République Algérienne Démocratique & populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique

Université de Médéa

Faculté des sciences

Mémoire en vue de l'obtention du Diplôme de **Master**

En Biologie

Spécialité : Biotechnologie et microbiologie appliquée

Thème :

Evaluation de l'activité antimicrobienne de quelques souches lactiques locales à l'égard de certains contaminants d'origine alimentaire.

Soutenue publiquement le : 21/06/2018

Présenté par :

- **Mlle. ALLAM Soumia**

Devant le jury :

Président :	**M. KHAMES Maamar**	**MCA**	**Université de Médéa**
Encadreur :	**M.BOUBAKRI Kamel**	**MAA**	**Université de Médéa**
Examinateurs :	**Mme. BOUHERAMA Amina**	**MAB**	**Université de Médéa**
	M.RAHAL Mohamed	**MAA**	**Université de Médéa**

Année universitaire : 2017/2018

Remerciements

Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, de m'avoir donné la force et la patience pour achever ce travail.

J'exprime d'abord mes profonds remerciements et ma vive reconnaissance à **Mr BOUBAKRI Kamel** pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique. Sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'elle m'a accordée m'ont permis de réaliser ce travail.

Nous tenons à adresser nos sincères remerciements aux honorables membres de jury qui nous font l'honneur d'évaluer ce mémoire:

Mr. KHAMES Maamar d'avoir accepté la présidence de jury, par ses conseils éclairés.

Mme BOUHERAMA Amina, pour avoir accepté de faire partie du jury, par ses conseils et remarques elle contribuera à améliorer la qualité de ce travail.

Mr. RAHAL Mohamed, pour sa participation à l'évaluation de ce mémoire, ses remarques ne feront qu'apporter un plus à ce travail.

Nos plus sincère gratitude à notre respectable Doyen Professeur **OUMOUNA Mustapha**, qui nous a facilité à suivre nos travaux dans les LPB, et mis à notre disposition le laboratoire pour mener bien ce travail.

Au terme de ce travail, nous aimerions présenter nos vifs remerciements et notre profonde reconnaissance à tous nos enseignants du département de Biologie de l'université de Médéa. A vous tous, un grand merci.

DEDICACES

Je dédié ce travail dans le sentier **d'ALLAH** le tout puissant, le miséricordieux Qui nous a guidé et nous a donné force et le courage pour mener ce travail à bout.

Mon père Mr. ALLAM Ahmed

Tu es un pilier solide et incontournable pour ma personne et mon parcours, que **Dieu** te donne santé et longue vie .

Ma mère, HAMADOU Zohra

Tu es une Source de ma vie et de bonheur, toutes les lettres ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance pour tous les sacrifices qu'ils ont bien voulu consentir pour nous, c'est tout simplement, que nous souhaitons que **Dieu**
te donne santé et longue vie.

À mes chérs fréres: Rabah et Smail

À mes chérs sœurs: Karima, Dalal, Imane et Maroua

A mes chère neveu: Wail, Mirale, Iyad, Rinad et Aroua

A toutes mes amis, qui ma compagne durant tous ces années, merci pour votre aides je ne vous jamais oublierais.

ALLAM Soumia

Evaluation de l'activité antimicrobienne de quelques souches lactique locales à l'égard de certains contaminants d'origine alimentaire

Résumé

La présente étude a pour objectif de mettre en évidence l'effet antagoniste d' vignt-neuf (29) souche lactiques autochtone de kaddid vis-à-vis des autres souches indicatrices notamment endogène du même produit.

Dans le premier temps, nous avons identifiées quelques souches endogènes indicatrices, on utilisant des approches physiologique et morphologique, cette partie a aboutit a pré-identifier quelque souche comme : *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter amnigenus*, *Enterobacter aerogenes* , *Pseudomonas luteola* et *Eshirichia coli* et des souches fongiques de *Rhizopus* sp, *Penicilium* sp et *Saccharomyces cerevicea* ainsi d'autres souches non-identifiées.

Dans le premier screening de l'activité antibactérienne par contacte direct nous avons constaté que parmi les 29 souches lactiques étudiées, 26 souches possèdent une activité antibactérienne vis-à-vis : *Enterobacter amnigenus* C_1, *Streptococcus* sp C_2, *Staphylococcus aureus* C_3, *Pseudomonas luteola* C_4, *Pseudomonas* sp C_5 et *En.aerogenes* C_6. La souche *E.coli* C_7 n'a pas montrée une sensibilité vis-à-vis les toutes les souches lactiques utilisées.

Le screening de l'activité antifongique par contacte directe a montré une forte activité antifongique vis-à-vis la levure endogène C_3J_7, *Penicillium* sp et *Rhizopus* sp et aucune souches actifs contre *Saccharomyces cerivecea*.

La caractérisation partielle des métabolites inhibiteurs des surnageants actifs montrent une stabilité de l'activité des surnageants traités seulement par la catalase, et la perte de l'activité avec ceux neutralisés et les surnageants neutralisé et catalisé. Le traitement par les enzymes protéolytiques (protéinase K, trypsine, présure) et l' α-amylase ne change pas significativement l'activité inhibitrice. Enfin la détermination de stabilité des surnageants à différentes températures 45, 70, 100 et 120°C pendant 20 min montre qu'aucune perte d'activité antifongique n'à été observé.

Mots clés : Souches lactique, effet antagoniste, souches indicatrices, activité antibactérienne, activité antifongique.

.

Evaluation of the antimicrobial activity of some local lactic acid strains with respect to certain food borne contaminants.

Abstract

The curent study aims to demonstrate the antagonistic effect of twenty ninth (29) indigenous lactic kaddid strains with respect to the other endogenous indicator strains of the same product.

Primely, we have identified some endogenous indicator strains, using physiological and morphological approaches, this part has resulted in pre-identifying some strain as: Staphylococcus aureus, Enterobacter amnigenus, Enterobacter aerogenes, Pseudomonas luteola and *Eshirichia coli* and strains of *Rhizopus* sp, *Penicilium* sp and *Saccharomyces cerevicea* and other unidentified strains.

In the first screening of antibacterial activity by direct contact we found that among the 29 lactic strains studied, twenty sixth (26) strains had antibacterial activity with respect to: *Enterobacter amnigenus* C_1, *Streptococcus* sp C_2, *Staphylococcus aureus* C_3, *Pseudomonas luteola* C_4, Pseudomonas sp C_5 and En.aerogenes C_6. E. coli strain C_7 did not show sensitivity to all the lactic strains used.

Screening of the antifungal activity by direct contact showed strong antifungal activity against the endogenous yeast C_3J_7, *Penicillium* sp and *Rhizopus* sp and no active strains against *Saccharomyces cerivecea.*

Partial characterization of the inhibitory metabolites of the active supernatants show a stability of the activity of the supernatants treated only by catalase, and the loss of activity with those neutralized and supernatants neutralized and catalised. Treatment with proteolytic enzymes (proteinase K, trypsin, rennet) and α-amylase did not significantly change inhibitory activity. Finally, the stability determination of the supernatants at different temperatures 45, 70, 100 and 120 ° C for 20 min shows that no loss of antifungal activity was observed.

Key words : Lactic strain, antagonistic effect, indicator strains, antibacterial activity, antifungal activity.

تقييم النشاط المضاد للميكروبات لبعض سلالات حمض اللاكتيك المحلي فيما يتعلق ببعض الملوثات المنقولة بالغذاء

ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تسليط الضوء على خصم تأثير تسعة و (29) سلالة السكان الأصليين اللبنيك القديد وجها لوجه البعض الذاتيةسلالات المؤشرة معينة من نفس المنتج.

في البداية، حددنا بعض السلالات المؤشرات المحلية، وذلك باستخدام الخصائص الفزيولوجية و المورفولوجية، وقد أدى هذا الجزء ما قبل تحديد بعض سلالة كما *Staphylococcus aureus, Enterobacter amnigenus,* *Eshirichia coli* ،*Enterobacter aerogenes , Pseudomonas luteola* و السلالات الفطرية sp *Rhizopus* و sp *Penicilium* و *Saccharomyces cerevicea* وغيرها من السلالات غير المعروفة.

في الفرز الأول من النشاط المضاد للبكتيريا من خلال الاتصال المباشر وجدنا أن من بين 29 دراسة سلالات اللبنية، 26 سلالات تمتلك النشاط المضاد للبكتيريا وجها لوجه: *Enterobacter amnigenus* C_1, *Streptococcus* sp C_2, *P* و , *Pseudomonas luteola* C_4, *Staphylococcus aureus* C_3, *Pseudomonas* sp C_5 و *En.aerogenes* C_6 لم تظهر *E.coli* C_7 حساسية لجميع السلالات اللبنية المستخدمة.

وأظهر فحص نشاط مضاد للفطريات عن طريق الاتصال المباشر قوي نشاط مضاد وجها لوجه مع الذاتية الخميرة C_3J_7، *Penicillium* sp و *Rhizopus* sp، وليس لها نشاط ضد سلالات خميرة *Saccharomyces cerivecea* .

التخيص الجزئي للنواتج المثبطة لطافي وسط الزرع تظهر نشاط مستقر للطافي المعالج فقط مع الكاتلاز . و فقدان العمل مع تلك القاعدية و القاعدية مع الكاتلاز . العلاج مع الانزيمات المحللة للبروتين (بروتين K , التربسين , المفحة) و α الاميليز لا يغير النشاطات المثبطة الى حد كبير . و اخيرا , فان تحديد استقرار طافي وسط الزرع عند درجات حرارة 45, 70, 100 و 120. درجة مئوية لمدة 20 دقيقة يظهر عدم فقدان النشاط مضاد للفطريات .

الكلمات المفتاحية : تأثير عدائي, سلالات اللبنية, سلالات المؤشرة, نشاط مضاد للبكتريا و نشاط مضاد للفطرت.

Table des matières

Table des Matières

Liste des tableaux ;
Liste des figures ;
Liste des photos ;
Liste des abréviations.

Introduction…… 01

Synthèse Bibliographique

Chapitre I : les bactéries lactiques

I. Bactéries lactiques…….. 03
I.1. Généralité sur les bactéries lactiques……... 03
I. 2. Habitat……. 03
I .2 .1.Présence des bactéries à l'état libre dans l'environnement……. 03
I.2 .2.Présence des bactéries lactiques en association avec un hôte……... 04
I. 3. Taxonomie des bactéries lactiques……. 04
I. 4. Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques…… 05
I. 4.1. Le genre Lactobacillus…… 05
I. 4.2. Le genre Lactococcus…….. 06
I. 4.3. Le genre Leuconostoc……. 07
I.4.4. Le genre Streptococcus……. 07
I. 4.5. Le genre Vagoccoccus……. 08
I.4.6. Le genre Enterococcus…….. 08
I. 4.7. Le genre Aeorococcus, Pediococcus et Tetragenococcus……... 08
I. 4.7.1. Pediococcus…….. 08
I. 4.7.2. Tetragenococcus……... 09
I. 4.7.3.Weissella…… 09
I.4.Culture des bactéries lactiques ……. 10
I.5.Métabolisme des bactéries lactiques……. 11
I.6. Intérêt des bactéries lactiques…….. 12
I.6.1.Dans l'industrie alimentaire…… 12
I. 6. 2. Dans le domaine thérapeutique……. 12

Chapitre II. Les métabolites antimicrobiens des bactéries lactiques

II.1.Introduction …… 14
II.2. Compétition nutritionnelle……. 14
II.3. Les substances antimicrobiennes des bactéries lactiques…….. 14
II.3.1. Le pH et les acides organiques……... 14
II.3.2.Le peroxyde d'hydrogène…… 15
II.3.3. Le dioxyde de carbone…… 15
II.3.4. Le diacétyl…….. 15
II.3.5. La reutérine……. 15
II.3.6. Les bactériocines…… 15
II.4.Utilisation des bactéries lactiques productrices de bactériocine……. 16
II.5. Définition des bactériocines ……. 17
II.5.1. Classification des bactériocines ……. 17
II.5.1.1. Classe I……. 17
II.5.1.2. Classe II……... 18
II.5.1.3. Classe III…….. 19
II.5.1.4. Classe IV…….. 19
II.5.2.La production des bactériocines…….. 19
II.5.3. Le conditionnement des bactériocines…… 20
II.5.4. Domaines d'application des bactériocines…….. 20
II.5.5.Les bactéries productrices de bactériocines …… 20
II.6. Les substances antifongiques …… 21
II.6.1.Les composés antimycotoxinogène des bactéries lactique…….. 21
II.6.2.Mode d'actions des composés antimycotoxinogène des bactéries lactiques... 22
II.6.2.1Mode d'action des bactériocines……... 22

