres des zones d'inhibitions de bactéries lactiques isolées du lait de chamelle sont de l'ordre de 11 mm jusqu'à 15 mm.

D'après les travaux de **Boudjani, (2009)**, les diamètres des zones d'inhibition de bactéries lactiques isolées du lait cru de vache peuvent atteindre environ 20 millimètres ; de même pour les travaux de **Savadogo et al. (2004)**, où les diamètres des zones d'inhibition des bactéries lactiques isolées du lait fermenté sont de l'ordre de 9 à 10 mm vis-à-vis de *S. aureus* et de 8 à 9 mm vis-à-vis d'*E. coli*.

[Résultats et interprétation]

En comparaison avec les travaux **de Benmammer et Hamsi, (2003)**, qui ont trouvé des zones d'inhibitions des souches *S. aureus* (6 à 10 mm), *E. coli* (2 à 4mm), notre souche identifiée comme *Lactobacillus casei* est plus active sur les bactéries pathogènes.

Des efforts considérables ont été consacrés au cours de ces cinquante dernières années pour mieux comprendre la physiologie, la biochimie et la génétique des bactéries lactiques. Toutes ces recherches ont permis aux microbiologistes et aux industriels de choisir les meilleures souches et d'améliorer la productivité, la qualité, et la sûreté des produits finis.

CONCLUSION

Conclusion

Conclusion

Dans le cadre de la recherche de nouvelles souches pour enrichir la diversité des ferments lactiques ; les résultats obtenus dans notre travail ont montré que la souche *Lactobacillus casei* LB isolée à partir d'un lait de brebis local se comporte comme un bon candidat à la formulation des ferments lactiques à usage industriel.

La souche *Lactobacillus casei* LB possède une activité protéolytique très recherchée dans la fabrication des fromages ainsi qu'une bonne production d'acide lactique sur milieu lait.

L'activité antibactérienne de *Lactobacillus casei* LB, peut participer à la conservation des produits laitiers, en produisant des substances susceptibles d'inhiber les bactéries responsables de leur altération.

Nous proposons comme suite à ce travail les perspectives suivantes :

- Compléter l'identification de la souche LB par des tests génétiques.
- Identifier la substance inhibitrice (acide organique, H₂O₂ ou bactériocine) responsable du pouvoir antibactérien de cette souche.

ANNEXES

Annexe

Milieu MRS (de Man Rogosa et Sharpe, 1960)

Extrait de levure	5g
Extrait de viande	5g
Peptone	10 g
Acétate de sodium.....	5g
Citrate de sodium	2g
Glucose	20g
KH ₂ PO ₄	2g
MgSO ₄	0.1 g
MnSO ₄	0.05 g
Agar	12g
Tween80.....	1 ml
Eau distillée q.s.p.....	1000 ml

pH=6.5 ± 0.2 à 37°C

Autoclavage : 121°C /15min.

Milieu MRS sans citrate

Extrait de levure	5g
Extrait de viande	5g
Peptone	10 g
Acétate de sodium.....	5g
Glucose	20g
KH ₂ PO ₄	2g
MgSO ₄	0.1 g
MnSO ₄	0.05 g
Agar	12g
Tween80	1 ml
Eau distillée q.s.p.....	1000 ml

pH=6.5 ± 0.2 à 37°C

Autoclavage : 121°C /15min.

Milieu MRS sans sucre

Extrait de levure	5g
Extrait de viande	5g
Peptone	10 g
Acétate de sodium.....	5g
Citrate de sodium	2g
KH ₂ PO ₄	2g
MgSO ₄	0.1 g
MnSO ₄	0.05 g
Agar	12g
Tween80	1 ml
Eau distillée q.s.p.....	1000 ml

Annexe

Bouillon nutritif

Extrait de viande	1g
Extrait de levure.....	2g
Peptone.....	5g
Chlorure de sodium.....	5g
Eau distillée q.s.p.....	1000 ml

pH= 7.4

Autoclavage : 120°C pendant 20 min.

Gélose Chapman

Peptones	10,00 g
Extrait de viande de boeuf.....	1, 00 g
D-mannitol	10,00 g
Chlorure de sodium.....	75,00 g
Rouge de phénol	0,025 g
Agar.....	15, 00 g

PH final à 25°C : 7,4 ± 0,2

Gélose Mueller Hinton

Infusion de boeuf.....	30,00 g
Peptone de caséine.....	17,50 g
Amidon.....	1, 50 g
Agar.....	17, 00 g

Ph final à 25°C : 7,3 à 0,2

Le milieu en flacons ou boîtes de conserve entre 2 et 8°C.