II. Matériel et méthodes

I-Objectif…… 23
II.2.Matériel…… 23
II.2.1. Matériel biologique…… 23
II.2.1.1. Les souches indicatrices…… 23
II.2.1.2. Les souches lactiques…… 24
II.2.2. Milieux de culture…… 24
II.2.3. Produits chimiques et réactifs…….. 25
II.3. Méthodes…… 25
II.3.1. Purification des souches……... 25
II.3.2. Examen macroscopique…….. 25

II.3.3. Examens microscopiques…… 25
II.3.4. L'état frais…….. 25
II.3.5. Coloration de Gram…… 25
II.3.6. Identification biochimiques…… 26
II.3.6.1. Recherche de la catalase…….. 26
II.3.6.2. Test de la coagulase……. 26
II.3.6.3. Galeries biochimiques……. 26
II.4. Identification du genre des souches fongiques…….. 27
II.4.1. Technique de micro culture……. 27
II.5. Conservation des souches……... 28
II.5.1. Conservation courte durée ……. 28
II.5.2. Conservation longue durée ……. 28
II.6. Revivification des souches……. 28
II.7. Screening de l'activité antagoniste des souches lactiques…… 29
II.7.1.Activité antibactérienne…….. 29
II.7.1.1. Méthode de spots (contacte directe)……. 29
II.7.1.2.Méthode de puits (contacte indirecte) …… 29
II.7.2. Screening de l'activité antifongique des souches lactique……. 30
II.7.2.1 Préparation de l'inoculum……. 30
II.7.2.2. Méthode de double couche (contacte directe)…… 31
II.7.2.3. Méthode de diffusion par puits (contacte indirecte)……. 31
II.7.3. Caractérisation de l'agent inhibiteur des surnageants actifs……... 32
II.7.3.1. Inhibition due à la production des acides organiques……. 33
II.7.3.2. Inhibition due au peroxyde d'hydrogène……. 33
II.7.3.3.Effet des enzymes digestifs……... 34
II.7.3.4.Effet de température…….. 34

III. Résultats et Discussion

III.1. Caractérisation morphologique et physiologique des souches……..... 35
III.1.1. Caractérisation des souches lactiques……..... 35
III.1.2. Test catalase…….. 35
III.1.3. l. Caractérisation des souches indicatrices……. 37
III.1.3.1.Caractérisation des bactéries indicatrices endogènes……... 37
III.1.3.2. Caractérisation des souches fongiques ……..... 38
III.2.3. Identification biochimique des bactéries indicatrices endogènes ……. 42
III.2.3.1.Test catalase ……. 42
III.2.3.2.Test de coagulase ……..... 42

III.2.3.3. Profile biochimique des souches identifiées……... 42
III.3. Résultats de l'activité antibactérienne des souches lactiques…… 45
III.3.1. Contacte directe (test de spots)…….. 45
III.3.2. Contacte indirecte (test de puits) …….. 48
III.4. Résultats de l'activité antifongique des souches lactiques…… 49
III.4.1. L'activité antifongique par contacte directe: méthode de double couche..... 49
III.4.2.Détection de la nature de l'agent inhibiteur des souches actives……. 53
III.4.3. Caractérisation partielle des métabolites antifongiques…….. 54

Conclusion et perspectives……..... 60

Références bibliographiques
Annexes

Liste des tableaux

Tableau 1. Principaux genres de bactéries lactiques……. 10
Tableau 2. Exemple d'utilisation des bactéries lactiques en industrie alimentaire…… 12
Tableau 3. Souches productrices de bactériocines…… 21
Tableau 4. Présentation de souches indicatrices……... 24
Tableau 5. Présentation de souches lactiques utilisées……. 24
Tableau 6. Les caractères microscopiques et test catalase des bactéries lactiques……... 37
Tableau 7. Les caractères microscopiques des souches indicatrices endogènes……... 38
Tableau 8. Identification macroscopique des moisissures…… 39
Tableau 9. Identification microscopique des moisissures……. 39
Tableau 10. Caractérisation macroscopique des levures……... 40
Tableau 11. Résultats d'identification biochimique la souche endogène *S. aureus* C_3…… 43
Tableau 12. Résultats des tests physiologiques et biochimiques des *Enterobacteriacae*…..…..... 44
Tableau 13. Résultats de l'activité antibactérienne des surnageants natifs (mm)……. 49
Tableau 14. Résultats de l'activité antifongique par méthode de double couche……. 51
Tableau 15. Résultats de l'activité antifongique des surnageants natifs (mm)……. 54
Tableau 16. Détermination de la nature de l'agent inhibiteur et activité inhibitrice (mm)……... 55
Tableau 17. Activité inhibitrice des surnageants natifs traités par les enzymes digestifs (mm)….. 56
Tableau 18. Activité antifongique des surnageants traités avec les différentes températures (mm). 57

Liste des figures

Figure 1. Arbre phylogénique des bactéries lactiques : a : comparé avec les genres *Areococcus, Listeria, Staphylococcus* et *Bacillus* et b : avec d'autre Gram positif sur. L'arbre est produit suivant la méthode de neighbor-joining…….. 05
Figure 2. *Lactobacillus bulgaricus* au microscope électronique…….. 06
Figure 3. *Lactococcus lactis sub sp lactis* au microscope électronique…… 06
Figure 4. *Pediococcus* au microscope électronique…….. 09
Figure 5. Les voies métaboliques des bactéries lactiques…….. 11
Figure 6. Model des mécanismes d'action des bactériocine selon trois model……... 22
Figure 7. Galerie API 20 E……... 27
Figure 8. Technique de Micro culture pour l'identification microscopique des moisissures…... 28
Figure 9. La recherche de l'activité antibactérienne par la méthode des puits……. 30
Figure 10. Schéma d'une portion de la lamelle…… 31
Figure11. Arbre décisionnel des modalités d'identification des produits responsables de l'inhibition portant sur la question de la croissance des souches indicatrices……... 33
Figure 12. Les moyens des diamètres d'inhibition en (mm) par contact direct…… 46
Figure13. Représentation des moyens de diamètre d'inhibition en (mm) pour chaque souche indicatrice…….. 47
Figure 14. Représentation en (%) des souches lactiques sélectionnées par contact direct……... 48
Figure 15. La répartition en (%) de l'activité antibactérienne des souches sélectionnées au sein de chaque genre lactique…… 49
Figure16. Pourcentage (%) des souches fongique sensible a l'activité antifongique des souches lactique par contacte directe……. 51
Figure 17. La répartition en (%) de l'activité antifongique des souches active au sein de chaque genre lactique…… 51

Liste des photos

Photo 1. Aspect des bactéries lactiques [a]: sur gélose MRS, [b]: sur bouillon MRS…… 35
Photo 2. Observation microscopique de quelque souche lactique [a]: cocci, [b]: long bacille, [c]: cocci ovoïde, [c] : bacille…….. 36
Photo 3. L'observation microscopique de la souche *S.aureus* (C_3)……. 38
Photo 4. Observation microscopique des levures: [a] : levures endogène (C_3J_7); [b] : *Saccharomyces cerevicea*…….. 41
Photo 5 : Résultats de profile biochimique des Entérobactéries utilisés [a] : *Pseudomonas luteola* ; [b] : *Enterobacter amnigenus*; [c] : *Enterobacter aerogenes*…….. 42
Photo 6. Résultats de profile biochimiques de la souche *Staphylococcus aureus*…….. 43
Photo 7. Activité inhibitrice de bactéries lactiques par contact direct. [a] : *Salmonella* sp ; [b] : *Streptococcus* sp……..... 45
Photo 8 : L'activité antifongique des souches lactiques par contacte directe ; [a] : BL_{11} contre *pénicillium* sp ; [b]: BL_{23}*Rhizopus*sp; [c] : BL_{11} contre la levure endogène C_3J_7……..... 52
Photo9 : Résultats de l'activité Anti-levure (C_3J_7) des surnageants natifs des souches *Leuconostoc* BL13, *Leuconostoc* BL15, *Lactococcus* BL16, *Lactobacillus* BL17……..... 53
Photo 10: Résultats de l'activité antifongique des surnageants natifs et traités [a]: *Pediococcus* BL25 contre *Rhizopus* sp; [b]: *Enterococcus* BL6 contre *Pénicillium* sp; [c]: *Lactobacillus* BL11contre la levure C_3J_7..... 54
Photo 11. L'activité antifongique des surnageants traité par les enzymes (protéinase K, trypsine, présure et α-amylase). [a] : BL1 contre la levure C_3J_7; [b]: BL6 contre *Rhizopus* sp C_5J_0; [c] : BL6 contre *Pénicillium* sp C_7J_0..... 56
Photo 12. Effet de traitement thermique sur les surnageants natifs [a] : *Lactobacillus* BL1 contre la levure C3J7; [b]: *Lactobacillus* BL24 contre *Rhizopus* sp…….. 58

Liste des Abréviations

❖ Unités de mesure

°C : Degré Celsius
N : Normalité
Mm : Millimètre
mL: millilitre
µL: microlitre
% : Pourcentage
g/l : gramme par litre
Da : Dalton
UFC : Unité Formant Colonie
UFT : Unité Formant Trouble
mm^3 : Millimètre cube
h : heur

❖ Autres abréviations

ARNr : Acide Ribonucléique Ribosomique
ATP : Adénosine triphosphate
BL : Bactéries lactiques
BI : Bactéries indicatrices
MRS : de Man-Rogosa et Sharp
N : Nombre de colonies
PBS : Tampon phosphate saline
PDA : Potato dextrose agar
ADN : Acide Désoxyribonucléique

SFB : Bouillon Sélénite plus Cystéine
SS : Gélose *Salmonella-Shigella*
VP : Vogues-Proskaeur
TDA : Tryptophane Désaminase
MH : Muller Hinton
sp : Espèce non précisée
BHI: Brain heart infusion
PH : Potentiel d'Hydrogène
SF : Souche fongique

EMP : Embden-Meyerhof-Parnas
GAP : phosphate glycéraldéhyde mole

Introduction

La préservation des aliments se base essentiellement sur le retard ou l'inhibition de la croissance des microorganismes contaminants. Les méthodes physiques et chimiques de préservation provoquent des altérations de qualité nutritionnelle et organoleptique des aliments et une diminution de leur utilité suite au développement des résistances par les pathogènes. La résistance est attribuable à l'utilisation abusive et souvent prolongée des produits chimiques. Ce qui aux souches de développer des mécanismes de résistance. Face à ces problèmes La recherche scientifique s'oriente vers une nouvelle théorie qui est la bio préservation **(Gould, 2000).**

La biopréservation est une alternative très prometteuse , ceci par l'efficacité d'action et l'omniprésence des agnts antagonistes, leur diversité et leur persistance dans l'environnement. des travaux ont rapporté l'éxistence au sein de certains microorganismes des souche capables de controler la croissance fongiques telles que *Bacillus*, *Streptomyces*, *Burkholderia* et *Trichoderma* …etc, mais certains d'entre eux sont responsables des problèmes sanitaires . Les antagonistes doivent etre capables d'assurer sainement la biopréservation et tolérables par l'homme et les animaux . parmi ceux-ci les bactéries lactiques non seulement connues pour leur innocuité mais aussi pour leurs activités antimicrobiennes pourraient permettre la réduction de l'utilisation des produits chimiques dans les aliments (**Djossou et** *al.*, **2011)**. La présence des moisissures dans un produit alimentaire peut améliorer les qualités organoleptiques ou au contraire d'altérer et conduire à l'accumulation de métabolites secondaires toxiques comme les mycotoxines.

La recherche sur les bactéries lactiques, qui ont un role dominant dans la production de beaucoup de produits fermentées, a continué à avancer à une vitesse très impressionnante vers la fin du 20^{e} siècle. La capicité de manipuler et de controler ces microorganismes a atteint maintenant un niveau considérable **(Capllice et Fitzgerald, 1999)**.

Actuellement, les scientifiques exploitent les interactions microbiennes des bactéries lactiques pour réduire d'une façon considérable la présence des microorganismes indésirables et nuisibles . En plus de l'effet protecteur de l'acide lactique , l'acide acétique , le diacetyle et le peroxyde d'oxygène, etc. la découverte des bactériocines a donné un élan pour le développement d'aliments de qualité sanitaire meilleure **(Mami, 2013).**

Des efforts considérables ont été consacrés au cours de ces cinquante dernieres années pour affermir la compréhension de la physiologie , de la biochimie et de la génétique des BL **(Marroki et** *al.*, **2010; Djadouni et Kihal, 2012)**. Toutes ces recherches ont permis aux microbiologistes et aux industriels de choisir les meilleures souches et d'améliorer le rendement de la productivié , la qualité , et la sécurité des produits finis .

Ces dernière années l'intérêt de l'emploi de la bactériocine et ou tout autre BL productrice de substances inhibitrices pour des applications de bio-préservation a suscité beaucoup de recherches (**Vermeiren et** *al*.**, 2004; Guessas, 2007 et Saidi, 2007).**

L’isolement et la sélection des starters lactiques d’intérêt technologique a partir des processus naturels comme le « kaddid », est l’un des moyens les plus prometteurs pour des fins scientifique et commerciaux, ainsi nous nous sommes intéressé a cette problématique a fin de contribuer a l’apport des données concernant les starters lactique autochtone.

Le présent travail s’intéresse à la sélection des souches antagonistes parmi une collection de vingt-neuf (29) souches lactique autochtone de Kaddid Algérien, ainsi nous nous sommes intéressés plus particulièrement par la caractérisation partielle des métabolites inhibiteurs majeurs et/ou les bactériocines.

Notre présent manuscrit est divisé en trois parties, la première est consacrée à une synthèse bibliographique articulée autour de deux chapitres qui vont traiter les bactéries lactiques, et les principales caractéristiques des bactéries lactiques et leurs métabolites antimicrobiens. La deuxième partie va regrouper les méthodes mis en œuvre dans le cadre de la réalisation de ce travail. Les résultats obtenus sont alors exposés et discutés dans la troisième partie. Une conclusion générale résumera les principaux acquis de ce travail avec les perspectives envisagées pour la poursuite de la recherche.

Synthèse bibliographique

Chapitre I

Les bactéries lactiques

Chapitre I. les bactéries lactiques

I. Bactéries lactiques

Le terme de bactéries lactiques (BL) est intimement associé aux bactéries impliquées dans la fermentation des aliments pour l'homme et l'animal. La première culture pure était des *Bacterium lactis* probablement des *Lactococcus lactis*, obtenue par Lister en 1873. Historiquement, les genres *Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus* et *Streptococcus* ont été les premiers à être décrits **(Guiraud, 2003).**

I.1. Généralité sur les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des bactéries qui regroupent 12 genres dont les plus connus sont *Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus et Streptococcus*. Ces bactéries peuvent avoir des formes en bâtonnets ou en coques (**Makhloufi, 2011).**
Bien que les bactéries lactiques soient génétiquement différentes, elles ont néanmoins un certain nombre de caractéristiques communes, Elles sont non pigmentées, aérobie anaérobie facultatives, Gram-positif, catalase négatives et tolérantes à des pH acides **(Dortu, 2008).**

Les bactéries lactiques sont ubiquistes, elles sont retrouvées dans différentes niches écologiques comme le lait et les produits laitiers, les végétaux, la viande, le poisson, les muqueuses humaines et animales ainsi que dans le tractus digestif, ce qui explique leur température de croissance hétérogène (**Makhloufi, 2011).** Les bactéries lactiques sont couramment utilisées dans les fermentations laitières pour produire des acides et des arômes (**Lamontagne et** *al.***, 2002).**

I. 2. Habitat

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

I .2 .1.Présence des bactéries à l'état libre dans l'environnement

Dans l'environnement, les bactéries lactiques sont souvent retrouvées dans le lait et ses dérivés (lait fermenté, fromages, etc.). Les différentes espèces de *Lactobacillus, Lactococcus lactis* (*Lc.lactis*) et/ou *Lc.garvieae,* les plus rencontrées dans le lait et le fromage, sont communément utilisées comme ferments (culture starter) par l'industrie agroalimentaire pour la production de produits laitiers. Un ferment désigne un microorganisme, bactérie ou champignon, responsable de la fermentation. Aussi, les bactéries lactiques sont à l'origine de la fermentation utilisée pour la préparation de boissons à partir de plantes (boza, cidre, etc.).
Parmi elles, on distingue des espèces appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Leuconostoc* **(Gálvez et** *al.,* **2011).** Les bactéries lactiques sont capables de survivre dans des milieux très acides en raison de leur production d'acide lactique. De plus, l'acidification du milieu participe à l'inhibition de la croissance de certains microorganismes pathogènes, tels que

Listeria monocytogenes (L.monocytogenes). Cette espèce bactérienne pathogène présente dans les aliments (lait, fromage, boissons) est responsable d'infections graves comme la listériose chez l'homme, qui affectent en particulier la femme enceinte **(Gálvez et *al*., 2011).**

I. 2 .2.Présence des bactéries lactiques en association avec un hôte

Les bactéries lactiques peuvent vivre en symbiose entre elles et avec un hôte. La symbiose est une association intime et durable entre deux organismes hétérospécifiques (espèces différentes), parfois plus. Le tractus gastro-intestinal des mammifères est colonisé par des bactéries lactiques telles que *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, et *Weissella*. Par ailleurs, l'appareil génital chez la femme est principalement colonisé par des bactéries lactiques, telles que *Lactobacillus*, auxquelles il apporte des nutriments comme le glycogène.
En acidifiant le milieu, ces bactéries apportent une protection contre des pathogènes responsables d'infections vaginales comme *Trichomonas vaginalis* (*T.vaginalis*), pathogène responsable de la trichomonase vaginale **(Björkroth et Holzapfel, 2006 ; Ruiz et *al*., 2009)** et/ ou *Candida albicans* à l'origine de la vulvo-vaginite **(Pirotta et *al*., 2004 ; Falagas et *al*., 2006).**

I. 3. Taxonomie des bactéries lactiques

Depuis la description du *Bacterium lactis* (actuellement *Lactococcus lactis*), la taxonomie des bactéries lactiques est en évolution permanente. Le nombre de nouvelles espèces a augmenté énormément au cours de ces dix dernières années. Les réorganisations effectuées ont contribué à fusionner des espèces en une seule, ou identifier une espèce comme un nouveau genre **(Pot, 2008)**.

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

La morphologie est considérée comme la caractéristique clé pour décrire et classifier les genres des bactéries lactiques. De ce fait, les bactéries lactiques peuvent être divisées arbitrairement en bacilles (*Lactobacillus* et *Carnobacterium*) et coques (tous les autres genres). Le genre *Weissella*, récemment décrit, est le seul genre qui comporte à la fois des bacilles et des coques **(Collins et *al*., 1993)**.

À ce groupe de bactéries lactiques, appartient plusieurs genres comme *Aerococcus, Atopobium, Carnobacterium, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc,*

Oenococcus, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus, Vagococcus et *Weissella*. **(Pot, 2008)**. Des genres nouveaux, par exemple *Alloiococcus, Dolosicoccus, Dolosigranulum, Eremococcus, Facklamia, Globicatella, Helococcus, Ignavigranum* et *Lactosphaera*, ont également été décrits, comportant des souches qui montrent des liens physiologiques et phylogénétiques avec les groupes des bactéries lactiques **(Broadbent, 2001 ; Axelsson, 2004)**.

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

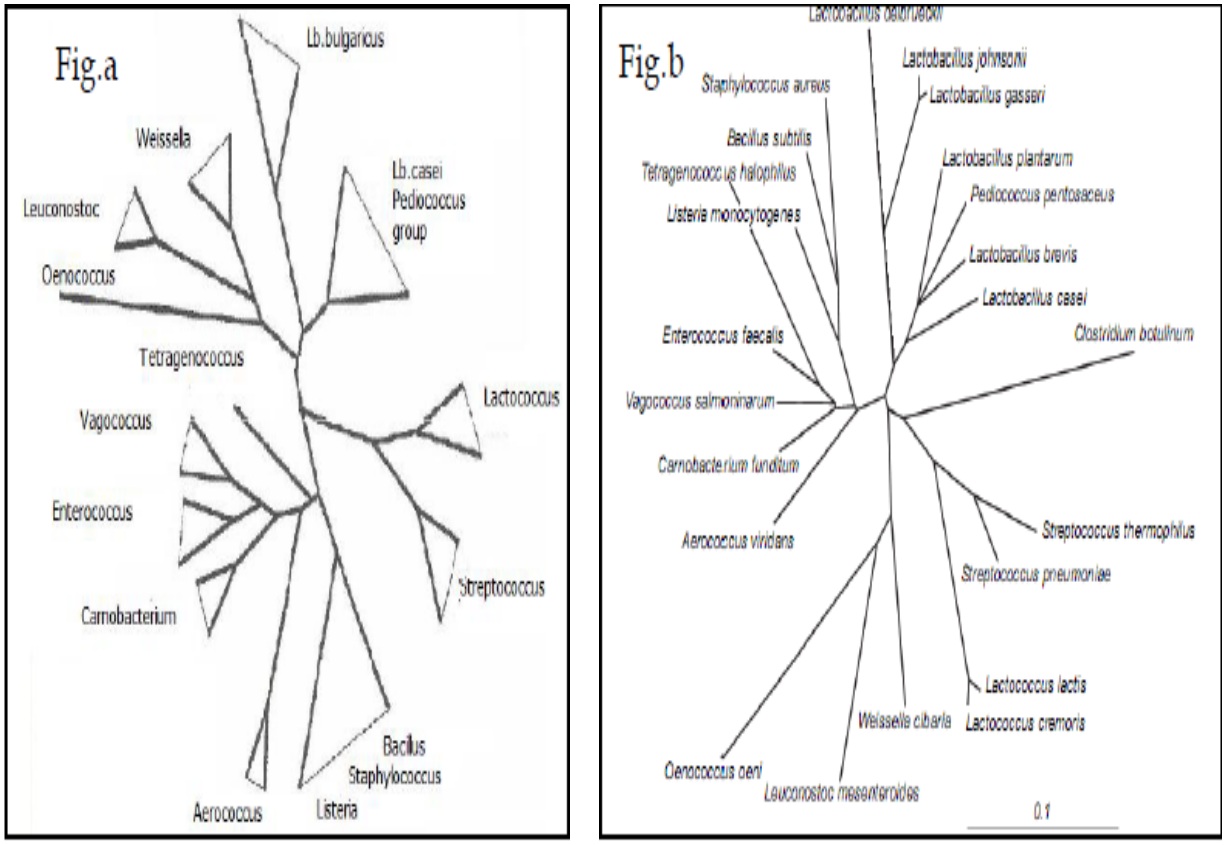


Figure 1. Arbre phylogénique des bactéries lactiques : a : comparé avec les genres *Areococcus, Listeria, Staphylococcus* et *Bacillus* **(Axelsson, 2004)** et b : avec d'autre gram positif (basée sur ARNr 16s).l'arbre (non-raciné) est produit suivant la méthode de neighbor-joining **(hutkins.RW, 2006)**

I. 4. Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques

I. 4.1. Le genre *Lactobacillus*

Famille I : *Lactococcaceae*

Genre I : *Lactobacillus*

Lactobacillus est le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae,* il contient de nombreuses espèces qui sont des agents de fermentation lactique intervenant dans de nombreuses industries ou qui sont rencontrées comme contaminants. Il s'agit de bacilles longs et fins (parfois incurvés) souvent groupés en chaines (figure 2), immobiles, asporulés, catalase négative, se développent à un optimum de température situé entre 30 et 40°C. Les lactobacilles ont des exigences nutritionnelles très complexes en acides aminés, en vitamines, en acides gras, en nucléotides, en glucides et en minéraux (**Leclerc et *al.*, 1994)**.

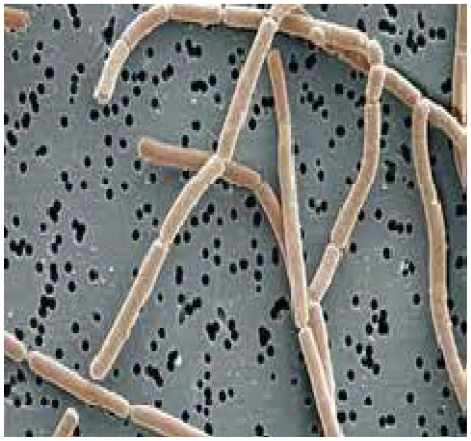


Figure 2. *Lactobacillus bulgaricus* au microscope électronique.
(www.bioweb.usu.edu).

I. 4.2. Le genre *Lactococcus*

Famille VI : *Streptococcaceae*

Genre II: *Lactococcus*

Le genre *Lactococcus* (streptocoque du groupe N) représente les streptocoques dits «lactiques», car ils sont associés à de nombreuses fermentations alimentaires et ne possèdent aucun caractère pathogène. Les produits végétaux constituent leur réservoir principal, mais ils sont largement présents dans le lait et les produits laitiers **(Pilet et *al.,* 2005)**. Les lactocoques se présentent sous forme de coques en paires ou en chaines de longueur variable (figure 3). Ce sont des bactéries anaérobies facultatives homofermentaires ne produisant que de l'acide lactique L(+), seul *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* produit le diacétyle. Leur température optimale de croissance est proche de 30°C, capables de se développer à 10°C, mais pas à 45°C.