Milieu MRS (BCP)

Milieu MRS bouillon.....	1000 ml
Pourpre de bromocrésol.....	0,025mg/l

PH= 7

Références bibliographiques

Reference bibliographique

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Ammor, S., Rachman, C., Chaillou, S., Prévost, H., Dousset, X., Zagorec, M., Dufour, E et Chevallier, I. (2004). Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages. *Food Microbiol.* 05-11.

B

Benmammer, F et Hamsi, S. (2003). In **Boudjani, W.** (2009). Action de la flore lactique sur les bactéries contamination. Mémoire d'ingénieur, Institut de biologie, Université de Tlemcen. Pages 73.

Bergey, (2004). Manuel de la Systématique Bactérienne. Ed. *R.E Buchanan and N.E Gibbons*, p. 600.

Bissonnette, F., Labrie, S., Deveau, H., Lamoureux, et M., Moineau, S. (2000). Characterization of mesophilic mixed starter cultures used for the manufacture of aged Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 83: 620-627.

Boudjani, W. (2009). Action de la flore lactique sur les bactéries contamination. Mémoire d'ingénieur, Institut de biologie, Université de Tlemcen. 73 pages.

Bourgeois C. M. et Leveau J.Y. (1991). Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires. 2^{ème} ed. *Lavoisier-Tech et Doc* : 153-202.

Bourgeois, C.M., Mesle, J., Zucca, J. et Larpent, J.F. (1996). Microbiologie Alimentaire (tome 1), *Lavoisier*. Paris, P : 29-245.

Bouzid (2008). In **Boudjani, W.** (2009). Action de la flore lactique sur les bactéries contamination. Mémoire d'ingénieur, Institut de biologie, Université de Tlemcen. Pages 73.

Bryant, T.N. (2004). PIBWin software for probabilistic identification. *Journal of Microbiology.* 97(6): 1326-7.

Bugnicourt, M. (1995). Dictionnaire de microbiologie générale. Edition ellipses.

Buist, G., Venema, G., et kok, J. (1998). Autolysis of *Lactococcus lactis* influenced by proteolysis. *Journal of biotechnology.* N° 22: 5974-5953.

Bustos, G., Moldes A.B., Cruz J.M et Dominguez, J.M. (2005). Influence of the Metabolism Pathway on Lactic Acid Production from Hemicellulosic Trimming Vine Shoots Hydrolyzates Using *Lactobacillus pentosus*. *Biothechnology Prog.*, 21: 793-798.

C

Carr, F.J., Chill, D et Maida, N., (2002). The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Rev. Microbiol.*, 28: 4, 281-370.

Reference bibliographique

Charalampopoulos, D., Pandiella S.S et Webb, C. (2002). Growth studies of potentially probiotic lactic acid bacteria in cereal-based substrates. *Journal of Applied Microbiology*, 92:851-859.

Cherigene, A., Chougrani, F et Bensoltane, A. (2006). Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian goat's milk. *Pakistan J. Biol. Sci.*, 9(7): 1242-1249.

Chougrani, F., Cherigene, A et Bensoltane, A. (2006). Identification and some technological properties of lactic acid bacteria isolated from Algerian ewe's milk. *Egypt. Jo. App. Sci.*21, (8): 148-157.

Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F et Chikindas, M.L. (2001). Bacteriocins: Safe, natural antimicrobials for food preservation, *Int. J. Food Microbiol.* 71: 1-20.

Cogan, T.M. (1987). Co-metabolism of citrate and glucose by *Leuconostoc* ssp. Effects on growth substrates and products. *J. Appl. Bacteriol.*63: 551-558.

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

D

De Man, J.C., Rogosa, M et Sharpe, M.E (1960). A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J. Bacteriol.* 23 :130-135.

De Roissart, H. B (1986). Bactéries lactiques. I. N. R. A. station de recherche laitière. *Clermont Ferrand France*.

Dellaglio, H., de Roissart, H., Torriani, S., Curk, M.C et Janssens, D. (1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In: de Roissart, H., Luquet, F.M. (Eds.), *Les bactéries lactiques: aspects fondamentaux et technologiques*. Lorica, Uriage, pp. 25-116.

Desmazeaud, M.J. (1992). L'état des connaissances en matière de nutrition des bactéries lactiques. *Le lait* . 63: 267-316.