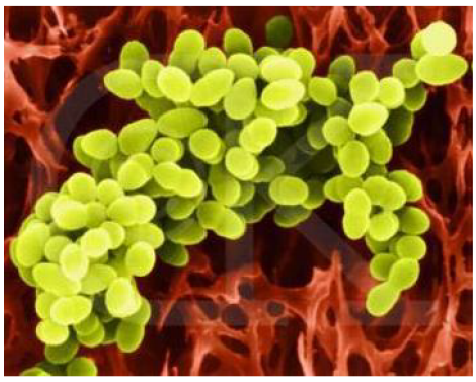


Figure 3. *Lactococcus lactis* sub sp *lactis* au microscope électronique.
(www.bioweb.usu.edu).

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

I. 4.3. Le genre *Leuconostoc*
Famille V: *Leuconostocaceae*
Genre I: *Leuconostoc*
Ils représentent les coques hétérofermentaire marqué, avec production d'acide lactique (isomère D), de CO_2 et d'éthanol, et se regroupent en paires ou en chainettes mésophiles. Les caractéristiques telles que l'hydrolyse de l'esculine, la formation de dextrane, les conditions de croissance, la capacité à croitre à différents pH et température, l'assimilation de citrate et/ou malate permettent la différenciation entre les genres *Leuconostoc* et *Weissella* **(Ho et** *al.,* **2007)**.

Actuellement, le genre *Leuconostoc* comprend quatorze espèces, ils sont également anaérobies facultatifs et exigeants au point de vue nutritionnel et leur croissance est toujours lente. Le développement des *Leuconostoc* entraine souvent l'apparition d'une viscosité dans le milieu grâce à la production des exopolysaccharides. Les *Leuconostoc* principalement *Ln. mesenteroides ssp. cremoris* et *Ln. lactis* sont utilisés en association avec les lactocoques dans l'industrie laitière pour produire en plus de l'acide lactique et le CO2, des substances aromatiques telles que le diacétyle et l'acétoïne à partir des citrates du lait **(Ogier et** *al.,* **2008)**.

Récemment, l'espèce *Leuconostoc oenos* isolée de vins a été classée dans un nouveau genre, *Oenococcus oeni* et certaines espèces de lactobacilles hétérofermentaire ont été groupées avec *Leuconostoc paramesenteroides* dans le nouveau genre *Weissella* **(Stiles et Holzapfel, 1997)**.

I.4.4. Le genre *Streptococcus*
Famille VI: *Streptococcaceae*
Genre I: *Streptococcus*
Le genre *Streptococcus* est toujours large et la classification est très mouvementée. Ce genre est généralement divisé en trois groupes: pyogène, oral et les autres streptocoques. Le groupe pyogène contient plusieurs streptocoques pathogènes, hémolytiques (hémolyse) qui nuisent à la santé humaine. Les *Streptococcus pneumoniae*, précédemment inclus dans ce groupe, sont transférés maintenant dans le groupe oral puisqu'ils sont associés principalement à la cavité orale de l'homme et de l'animal. En général, les streptocoques pyogènes sont α-hémolytiques tandis que les streptocoques oraux sont α- ou non-hémolytiques. Le groupe oral est divisé en cinq sous-groupes phylogénétiques qui sont respectivement les groupes *anginosus*, *mitis*, *salivarius*, *bovis* et *mutans*. Les caractéristiques biochimiques telles que: la fermentation des hydrates de carbones, l'hydrolyse de l'arginine, et certaines activités enzymatiques sont utilisées dans la classification **(Rossetti et Giraffa, 2005; Koort et** *al.,* **2006; Piraino et** *al.,* **2006; Desar et** *al.,* **2008).**

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

I. 4.5. Le genre *Vagoccoccus*
Famille IV: *Enterococcaceae*
Genre II: *Vagococcus*
Les espèces du nouveau genre *Vagococcus* sont facilement confondues avec les lactocoques au niveau morphologique, mais ces deux genres sont clairement distincts par leur composition en acides gras. Certaines espèces de *Vagococcus* sont mobiles **(Teixeira et** *al.,* **1999)**. Les amorces d'oligonucléotides spécifiques à ce genre et ses espèces sont disponibles, ce qui rend l'identification des bactéries de ce genre fiable et réalisable **(Ammor *et al.,* 2005; Endo et Okada, 2005)**.

I.4.6. Le genre *Enterococcus*
Famille IV: *Enterococcaceae*
Genre I: *Enterococcus*
Le genre *Enterococcus* regroupe les streptocoques fécaux qui présentent une hémolyse de type α, ß, et qui appartiennent au groupe sérologique D. Ce sont des commensaux de l'intestin. Les espèces rencontrées dans l'alimentation sont essentiellement *En. faecalis* (auparavant *Streptococcus faecalis*), et ses variétés *En. durans* et *En. bovis*). Les *Enterococcus* sont les bactéries lactiques les plus controversées **(Franz et** *al.,* **2003)**.
Les entérocoques produisent des bactériocines **(Sabia *et al.,* 2002; Sabia *et al.,* 2003 Moreno *et al.,* 2006)**. D'ailleurs, des préparations d'*En. faecium* (autrefois *Sp. faecium*) et d'*En. faecalis* ont été utilisées en tant que probiotiques **(Ruiz-Moyano et** *al.,* **2008)**. Certaines résistent aux antibiotiques et transfèrent de telles propriétés au moyen d'éléments génétiques mobiles.

I. 4.7. Le genre *Aeorococcus, Pediococcus* et *Tetragenococcus*
Ce sont des coques formées de cellules groupées en tétrades. Le genre *Aerococccus* qui contient cinq espèces est généralement moins intéressant dans l'agroalimentaire. Cependant, une étude récente a suggéré que ces bactéries pourraient être responsables du verdissement des produits carnés cuits **(Peirson *et al.,* 2003)**.

I. 4.7.1. *Pediococcus*
Famille I: *Lactococcaceae*
Genre III: *Pediococcus*
Sept (7) espèces de *Pediococcus* sont connues: *Pe. acidilactici, Pe. damnosus, Pe. dextrinicum, Pe. inopinatus, Pe. parvutus, Pe. pentosaceus* et *Pe. urinaeequi*. **Collins et** *al.,*

(1993) ont proposé de reclasser la dernière avec le genre des *Aerococcus* mais aucun changement officiel sur cette suggestion n'a été réalisé **(Dobson et *al.,* 2010)**. Avec la transposition de *Pe. urinae-equi* au genre *Aerococcus* et de *Pe. halophilus* au genre *Tetragenococcus*, les *Pediococcus* peuvent être décrits comme les seules coques lactiques acidophiles et homofermentaires. Ils se divisent alternativement dans deux plans ce qui aboutit à la formation de tétrades (figure 4) **(Simpson et Taguchi, 1995)** Ces dernières sont importantes dans l'agroalimentaire tant sous l'aspect négatif que positif. Les *Pe. damnosus* sont les microorganismes majeurs de l'altération de la bière à cause de la formation des diacétyl/acétoïne qui créent le goût du beurre.

Les *Pe.acidilactici* et *Pe.pentosaceus* ont démontré leur utilité dans l'élaboration de plusieurs produits carnés fermentés naturels. Ceci a conduit à de nombreuses sélections de souches et l'utilisation comme agents antibactériens ou probiotiques dans la fabrication de produits carnés **(Schneider et *al.,* 2006; Albano et *al.,* 2007 Ruiz-Moyano et *al.,* 2008)**.

Les pédiocoques sont également des bactéries lactiques autochtones qui permettent la maturation des fromages **(Gurira et *al.,* 2005 ; Gonzalez et *al.,* 2007)**.

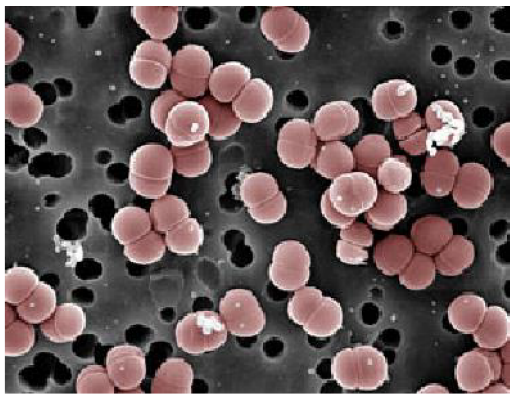


Figure 4.*Pediococcus* au microscope électronique.
(www. bioweb.usu.edu).

I. 4.7.2. *Tetragenococcus*
Famille IV: *Enterococcaceae*
Genre III: *Tetragenococcus*
Seulement deux espèces de *Tetragenococcus* sont connues: *Te.halophilus* (précédemment considérées comme *Pe.halophilus*) et *Te.muriaticus*.
Les *Enterococcus solitarius* sont phylogénétiquement liés au *Tetragenococcus*. Ces bactéries résistent à des concentrations élevées en sel (supérieures à 18% NaCl) et en sont dépendantes pour leur croissance. Les espèces *Tetragenococcus* ont un rôle crucial dans la fabrication des produits alimentaires à concentration de sel élevée par exemple les sauces de soja **(Tosukhowong et *al.,* 2005 ; Masuda et *al.,* 2008).**

I. 4.7.3. *Weissella*
Famille V: *Leuconostocaceae*
Genre III: *Weissella*
Dans la famille des *Leuconostocaceae,* la séparation des *Weissella* du groupe des *Leuconostoc* et de certaines autres bactéries lactiques hétérofermentaire est toujours problématique.

En général, les espèces du genre *Weissella* sont constituées de courts bacilles, de coccobacilles ou des coques ovoïdes, à Gram positif, se présentant de manière isolée ou groupés par deux ou en courtes chaînes, non sporulés, immobiles, catalase négative (*Weissella paramesenteroïdes* peut produire une pseudocatalase lorsqu'elle est cultivée sur un milieu pauvre en glucose), oxydase négative, aéro-anaérobies ou micro-aérophiles, chimio-organotrophes, hétérofermentaire stricts, cultivant à 15°C, ayant des exigences nutritionnelles complexes. **(Menad, 2015).**

Tableau 1. Principaux genres de bactéries lactiques **(Dortu et Thonart, 2009).**

Genre	Forme	Mobilité	Fermentation	Température optimale	Nombre d'espèces
Lactobacillus	Bacille	Immobile	Homofermentaire ou Hétérofermentaire	Thermophile Ou Mésophile	GI : 23 GII : 16 GIII : 22
Carnobacterium	Bacille	Immobile	Hétérofermentaire	Psychrotrophe	6
Lactococcus	Coque	Immobile	Homofermentaire	Mésophile	5
Streptococcus Thermophilus	Coque	Immobile	Homofermentaire	Thermophile ou Mésophile	01
Enterococcus	Coque	Immobile	Homofermentaire	Mésophile	13
Vagococcus	Coque	Immobile	Homofermentaire	Mésophile	2
Pediococcus	Coques en tétrades	Immobile	Homofermentaire	Mésophile	2
Tetragenococcus	Coques en tétrades	Immobile	Homofermentaire	Mésophile	7
Leuconostoc	Coque	Immobile	Hétérofermentaire	Mésophile	9
Oenococcus	Coque	Immobile	Hétérofermentaire	Mésophile	1
Bifidobacterium	Coque	Immobile	Hétérofermentaire	Mésophile	1
Weissela	Bacille Coccobacille Coque ovoïde	Immobile	Hétérofermentaire Strict	Psychrotrophe	6
Aerococcus	Coque	Immobile	Hétérofermentaire	Mésophile	7

I.5.Culture des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques demandent des milieux riches en différents nutriments pour croître (Sucres, acides aminés, acides gras, sels, vitamines) et pauvres en oxygène **(Hammes et Hertel, 2006)**. Elles sont essentiellement cultivées dans le milieu Man Rogosa Sharpe (MRS). Le MRS est un milieu riche qui offre aux bactéries à culture difficile différentes sources de carbone et d'azote, telles que les peptones, le glucose et le Tween 80. Le Tween 80 était initialement utilisé comme émulsifiant dans la préparation des milieux de culture avant d'être considéré comme source de carbone pour les bactéries **(Menad, 2015).**

I.6.Métabolisme des bactéries lactiques

Il existe deux principale voies de fermentation des hexoses qui utilisés pour classer les BL dans des conditions de l'excès de glucose et d'oxygène limité, les bactéries lactiques homofermentaires catabolisent une mole de glucose dans la voie Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pour donner deux moles de pyruvate.

L'équilibre Redox intracellulaire a été maintenu grâce à l'oxydation du NAOH, concomitante avec la réduction de pyruvate en acide lactique. Ce processus donne deux moles ATPA par le glucose consommé **(Luquet et Corrieu, 2009).**

Homolactique bactéries lactiques comprend *Lactococcus, Enterococcus, Pediococcus*, et du groupe I de lactobacilles. Les bactéries lactiques hétérofermentaire sont utilisées la voie des pentoses phosphates dénommé la voie phosphoketolase des pentoses. Une mole de glucose-6-phosphate a été initialement déshydrogénée à 6 phosphogluconate puis décarboxylation d'une mole de CO_2. (Figure 5)

Le résultant des pentoses-5-phosphate est clivé en un phosphate glycéraldéhyde mole (GAP) et un phosphate acétyle taupe.GAP est ensuite métabolisé en lactate comme dans homofermentation, avec l'acétaldéhyde **(Alomar, 2007).**

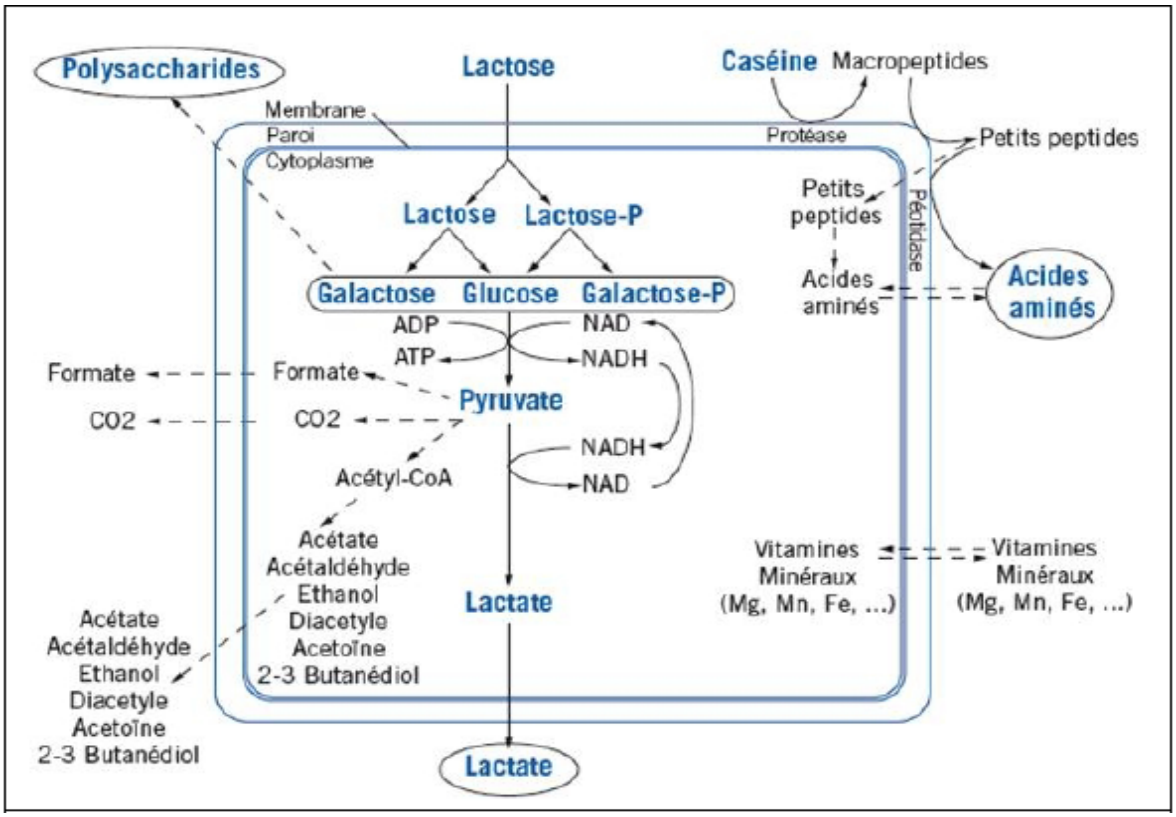


Figure 5. Les voies métaboliques des bactéries lactiques **(Luquet et Corrieu, 2009).**

En théorie, les produits finit (y compris l'ATP) sont produits en quantité équimolaire du catabolisme d'une mole de glucose. Oligate BL hétérofermentaire comprend Ln. Oeni, Weissella, st du groupe III de lactobacilles **(Liebefeld, 2002 ; Welman et Madox, 2003 ; Alomar, 2009).**

I.7. Intérêt des bactéries lactiques

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

I.7.1.Dans l'industrie alimentaire

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

Tableau 2. Exemple d'utilisation des bactéries lactiques en industrie alimentaire **(d'après Romain, 2011).**

genre	substrat	Exemples de produits
bifidobacterium	lait	Laits fermentés
Lactobacillus	Lait, viande, végétaux, céréales	Yaourts, laits fermentés, kéfirs, fromages saucissons secs, jambons secs choucroute, olives, « yaourts » au lait de soja pain au levain, bières
Lactococcus	lait	Fromages, kéfirs
Leuconostoc	Végétaux, lait	Choucroute, olives, vin fromage, kéfirs
Pediococcus	Végétaux, viande	Choucroute saucisses semi-séchées
Oenococcus	végétaux	Vin
Streptococcus	lait	Yaourt, laits fermentés, fromages

I. 7. 2. Dans le domaine thérapeutique :

Étant des probiotiques, les bactéries lactiques apportent des bénéfices à l'hôte en conférant une balance de la microflore intestinale, et en jouant également un rôle important dans la maturation du système immunitaire **(Yateem et** *al.*, **2008).** Différentes études ont démontré le rôle préventif aussi bien que curatif de ces bactéries sur plusieurs types de diarrhées **(Mkrtchyan et** *al.*, **2010).** D'autres ont cité leur capacité de diminuer les allergies liées aux aliments grâce à leur activité protéolytique **(El-Ghaish et** *al.*, **2011)**. **Uehara et** *al.*, **(2006)** ont

démontré la capacité des souches de *Lactobacillus crispatus*, utilisées sous forme de suppositoires pour empêcher la colonisation du vagin par les bactéries pathogènes et de prévenir ainsi les rechutes chez les femmes qui souffrent d'inflammations fréquentes et répétées de la vessie.

Chapitre II

Les substances antimicrobiennes

Chapitre II. Les métabolites antimicrobiens des bactéries lactiques

II.1.Introduction

On reconnait depuis longtemps, aux bactéries lactiques, la propriété de produire des substances antibactériennes leur permettant de se développer préférentiellement dans divers écosystèmes. L'activité antagoniste des bactéries lactiques est due aux métabolites excrétés : l'acide lactique et autre acides organiques, peroxyde d'hydrogène, Le dioxyde de carbone, Le diacétyl, La reutérine et les bactériocines **(De VUYST et LEROY, 2007).**

II. 2. Compétition nutritionnelle

Les bactéries lactiques peuvent inhiber la multiplication de certains microorganismes d'altération et/ou pathogènes par leur propre présence. En effet, il s'agit du phénomène de compétitions nutritionnelle et spatiale vis-à-vis d'autres espèces. Du fait de leurs importantes exigences nutritionnelles, les bactéries lactiques envahissent complètement le milieu. Elles limitent alors la multiplication des autres colonisateurs. **(Castellano et *al*., 2008)**

II.3. Les substances antimicrobiennes des bactéries lactiques

Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques peuvent être associées à de nombreux éléments. Elles résultent de l'effet combiné de différents facteurs biologiques provenant de leurs activités métaboliques. Les composés antimicrobiens des BL peuvent empêcher la croissance des bactéries pathogènes; contaminants possibles des produits fermentés. (**Gill et Halley, 2003 et Guessas *et al.*, 2006).**

II.3.1. Le pH et les acides organiques

Les produits principaux du métabolisme des bactéries lactiques sont les acides organiques qui sont produits soit par la voie Homofermentaire, soit par la voie hétérofermentaire. Le métabolisme du pyruvate conduit à la formation uniquement d'acide lactique chez les homofermentaires tandis qu'il conduit à la formation d'acide lactique, acétique et formique, d'éthanol et de dioxyde de carbone chez les hétérofermentaire **(Liu, 2003)**. Grâce à cette production d'acides organiques, les bactéries lactiques diminuent le pH du milieu dans lequel elles se multiplient en inhibant une partie de la flore qui s'y développe.

Les acides organiques sont un des agents classiques de préservation des aliments **(Brul et Coote, 1999)** et sont reconnus comme des additifs alimentaires. Les acides couramment utilisés sont les acides benzoïque, sorbique, acétique, fumarique, propionique et lactique. Ils sont utilisés pour prévenir ou retarder la croissance des bactéries dégradant la nourriture **(Hsiao et Siebert, 1999)**. Le principal problème consécutif à leur utilisation est la haute concentration nécessaire pour inhiber les bactéries pathogènes ou indésirables et qui est parfois inacceptable pour le consommateur **(Kobilinsky *et al.*, 2007)**.

Les bactéries pathogènes peuvent développer certains mécanismes de résistance appelés «acid tolerance response» vis-à-vis de l'exposition à des pH acides. Ceux-ci leur sont également utiles pour survivre au transit intestinal **(Brul et Coote, 1999 ; Cotter et Hill, 2003)**.

II.3.2.Le peroxyde d'hydrogène

Les bactéries lactiques ne possèdent pas de catalase typique contenant un noyau hème pour dégrader le peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau. Il peut s'accumuler et être inhibiteur de différents microorganismes par l'oxydation des lipides membranaires et la destruction des structures des protéines cellulaires **(Zalan et** *al.*, **2005)**. Certaines bactéries lactiques peuvent néanmoins se protéger contre le peroxyde d'hydrogène qu'elles produisent par la synthèse de catalase hexamérique ou tétramérique contenant du manganèse et qui est parfois décrit comme étant des pseudocatalase **(Strus et** *al.*, **2005)**.

Son action se manifestera aussi bien sur les germes indésirables que sur ceux qui sont indispensables au bon déroulement de la fermentation. Il est donc rarement utilisé pour son activité inhibitrice. D'autre part, son action oxydante peut avoir un effet néfaste sur la santé humaine **(Zalan et** *al.*, **2005)**.

II.3.3. Le dioxyde de carbone

Celui-ci est formé pendant la fermentation hétérolactique et crée un environnement anaérobie qui inhibe les microorganismes aérobies. L'accumulation de dioxyde de carbone dans la bicouche lipidique peut causer un dysfonctionnement de la perméabilité **(Ammor et** *al.*, **2006)**.

II.3.4. Le diacétyl

Il est synthétisé par différents genres de bactéries lactiques comme *Lactococcus* sp, *Leuconostoc* sp, *Lactobacillus* sp et *Pediococcus* sp. Le diacétyl ($C_4H_6O_2$) est un des composants aromatiques essentiels du beurre. Il a des propriétés antimicrobiennes qui sont dirigées contre les levures, les bactéries Gram négatifs et les bactéries Gram positifs non lactiques, ces dernières y sont néanmoins moins sensibles **(El Ziney et** *al.*, **1998)**.

II.3.5. La reutérine

La reutérine (ou 3-hydroxypropionaldehyde) est une substance antimicrobienne qui est produite comme métabolite intermédiaire pendant la fermentation anaérobique du glycérol par certaines espèces de *Lactobacillus* **(El Ziney et** *al.*, **1998)**. La fermentation du glycérol se déroule en deux étapes. Le glycérol sera tout d'abord déshydraté par une «glycerol déshydratase» pour former de la reutérine qui sera ensuite réduite en 1,3-propanediol par une oxydoréductase. Cette deuxième étape est inhibée en l'absence de glucose. La reutérine s'accumule alors dans le microorganisme producteur. À haute concentration, elle est excrétée dans le milieu. Sa toxicité contre la cellule productrice limite sa production, certaines espèces comme *Lactobacillus reuteri* y sont plus résistantes **(Vollenweider, 2004)**.

II.3.6. Les bactériocines

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont des substances antimicrobiennes de poids moléculaire variable. Les plus connues sont: la nisine, la diplococcine, l'acidophiline et la bulgaricane **(Dortu et Thonart, 2009)**. La plupart des bactériocines produites par les bactéries lactiques partagent le même mode d'action, basé sur la formation de pores dans la membrane de la bactérie cible **(De Vuyst et Leroy, 2007 ; Kumari et** *al.*, **2009)**.

II.4.Utilisation des bactéries lactiques productrices de bactériocine

C'est durant le XIXe siècle, au Danemark, que la première boisson fermentée fabriquée à partir d'un mélange de souches bactériennes isolées à partir de lait cru a été commercialisée. Le concept de ferment a ensuite évolué au début du XXe siècle après l'identification de quelques souches impliquées dans la fermentation. **(Settanni et Corsetti, 2008)**.