Diviès, C., Frey, L., Hubert, J.C et De Roissard, H. (1994). Métabolisme d'autres substrats carbonés par les bactéries lactiques., p. 291-307, *Bactéries lactiques*, vol. I. De Roissard H. et Luquet F.M., Lorica.

Drouault S. et Corthier G., 2001. Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *Vet. Res.*, 32: 101-117.

E

Euzéby, J.P (1997). List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1997, **47**, 590-592. (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. <http://www.bacterio.net/> mise à jour du 28 avril 2010).

Reference bibliographique

F

Falsen E, Pascual C, Sjoden B, Ohlen, M et Collins, M. D (1999). Phenotypic and phylogenetic characterization of a novel *Lactobacillus* species from human sources: description of *Lactobacillus* sp. nov. *Int. J of Syst. Bact.* 49.

Farrow, J. A.E et Collins, M .D. (1984). DNA base composition, DNA - DNA homologie and long chain fatty acid studies on *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*. *J. Gen. Microbiol.* 130 : 357 - 362.

Fitzpatrick, J.J., et O'Keeffe, U. (2001). Influence of whey protein hydrolyzate addition to whey permeate batch fermentations for producing lactic acid. *Process Biochem.*, 37: 183-186.

Fitzsimmons, N.A., Cogan, T.M., Condon, S et Beresford, T. (1999). Phenotypic and genotypic characterization of non-starter lactic acid bacteria in mature cheddar cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3418-3426.

Fleming, H.R., Etechell, G.L et Costilow, R.N. (1975). Microbial inhibition by isolate of *pediococcus* from cucumber brine. *Appl. and Microbiology*, Vol. 30, pp. 104-1042.

Francois, Z.N., Nour El houda, Florance, F.A., Paul M.F., Félicite T.M et EL soda, M. (2007) . Biochemical properties of some thermophilic lactic acid bacteria strains from traditional fermented milk relevant to their technological performance as starter's cultures. *Biotechnology*.6 (1):14-21.

G

Garvie E. I. (1986). Gram positive cocci genus *Leuconostoc* in bergeys manual of systematic bacteriology, Vol: 2, 9th Ed. *Williams and Wilkins Co Baltimor*: 1071-1075.

Georgalaki, M. D., Papadelli, M., Anastasiou, R., Kalantzopoulos,G., et Tsakalidou, E. (2002). Purification and characterization of the X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase (PepX) from *Streptococcus macedonicus* and cloning of the pepX gene. *Le Lait*, 82, 657-671.

Gonzalez, C., Langdon, G.M., Bruix, M., Galvez, A., Valdivia, E., Maqueda, M et Rico, M. (2000). *Bacteriocin AS-48*, a microbial cyclic polypeptide structurally and functionally related to mammalian NK-lysin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*; 97: 11221-11226.

Guiraud, J et Galzy, P. (1980). L'analyse microbiologiste dans les industries alimentaires. *L'usine Noveli Paris* : 130 - 152.

H

Harris L., Daeschel M., Stiles M et Klaenhammer T. (1989). *Journal of Food Protection*, 52, 384.

Hemme, D., Nardi, M et Wahl, D. (1981). propriétés des lactico- déshydrogenases des *Streptococcus thermophilus* indépendantes du fructose (1-6) di phosphate. *Le Lait*, 6:1-18.

Hofvendahl, K et Hahn-Hagerdal, B. (2000). Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources(1). *Enzyme Microbiology and Technology*, 26:87-107.

Reference bibliographique

I

Isolauri, E., Sütas, Y., Kankaanpää, P., Arvilommi, H et Salminen, S. (2001). Probiotics Effects on immunity. *Am. J. Clin. Nutr.*, Vol. 73, N° 2. 444-450.

J

Joffin, J.N et Leyral, G. (1996). Microbiologie Technique tome 1, Dictionnaire des techniques. collection Biologie technique. Centre Régional de Documentation Pédagogique d'Aquitaine.

Jozala, A.F., de Lencastre Novaes, L.C., Cholewa, O., Moraes, D et Penna, T.C.V. (2005). Increase of nisin production by *Lactococcus lactis* in different media. *Afr. J. Biotechnol.* 4: 3, 262-265.

Juillard, V., Foucaud, C., Desmazaud, M.J et Richard, J. (1996). Utilisation des sources d'azote du lait par *Lactococcus lactis*. *Le lait* . 76 : 13 – 24.