Grâce à leurs propriétés d'acidification et de production de polysaccharides, les bactéries lactiques ont souvent été utilisées en co-cultures pour initier et/ou améliorer la fermentation de nombreux aliments comme la choucroute, les saucisses ou les olives vertes. Cependant, une des caractéristiques des bactéries lactiques qui leur permet de se placer comme bioconservateur est leur production de molécules antimicrobiennes **(Settanni et Corsetti, 2008)**.

La production de bactériocine offre de nombreux avantages, comme le coût ou l'augmentation de la compétition avec la microflore résidente augmentant ainsi l'inhibition de croissance des bactéries pathogènes. La diminution du coût de préparation pourrait généraliser la pratique permettant aux pays en voie de développement où la sécurité alimentaire est le plus souvent compromise de bénéficier de ces applications **(Holzapfel et Schillinger, 2002)**.

De nombreuses souches bactériennes productrices de bactériocines sont actuellement utilisées dans les produits alimentaires fermentés, tels que les produits laitiers, les viandes, les poissons ou les légumes. Les souches bactériennes du genre *Lactococcus* sont les bactéries productrices de bactériocines les plus utilisées **(Gálvez et** *al.,* **2007 ; O'Sullivan et** *al.,* **2003)**.

L'optimisation de l'arôme du fromage pourrait être réalisée par l'utilisation des souches productrice de lacticine 3147 en combinaison avec des cultures bactériennes productrices d'amino-transférases et de décarboxylases **(Makhloufi, 2011).**

Du fait de leur robustesse, leur présence naturelle dans différents produits alimentaires et leur production de nombreuses bactériocines, *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* productrices de bactériocines sont largement utilisées comme adjuvants **(Franz et** *al.,* **2007)**.

Les bactéries appartenant au genre *Pediococcus* productrices de bactériocines ne sont pas adaptées à la fabrication des produits laitiers fermentés de par leur manque ou leur lenteur de fermentation du lactose **(Rodríguez et** *al.*, **2002 ; Papagianni et** *al.,* **2007)**.

D'autres qualités ont depuis été associées aux bactéries lactiques lorsqu'elles sont associées aux produits alimentaires comme l'augmentation des valeurs nutritionnelles des aliments, la réduction de la formation de produits toxiques et la propriété de probiotique **(Makhloufi, 2011).**

En plus de la propriété de bioconservation, plusieurs propriétés ont été attribuées aux bactéries productrices de bactériocines telles que la diminution des gaz dus à la fermentation ainsi qu'à l'amélioration du goût et de la qualité du produit fini. **(Makhloufi, 2011).**

Grâce à leur activité protéolytique et leur acidification importante du milieu, les bactéries productrices de bactériocines sont utilisées soit pour initier la fermentation soit pour jouer le rôle d'adjuvant en présence d'une bactérie initiatrice de fermentation **(Gálvez et** *al.*, **2007)**. Aussi, la croissance de la co-culture ne doit avoir aucun effet sur les propriétés physicochimiques et organoleptiques du produit fini ni interférer avec celles-ci.

De plus, la bactérie productrice doit être prédominante et capable de produire sa bactériocine à n'importe quelle température, pendant la réfrigération ou à température ambiante, afin d'empêcher la croissance et la prolifération des bactéries pathogènes dans les aliments **(Holzapfel et** *al.*, **1995)**.

II.5. Définition des bactériocines :

Les bactériocines sont des substances antimicrobiennes de nature protéique **(Tagg et** *al.*, **1996)**. La détection des bactériocines remonte à 1925 par **André Gratia** qui a observé que la croissance de certaines souches d'*Escherichia coli* a été inhibée en présence d'un composé antibactérien, dont il a donné le nom de colicin V. Cette substance a été caractérisée comme composé peptidique thermostable. **Tagg et** *al.*, **(1996)** suggéraient qu'un composé antimicrobien doit être considéré comme une bactériocine que lorsqu'il satisfait aux critères suivants:

- L'activité des bactériocines doit disparaitre sous l'action des protéases.
- Un spectre d'inhibition étroit dirigé contre les espèces apparentées à la souche productrice.
- La présence d'une fraction protéique biologiquement active.
- Un mode d'action bactéricide.
- Un site d'attachement (récepteurs) spécifique sur les cellules sensibles.
- La bactérie productrice synthétise une molécule qui la protège contre sa propre bactériocine.

Les bactériocines sont codées par des plasmides.

II.5.1. Classification des bactériocines :

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont réparties en quatre classes comme proposées par **(Klaenhammer, 1993)**:

II.5.1.1. Classe I

- **Les lantibiotiques :**

Ce sont des peptides de taille inférieure à 5 kDa, stables à la chaleur et qui contiennent des acides aminés inhabituels soufrés formés post-traductionnellement, comme la lanthionine, la β-méthyl lanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine.

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

Les lantibiotiques interagissent avec la membrane cellulaire par des interactions électrostatiques ou par la liaison à des récepteurs spécifiques telle que le lipide II (undecaprenyl pyrophosphoryl-MurNAc-pentapeptides-GlcNAc), un précurseur du peptidoglycane. Suite à cette liaison, les lantibiotiques peuvent former des pores larges et non spécifiques dans la membrane cytoplasmique, ce qui va causer l'efflux rapide des petits composés cytoplasmiques tels que les ions, les acides aminés, l'ATP, etc. Cette augmentation de la perméabilité membranaire va conduire à la mort de la cellule **(McAuliffe et Hill, 2001; Twomey *et al.*, 2002 ; Bauer et Dicks, 2005 ; Patton et Van Der Donk, 2005)**.

Les lantibiotiques composés de deux peptides comme la lacticine 3147 agit également par formation de pores dans la membrane des cellules cibles **(Mc Auliffe et Hill, 2001)**. La lacticine 3147 a un spectre d'action large. Le peptide A1 a une activité qui est plus élevée en présence du peptide A2. Il a été récemment proposé que la lacticine 3147 A1 agit en se liant au lipide II, inhibant la synthèse du peptidoglycane et permettant à la lacticine 3147 A2 de former un pore dans la membrane de la cellule cible **(Morgan et *al.*, 2005 ; Wiedemann et *al.*, 2006)**.

II.5.1.2. Classe II

Ce sont des peptides de taille inférieure à 10 kDa, stables à la chaleur, ne contenant pas d'acides aminés modifiés. Leur point isoélectrique varie entre 8 et 10.

- **La sous-classe IIa**

Ces bactériocines contiennent entre 27 et 48 acides aminés et ont toute une partie N-terminale hydrophobe contenant la séquence consensus YGNGV ainsi qu'un pont disulfure et une partie C-terminale moins conservée, hydrophobe ou amphiphile qui détermine la spécificité d'action **(Fimland et *al.*, 2000 ; Richard et *al.*, 2006)**.

Elles ont toutes une activité contre *Listeria monocytogenes*. Certaines bactériocines de cette sous-classe contiennent également un deuxième pont disulfure dans leur domaine C-terminale qui semble être important dans la stabilisation de la structure tertiaire. Il semble par ailleurs qu'il leur confèrerait une meilleure activité antimicrobienne, une meilleure résistance à l'exposition à des hautes températures et un spectre d'action plus large **(Drider et *al.*, 2006 ; Richard et *al.*, 2006)**.

- **La sous-classe IIb**

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

- **La sous-classe IIc**

Le mécanisme d'action supposé des bactériocines de classe IIa est l'interaction de la bactériocine avec la membrane ou un récepteur spécifique, le «mannose perméase», pour ensuite former un pore dans la membrane de la cellule, ce qui induit la perméabilité de la membrane et par conséquent, la mort de la cellule **(Arous et *al.*, 2004 ; Vadyvaloo et *al.*, 2004 ; Bauer et Dicks., 2005)**. Le mécanisme de formation des pores n'est pas bien connu,

même si l'hypothèse la plus courante est l'association de différentes molécules de la bactériocine **(Ennahar et** *al.,* **2000 ; Fimland et** *al.,* **2000 ; Diep et** *al.,* **2007)**.

Les bactériocines de classe IIb ont en général un spectre d'action inhibant une large gamme de bactéries Gram+. Elles forment des pores et rendent la membrane perméable à différentes petites molécules à savoir les cations et les anions **(Oppegard et** *al.,* **2007)**.

II.5.1.3. Classe III

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

Le mode d'action de ces bactériocines diffère complètement des bactériocines des autres classes. En effet, l'enterolysin A, la zoocin A et la millericin B agissent par l'hydrolyse des liens peptidiques du peptidoglycane des cellules sensibles. La zoocin a un spectre d'action étroit alors que l'enterolysin A et la millericin B ont un spectre d'action large. L'helveticin J a un mode d'action bactéricide **(Nilsen et** *al.,* **2003)**.

II.5.1.4. Classe IV

Ce sont des peptides requérant une partie carbohydratée ou lipidique pour avoir une activité.

II.5.2.La production des bactériocines :

Les bactériocines sont généralement produites à la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire de croissance. Elles peuvent ensuite être adsorbées à la surface de la bactérie productrice **(Savijoki et** *al.,* **2006)**, ce qui mène à sa baisse de concentration de bactériocines dans le milieu de culture. Les facteurs influençant la production de bactériocines sont principalement la souche productrice, la température, le pH, la composition du milieu et la technologie de fermentation employée.

Comme l'ont montré **Moretro et** *al.,* **(2000)** pour la production de sakacin P par *L. sakei*, une même bactériocine peut être produite par des souches ou espèces différentes dont la capacité de production peut être variable. Il a même été suggéré que des conditions de croissance défavorables permettent de stimuler leur production **(Verluyten et** *al.,* **2004)**. Les températures et pH optimaux de production sont souvent inférieurs à ceux de la croissance.

La composition du milieu, tout particulièrement les concentrations des sources de carbone et d'azote, affecte fortement la production de bactériocines. Les bactéries lactiques productrices requièrent de nombreux nutriments pour leur croissance et des milieux riches contenant de l'extrait de viande, de levure et des hydrolysats de protéines sont nécessaires. Il a déjà été montré que l'augmentation des concentrations en extrait de levure, extrait de viande ou peptone peut permettre une augmentation de la production de bactériocines **(Aasen et** *al.,* **2000 ; Nel et** *al.,* **2001 ; Todorov et Dicks, 2004 ; Verluyten et** *al.,* **2004)**.

D'autre part, quelques études ont montré que la source de carbone utilisée et sa concentration est un facteur important dans l'optimisation de la production de bactériocines **(Leroy et** *al.* **2006 ; Chen et** *al.* **2007 ; Anastasiadou et** *al.* **2008)**.

II.5.3. Le conditionnement des bactériocines

Il est très difficile de conditionner les bactériocines sous une forme purifiée. La purification des bactériocines est une procédure longue et couteuse qui nécessite la mise en œuvre de nombreuses techniques, à savoir une précipitation des protéines au sulfate d'ammonium, différentes combinaisons de chromatographies sur colonne telles que des échanges d'ions ou des interactions hydrophobes et une étape finale de chromatographie liquide à haute performance en phase inverse. Ces traitements ne sont pas applicables à l'échelle industrielle.
La stratégie souvent mise en œuvre est la semi - purification. Les bactériocines semi-purifiées peuvent alors être conditionnées sous forme sèche par atomisation ou lyophilisation **(Parente et Ricciardi, 1999)**. La nisine, la seule bactériocine légalement approuvée comme additif alimentaire, est commercialisée sous une forme semi-purifiée.

II.5.4. Domaines d'application des bactériocines

Les bactériocines peuvent être appliquées sous une forme purifiée, semi-purifiée ou sous la forme d'un concentré obtenu après fermentation d'un substrat alimentaire. Les bactéries productrices peuvent également être appliquées dans les produits alimentaires.

II.5.5.Les bactéries productrices de bactériocines

De nombreuses souches bactériennes, à Gram positive et à Gram négative ont été décrites pour leurs capacités à produire des bactériocines (tableau 3). Pour les bactériocines du genre *Bacillus* on peut citer : la subtiline produite par *Bacillus subtilis* ATCC 6633 **(Klein *et al.*, 1993)** similaire à la nisine, la coaguline secrétée par *Bacillus coagulans* I (4) **(Le Marrec et *al.*, 2000)**, la bacillocine 490 produite par *Bacillus licheniformis* **(Martirani et *al.*, 2002)**, la polyfermenticine SCD secrétée par *Bacillus polyfermenticus* **(Lee et *al.*, 2000)**, l'entomocine et la thuricine produites par *Bacillus thurigiensis* **(Cherif et *al.*, 2008)**, etc.