K

Kacem, M et Karam, N. (2006). Physicochemical and microbiological study of «Shmen», a traditional butter made from camel milk in the Sahara (Algeria): isolation and identification of lactic acid bacteria and yeast. *Pakistan J. Biol. Sci.*, 9(5): 1042-1047.

Kandler, O et Weiss, N. (1986). Genus *Lactobacillus*. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Edited by P. H. A. Sneath NSM., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. Baltimore: *Williams and Willkins*; Vol 2: 1209-1234.

Karam N.E., Ziane M et Zadi-Karam H. (2009). Antibiorésistance des bactéries lactiques indigènes. *The International Congress: "Microbial Biotechnology for Development"*. 02-05 Novembre, Marrakech, Maroc. Communication num. CAI-92.

Karam, N. E. (1995). Constitution d'un soucier de bactéries lactiques a intérêt biotechnologique : Etude Biochimique et Moléculaire. Thèse de doctorat en biologie moléculaire, institut des sciences de la nature, Université d'Oran.

L

Lane, C.N et Fox, P.F. (1996). Contribution of starter and added lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *Int. Dairy*, J 6: 715-728.

Larpent, J.P., Larpent et Gurgeaud, M. (1990). Mémento technique de Microbiologie. *Tech. et Doc*, Lavoisier, Paris.

Law, J., et Haandrikman, A., (1997). Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 7: 1-11.

Lee J.Y., Kim C.J et Kunz, B. (2006). Identification of lactic acid bacteria isolated from kimchi and studies on their suitability for application as starter culture in the production of fermented sausages. *Meat Sci.* 72: 437-445.

Reference bibliographique

Leveau, J.Y., Bouix M et De Roissart, H. (1991). La flore lactique (chapitre3) technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. 3 Ed . *Tech et Doc Lavoisier*. Paris.

Luquet, F-M. et Corrieu, G. (2005). Bactéries lactiques et probiotiques. *Edition Lavoisier*, Paris. 307 pages.

M

Mansour et al. (2004). In **Boudjani, W.** (2009). Action de la flore lactique sur les bactéries contamination. Mémoire d'ingénieur, Institut de biologie, Université de Tlemcen. pages 73.

Martinez-Villaluenga, C et Gomez R. (2007). Characterization of bifidobacteria as starters in fermented milk containing raffinose family of oligosaccharides from lupin as prebiotic, *Instituto de Fermentaciones Industriales*.

Monnet, V., Chapot Chartier, M et Gripon, J.C., (1993). Les peptidases des lactocoques. Elsevier INRA lait 73. : 97-108.

N

Nancib A., Nancib N et Boudrant J. (2004). Effet des sources de carbones seules et mixtes sur la production d'acide lactique à partir de *Lactobacillus casei* Subsp. *rhamnosus*. Scientific study & research vol. Vol. (1-2). issn 1582-540X.

Novel, G. (1993). Les bactéries lactiques in : Microbiologie industrielle; les microorganismes d'intérêt industriel. Ed Technique et Documentation, Lavoisier, 614 p.

O

Ogunbanwo, ST., Sanni, A.I et Omilude, A.A. (2003). Characterization of lactobacilli in cheese. Journal of dairy research, 25, 431-438.

Orla-Jensen., (1919). The lactic bacteria. Hosled son. Copenhagen, 74: 131-142.

Özen, S et Özilgen, M. (1992). Effects of substrate concentration on growth and lactic acid production by mixed cultures of *Lactobacillus bulgaricus* and *Sterptococcus thermophilus*, *J. Chem. Tech. Biotechnol*, 54: 57-61.

P

Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E et Kotzekidou, P. (2003) Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Sci.* 65,859–867.

Petransxiene, D et Lapied, L. (1981). Qualité bactériologique du lait et des produits laitiers, 2 ème ed *Tec. Et Doc. Lavoisier*, 135 - 204.

Reference bibliographique

Prioult, G. (2003). Effet des probiotiques sur l'induction et le maintien de la tolérance orale à la β -lactoglobuline chez la souris et étude de leurs mécanismes d'action. Thèse université Laval Québec. Pt 1:217-221.

R

Rodrigues et al. (2002). In **Boudjani, W.** (2009). Action de la flore lactique sur les bactéries contamination. Mémoire d'ingénieur, Institut de biologie, Université de Tlemcen. 73 pages.

Rogosa, M. Franklin J.G et Perry, K.D. (1961). Correlation of the vitamin requirements with cultural and biochemical characters of *Lactobacillus subsp.* *Journal of General Microbiology* 1961, 24:473–482.