Cependant, les bactéries lactiques restent les meilleures candidates pour la production de bactériocines. Ces dernières sont l'objet d'une attention toute particulière depuis une dizaine d'années en raison de l'intérêt tant fondamental qu'appliqué qu'elles suscitent. Produites par de nombreuses espèces et dirigées contre des espèces homologues ou plus éloignées, comme *Listeria monocytogenes*, leur structure primaire a permis de définir une classification en trois classes (lantibiotiques, petites bactériocines, non lantibiotiques et bactériocines de grande taille). Leur mode d'action a été également analysé et différents modèles existent pour expliquer la perforation des membranes des cellules cibles de ces bactériocines. La formation de pores membranaires se fait via un récepteur protéique (non lantibiotique) ou par une insertion directe dans les bicouches phospholipidiques (lantibiotiques). Dans tous les cas, plusieurs molécules d'une même bactériocine agissent en synergie. **(Gillor *et al.*, 2005)**.

Tableau 3. Souches productrices de bactériocines **(Gillor et** *al*, **2005)**.

Bactériocines	**Souches indicatrices**
Lantibiotiques	
Ancovenin	*Streptomyces* spp
Cinnamycin	*Streptoverticillum and Sytreptomyces* spp
Duramycin	*Streptoverticillum and Sytreptomyces* spp
Epidermin	*Staphylococcus epidermidis*
Gallidermin	*Staphylococcus gallinarum*
Lacticin	*Lactococcus lactis*
Labthiopeptin	*Streptoverticillum cinnamonum*
Mersacidin	*Bacillus subtilis*
Mutacin	*Streptococcus mutans*
Nisin	*Lactococcus lactis*
Colicins	
Ia, E1, E4, E7, E8, K et S8	*E. coli*
Microcins	
24, B17 et J25	*E. coli*
E294	*Klebsilla pneumoniae*
Pyocins	
S-35	*Pseudomonas aeruginosa*
Gram (-) productrices de bactériocines	
Serracin-P	*Serratia plymithicium*
Glycinicin	*Xanthomonas campestris*
Carotovoricin	*Erwinia carotovora*

II.6. Les substances antifongiques

Actuellement, plusieurs équipes de recherche ont pu identifier les substances antifongiques produites par les bactéries lactiques, ainsi que l'effet synergique de l'acétate de sodium contenu dans le milieu de culture avec les acides organiques produits par ces bactéries **(stiles et** *al.*, **2002).**outre que les métabolites antifongiques.la compétition nutritionnelle a été prouvée aussi obstacle antifongique **(Bayrock et Ingledew, 2004).**

II.6.1.Les composés antimycotoxinogène des bactéries lactiques

Les premiers composés antifongiques identifiés chez les bactéries lactiques sont des métabolites primaires, souvent des acides organiques, produits au cours de la croissance du microorganisme. Il s'agit de l'acide lactique, de l'acide acétique, de l'acide propionique, de l'acide formique et du peroxyde d'hydrogène **.**Aussi la découverte des bactériocine a donné un élan pour le développement d'aliment de qualité sanitaire meilleur **(Axelsson, 2004; Djadouni et Kihal, 2012).**

D'autres acides ont été mis en évidence chez *Lactobacillus plantrum*: ce sont l'acide benzoïque, l'acide 3- phenyllactique et l'acide 4-hydroxy-phenyllactic acid **(Lavermicocca et *al.*, 2000; Ström et *al.*, 2002).** Certains auteurs ont mis en évidence des protéines antifongiques chez les bactéries lactiques suivantes : *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus casei subsp. pseudoparaplantarum, Lactobacillus paracasei*, *Pediococcus acidilactici* **(Olga, 2011).**

II.6.2.Mode d'actions des composés antimycotoxinogène des bactéries lactiques

Pour le mode d'actions des composés antimycotoxinogène des bactéries lactique Nous développerons uniquement Mode d'action des bactériocines.

II.6.2.1Mode d'action des bactériocines

Le mécanisme d'action des bactériocine est très largement étudier .il est admis qu'il se décompose en trois étapes :

1- Adsorption et structuration de la bactériocine : consiste en fixation du peptide sur la membrane de la cellule cible. Durant cette étape que le peptide adopte sa conformation tridimensionnelle permettant l'expression de son activité.

2- Insertion de la bactériocine et formation de pores dans la cellule cible : consiste en insertion de la bactériocine dans la membrane cytoplasmique durant cette étape plusieurs peptide anti bactérien sont recruté pour formé un port.

3- Les conséquences de la présence de pores : ce dernier conduit a des fuites de composé intracellulaire vitaux .leur perte entraine donc des effets néfaste pour la cellule allant d'un simple ralentissement de la vitesse de croissance bactérienne a la mort cellulaire **(Huang, 2007).**

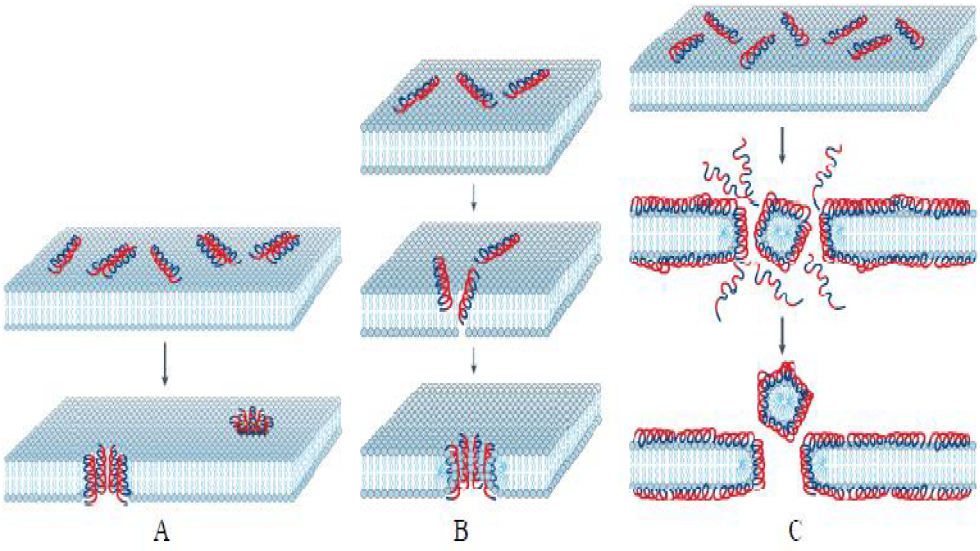


Figure 6. Model des mécanismes d'action des bactériocine selon trois model
A: Barelle-stave ; B: Toroidal ; C : Wormhole **(Brogden, 2005).**

Etude expérimentale

Matériel et méthodes

II. Matériel et méthodes

II.1. Objectif

Ce travail a été réalisé a partir de février 2017 jusqu'à la fin du mai 2017 au niveau de laboratoire pédagogique de biologie de la Faculté des Sciences à l'université de Médéa.
vingt-neuf (29) souches lactiques, sept (7) souches de bactéries indicatrices et quatre (4) souches fongiques ont été utilisées durant cette étude. Dont la réalisation des objectifs suivants :

- De mettre en évidence l'effet antagoniste *in vitro* de vingt-neuf (29) souches de bactéries lactiques isolées dans les différents stades de maturation de kaddid vis-à-vis sept (7) bactéries indicatrices, deux (2) moisissures et deux (2) levures ;
- caractérisation des métabolites antimicrobiennes et sélection des souches inhibitrices.

II.2. Matériel

Pour la réalisation de notre étude on à utilisé un ensemble de matériel et appareilles :

-Autoclave (Advantage – Lab AL02-03)
-Centrifugeuse réfrigérée (Sigma 3-30K)
- Bec bensen
- Les étuves (Memmert)
- Microscope optique (Olympus)
- Réfrigérateur (Condor)
- Pipette pasteur
- Les micropipettes (Microlit)
-Vortex (XH-B)
- Balance (KERN)
- Balance de précision (KERN)
- Bain marie (Memmert)
- Dessiccateur
- PH mètre (Hanna)
- Agitateur magnétique (Stuart orbital shaker)

II.2.1. Matériel biologique

Un ensemble des souches lactiques et indicatrices sont utilisé.

II.2.1.1. Les souches indicatrices

On a utilisé 7 souches bactériennes endogènes qui sont isolé dans les différents stades de maturation de kaddid: *Enterobacter amnigenus* C_1, présumé *Streptocoque* C_2, *Staphylococcus aureus* C_3, *Pseudomonas luteola* C_4, présumé *Pseudomonas* C_5, *Enterobacter aerogenes* C_6 et *E.coli* C_7.

Les 4 souches fongiques utilisée sont aussi isolé à partir de kaddid, deux moisissures utilisées : *Penicilium sp* C_7J_0 et *Rhizopus sp* C_5J_0 et deux levures : C_3J_7 et *Sc.cerevicea* C_8 fournie par SAIDAL-Médéa.

Tableau 4. Présentation des souches indicatrices.

Le code	La souche	Le code	La souche
C_1	*Enterobacter amnigenus*	C_7	*Eshirichia coli*
C_2	*Streptococcus* sp	C_8	*Saccharomyces cerevicea*
C_3	*Staphylococcus aureus*	C_3 J_7	Levure non identifie
C_4	*Pseudomonas luteola*	C_7 J_0	*Penicilium sp*
C_5	*Pseudomonas* sp	C_5 J_0	*Rhizopus sp*
C_6	*Enterobacter aerogenes*		

II.2.1.2. Les souches lactiques

On a utilisé 29 souches lactiques isolées dans les différents stades de maturation de kaddid au cours d'une recherche réalisé en 2017 au niveau de notre laboratoire pédagogique de biologie de la Faculté des Sciences à l'université de Médéa.

Tableau 5. Présentation des souches lactiques utilisées.

Le code	**La souche**	**Le code**	**La souche**
BL 1	*Lactobacillus*	BL 16	*Lactococcus*
BL 2	*Leuconostoc*	BL 17	*Lactobacillus*
BL 3	*Enterococcus*	BL 18	*Leuconostoc*
BL 4	*Leuconostoc*	BL 19	*Leuconostoc*
BL 5	*Leuconostoc*	BL 20	*Pediococcus*
BL 6	*Enterococcus*	BL 21	*Pediococcus*
BL 7	*Leuconostoc*	BL 22	*Pediococcus*
BL 8	*Leuconostoc*	BL 23	*Lactococcus*
BL 9	*Leuconostoc*	BL 24	*Lactobacillus*
BL 10	*Leuconostoc*	BL 25	*Pediococcus*
BL 11	*Lactobacillus*	BL 26	*Lactobacillus*
BL 12	*Lactobacillus*	BL 27	*Lactobacillus*
BL 13	*Leuconostoc*	BL 28	*Pediococcus*
BL 14	*Leuconostoc*	BL 29	*Lactobacillus*
BL 15	*Leuconostoc*		
BL : bactérie lactique			

II.2.2. Milieux de culture

- MRS (bouillon et solide) ;
- BHI (bouillon, semi solide et solide) ;
- PDA (bouillon, semi solide et solide) ;
- MH (Muller Hinton) solide ;

(Annexe II)

II.2.3. Produits chimiques et réactifs

- Tampon PBS
- Eau oxygéné
- NAOH
- Lactophénol
- Alcool
- Les enzymes de digestion :
- VP : Vogues-Proskaeur
- TDA : Tryptophane Désaminase
- Fuschine de ziehl
- Lugol
- ZIM A, ZIM B

- Protéinase K : La protéinase K est une endopeptidase qui coupe les liaisons peptidiques de préférence au niveau du carboxyle d'un acide aminé à chaîne latérale hydrophobe ou aromatique.
- Présure : est une enzyme qui hydrolyse la liaison Phe_{105}–Met_{106} de la caséine κ.(fournie par la laiterie Hodnalait-M'sila)
- α-amylase : est une enzyme digestive classée comme saccharidase (enzyme qui brise les polysaccharides). requis pour le catabolisme des glucides à longue chaîne (comme l'amidon) en unités plus petites.
- Trypsine : Il s'agit d'une protéase à serine qui hydrolyse les liaisons peptidique situées coté C d'un résidu de lysine ou d'arginine qui sont des acides aminés basiques (Annexe II).

II.3. Méthodes

II.3.1. Purification des souches

La purification est effectuée par quatre repiquages successifs, .jusqu'à l'obtention de colonies de même taille, même forme et même couleur renseignant sur la pureté des souches **(Idoui et *al.*, 2009).**

II.3.2. Examen macroscopique

Il consiste à relever la taille, la forme, la couleur des colonies des cultures bactériennes sur leurs milieux de culture

II.3.3. Examen microscopique

Les observations microscopiques effectuées, à l'aide d'un microscope optique avec un objectif 100 à immersion, permettent d'examiner des prélèvements de colonies à l'état frais et après coloration de Gram.