Ross, R.P., Galvin, M., Mc Auliffe, O., Morgan, S.M., Ryan, M.P., Twomey, D.P., Meaney, W.J et Hill, C. (1999). Developing applications for lactococcal bacteriocins. *Antonie van Leeuwenhoek.* 76: 337-46.

Rouissat, L et Bensoltane, A. (2006). Physico-chemical, microbiological and biotechnological studies of lactic acid bacteria isolated from ewe's milk of Algerian tow breeds (Ouled Djellal and El Hamra). *Egypt. J. App. Sci.* 21: (2b), 567-582.

S

Salminen, S. Deighton, M.A., Benno, Y et Gorbach, S.L. (1998). Lactic acid bacteria in health and disease. In *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*, 2nd ed. Edited by Salminen SVWA, eds.; 1998:211–253.

Samona, S et Robinson, R. K. (1991). Enumeration of bifidobacteria in dairy products. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 44, 64–66.

Sandine, W. E. (1988). New nomenclature of the non strapped lactic acid bacteria. *Biochimie* 70 : 519 - 522 .

Sanni, A. I., Morlon-Guyot, J et Guyot, J. P. (2002). New efficient amylase-producing strains of *Lactobacillus plantarum* and *L. fermentum* isolated from different Nigerian traditional fermented foods. *International Journal of Food Microbiology*, 72, 53–62.

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

Scannell, A.G.M., Schwarz, G., Hill, C., Ross, R.P et Arendt, E.K., 2001. Pre-inoculation enrichment procedure enhances the performance of bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* meat starter culture. *Int. J. Food Microbiol.* 64: 151-159.

Scardovi, V. (1986). *Bifidobacterium oenus* (ORLA J., 1924) in Bergey's Manual of Systematic bacteriology.

Schleiffr, K.H., Kraus, J et Dvorak, C. (1985) . Transfer of *Streptococcus lactis* and related *Streptococcus* the genus *Lactococcus* . Gen . Nou . Syst . Appl . Microbiol . 6 : 182 - 195.

Reference bibliographique

Schnürer, J., et Magnusson, J., 2005. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Food Sc. Technol.* 16 : 70-78.

Shirai .K, Guerrero . I, Huerta .S, Saucedo .G, Castillo. A, O Gonzalez .R et George M. (2001). Effect of initial glucose concentration and inoculation level of lactic acid bacteria in shrimp waste ensilation Hall. *Enzyme and Microbial Technology*: 446–452.

Schmitt, P., Diviès, C et Merlot, C. (1990). Utilization of citrate by *Leuconostoc mesentroides* subsp. *crémoris* In continious culture . *Biotechnol. Let.* 12 (2) : 127 - 130 .

Stackebrandt, E et Goebel, B.M., (1994). Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 846-849.

Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G.M., Grimont, P.A., Kampfer, P., Maiden, M.C., Nesme, X., Rossello-Mora, R., Swings, J., Truper, H.G., Vauterin, L., Ward, A.C et Whitman, W.B. (2002). Report of the ad-hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 1043-1047.

T

Tagg, J.R., Dajani, A.S et Wanamaker, L.W. (1976). Bacteriocin of Gram positif bacteria. *Bacteriol. Rev.* 40:702-756.

Terzaghi, B.E et Sandine, W.E. (1975). Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* 29: 807-813.

Thompson, J.K et Collins, M.A. (1989). Evidence for the conjugal transfer of a plasmid pVA797:pSA3 co-integrate into strains of *Lactobacillus helveticus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 9: 61-64.

Topisirovic L., Milan K., Djordje F., Natasa G., Ivana S et Jelena L. (2006). Potential of lactic acid bacteria isolated from specific naturel niched in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology.* 112: 230-235.

Z

Zambunelli, C et Chiavari, C. (2002). Effect of lactic acid bacteria autolysis on sensorial characteristics of fermented food. *Food Technol Biotechnology.* 40 : 347-351.

Zhennai, Y. (2000). Antimicrobial compounds and Extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: structures and properties. Academic Dissertation. Department of Food Technology, University of Helsinki, 61p.

Ziane M., Karam N.E et Zadi-Karam H. (2008). Transfert d'ADN entre *Streptococcus thermophilus*, *Pediococcus* et *lactobacillus* : cas des gènes de résistance à la tétracycline. SIBA08: *La biotechnologie au service du secteur Agroalimentaire.* 17 et 18 juin 2008, Blida, Algérie.