II.3.4. L'état frais

On prépare avant tout une lame, on met au-dessus une goutte d'eau distillée a l'aide d'une pipette, après un prélèvement à partir d'une colonie, on étale sur la lame, en suit on recouvre avec une lamelle, le liquide ne doit pas déborder.

II.3.5. Coloration de Gram

Cet examen est effectué avec l'objectif 100 à immersion, après la coloration de Gram il sert à classer les souches lactiques et indicatrices (Gram+ ou -) et à déterminer la forme unitaire des cellules ainsi que leur mode de regroupement **(Guiraud, 2003)** (Annexe III).

II.3.6. Identification biochimiques

II.3.6.1. Recherche de la catalase

L'activité catalytique permet la dégradation de l'eau oxygénée en oxygène et en eau, par la mise en contact des colonies avec quelques gouttes d'eau oxygénée **(Guiraud, 2003)**. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse, traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de l'enzyme à tester **(Guiraud, 2003)**.

II.3.6.2. Test de la coagulase

Pour les souches du genre Staphylocoque la recherche de l'enzyme coagulase est recommandée afin de déterminer l'espèce *S. aureus* pathogènes qui sont capable de provoquer la coagulation du plasma sanguin. La détection de la coagulase s'effectue en introduisant des colonies isolées de *Staphylococcus* dans un microtube stérile contenant 0.5 ml de plasma de lapin. Le mélange est ensuite incubé à 37°C et examiné après 4 h puis 24 h. Un test positif se traduit par la formation d'un coagulum **(Joffin et Leyral, 2001)**.

II.3.6.3. Galeries biochimiques

On a utilisé les galeries miniaturées API 20E et API 20 Staph.

Ensemencement des galeries

- **Préparation de la galerie**

- Réunir fond et couvercle d'une boite d'incubation et répartir environ 5ml d'eau distillée ou déminéralisé dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Inscrire la référence de la souche sur languette latérale de la boite.
- Sortir la galerie de son emballage individuel.
- Placer la galerie dans la boite d'incubation.

- **Préparation de l'inoculum**

- Ouvrir une ampoule d'Api Medium ou utiliser un tube contenant 5 ml d'eau physiologique stérile, ou d'eau distillée stérile, sans additif.
- A l'aide d'une pipette pasteur, prélever une colonie bien isolée sur milieu gélosé.
- Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heures).
- Réaliser une suspension bactérienne en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu. Cette suspension doit être inoculée extemporanément.

- **Inoculation de la galerie**

- A l'aide d'une pipette pasteure stérile, remplir les tubes de la galerie avec API Medium ensemencé. Pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, poser la pointe de la pipette sur le coté de la cupule, en inclinant légèrement la boite d'incubation vers l'avant.
- Créer une anaérobiose dans les testes ADH et URE (Api Staph / ODC, ADH (Api 20 E)
- LDC, H_2S, URE (Api 20 E) en remplissant leur cupule d'huile de paraffine pour former un ménisque convexe.
- Pour les tests CIT, VP, CEL, remplir tubes et cupules (Api 20 E).
- Renfermer la boite d'incubation.
- Incubation a 37°C pendent 18-24heures.

- **Lecture de la galerie**

- Après incubation, lire les réactions conformément au tableau de lecture (annexe III), en ajoutant 1 goutte de chacun des réactifs suivant:
- Test VP : VPI et VP2 (API Staph et API20 E).
- Test NIT : NIT 1 et NIT 2 (API Staph et API20E).
- Test PAL: ZYM A et ZYM B (API 20 Staph), test TDA: Kovacs (Api 20E),

- **Détermination du profil numérique**

Sur la fiche de résultats, les testes sont séparés par groupe de trois et une valeur 1 ,2 ou 4 est indiquée pour chacun. En additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient 7 chiffres qui constituent le profil numériques et l'identification est réalisée à l'aide du catalogue Analytique et logiciel d'identification.



Figure 7. Galerie Api 20 E.

II.4. Identification du genre des souches fongiques

Deux (2) moisissures et deux (2) levures sont utilisées. L'identification des champignons se fait essentiellement aux caractères culturaux et morphologiques**.**

II.4.1. Technique de micro-culture

Cette technique décrite par **(Haris, 1989)**, repose sur l'emplacement des petites carrés de PDA sur des lame stériles, et les recouvrir par des lamelles, les spores sont ensemencées sur les limites périphériques des carrés, l'ensemble est incubé dans des conditions stérile et humide à 25°C pendant 3 à 5 jour (Figure 8).

Après incubation, les lamelles sont déposées sur des nouvelles lames stériles contenant quelques gouttes de Lactophénol pour faciliter l'observation microscopique. L'observation microscopique se fait aux grossissements ×100. Les genres sont déterminés par les caractères culturaux et microscopiques.

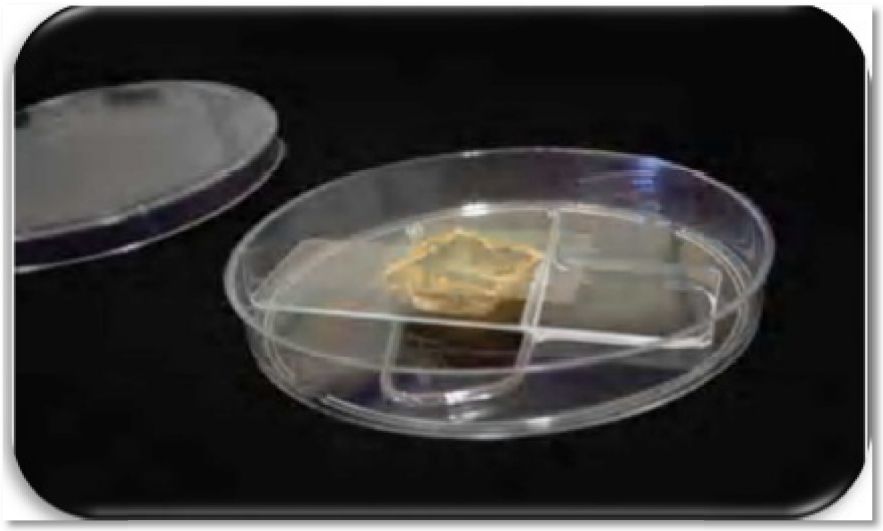


Figure 8. Technique de Micro-culture pour l'identification microscopique des moisissures.

II.5. Conservation des souches

Il existe deux types de conservation.une à courte durée et l'autre à longue durée.

II.5.1. Conservation courte durée

Les souches fongiques sont ensemencées sur gélose PDA incliné en tube. Ces cultures sont gardées à 4 C° .**(Saidi et *al.*, 2002)**

II.5.2. Conservation longue durée

La conservation de longue durée, est faite à partir des cultures de 18 heures (milieu liquide), dans le bouillon MRS pour les bactéries lactiques, BHIB (Cœur Cervelle bouillon) pour les bactéries indicatrices et l'eau physiologique pour les champignons et on ajoute 30% de glycérol stérile dans des tubes éppendorfs a -20C°. **(Saidi et *al.*, 2002)**

II.6. Revivification des souches

Les souches lactiques conservées dans le milieu MRS et les souches indicatrices dans le BHIB, qui contient 30 % de glycérol à -20°C sont réactivées par transfert aseptique d'une boucle de la culture bactérienne vers des tubes contenant le bouillon stérile.

Après incubation (BL à 30°C BI à 37°C pendant 18 à 24h), L'apparition du trouble indique la croissance de l'isolat qui sera utilisé dans les prochains tests. **(Saidi et *al.*, 2002)**

II.7. Screening de l'activité antagoniste des souches lactiques

II.7.1.Activité antibactérienne

Les nombreuses méthodes décrites pour la détection de souches lactiques productrices de bactériocines sont basées sur le principe que ces substances protéiques peuvent diffuser dans un milieu de culture solide ou semi-solide qu'on inocule préalablement avec une souche cible. Nous avons choisi les deux méthodes (spots, puits), basées sur le principe que ces substances protéiques peuvent diffuser dans un milieu de culture solide qu'on inocule préalablement avec une souche cible, l'activité antimicrobienne se manifeste alors par l'apparition des zones d'inhibition autour des spots et puits.

Pour réaliser le test d'antagonisme, il faut avoir des prés cultures des souches lactiques et le pré culture de la souche indicatrice (pathogène). À partir des tubes éppendorfs, nous avons ensemencé chacune des souches lactiques isolées dans des tubes à essai contenant 10 mL du bouillon MRS. Le tube est incubé à 30 °C pendant 18 heures en anaérobiose. Alors que les souches indicatrices sont été ensemencées dans des tubes de BHIB et incubées à 37 °C pendant 18 heures.

II.7.1.1. Méthode de spots (contacte directe)

Pour la détection de l'activité antagoniste, on utilise le test de spot sur milieu gélosé **(Tomé et *al.,* 2008)**. Les souches indicatrices sont inoculées dans le bouillon BHI et incubées pendant une nuit à 37°C. Le comptage des cellules viables après la période d'incubation définie se fait par comptage des colonies sur gélose BHI. Les souches lactiques ont été inoculées dans du bouillon MRS à 30°C pendant 18h, par la suite, 5µL de cultures ont été déposées sous forme des spots sur la surface des de gélose MRS et incubées à 30°C en anaérobiose.

Après 24 heures, un volume d'approximativement 9 log UFC/mL de chaque souche indicatrice a été inoculé dans 10 mL de gélose BHI semi-solide (pour les souches indicatrices non lactique) ou MRS semi-solide (pour les souches indicatrices lactique) et versés sur la couche de MRS en recouvrant les spots des BL et incubé pendant 24 heures à 30 et 37°C. Toute zone d'inhibition claire autour des spots a été mesurée.

II.7.1.2.Méthode de puits (contacte indirecte)

Cette méthode permet de mettre en contact le surnageant de la souche lactique productrice de substance antimicrobienne avec la souche indicatrice. Les 17 souches précédemment sélectionnées pour leur production de substances antimicrobienne sont concernées par ce test.
Les boites de pétri contenant la gélose BHI semi solide, préalablement coulée et solidifiée, sont préalablement ensemencé par les souches indicatrices standardisées (approximativement 10^6 UFT/mL) (*Enterobacter amnigenus, Staphylococcus aureus, Pseudomonas luteola, Enterobacter aerogenes, Eshirichia coli,* présumé *Streptocoque* et présumé *Pseudomonas*).

En parallèle les cultures lactiques jeunes sont centrifugées (10 000 tours/10min) et les surnageants sont récupérés. Sur la gélose BHI semi solide (0.7% d'agar), des puits de 5 mm de diamètre sont confectionnés, chaque puits a reçu 20 µL de surnageant, les boites sont

ensuite placées à 4 °C pendant 4 heures. Après incubation 24h à 37 °C, les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés selon la formule suivante :

Zone d'inhibition (mm) = diamètre de la zone d'inhibition obtenue (mm) – Diamètre de puits (6 mm).

L'inhibition est dite positive si la zone de lyse est supérieure à 2 mm (**Thompson et *al.*, 1996**). Un témoin est effectué avec le bouillon MRS stérile (figure 9).

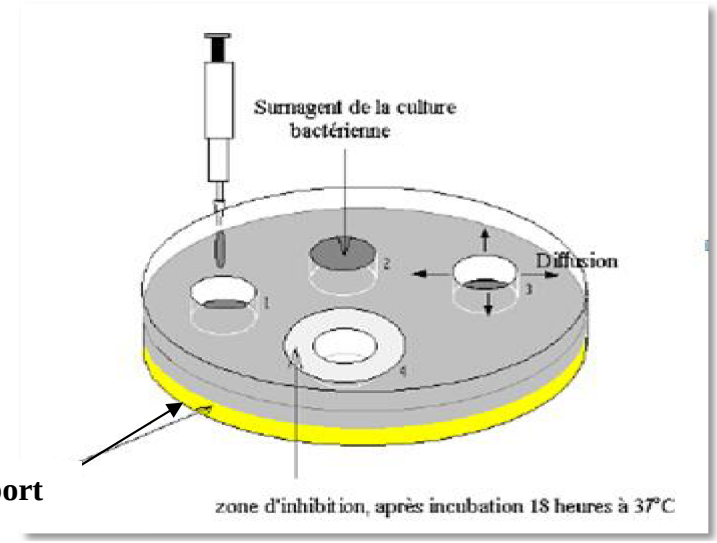


Figure 9. La recherche de l'activité antibactérienne par la méthode des puits.

II.7.2. Screening de l'activité antifongique des souches lactiques

II.7.2.1. Préparation de l'inoculum

Les souches fongiques sont cultivées sur PDA solide à 25C° pendant 24h pour les levures et 3 à 5 jours pour les moisissures, puis une colonie de chaque levure et ensemencé dans 10 mL d'eau physiologique stérile, pour les moisissures on a grattées les spores et mis dans l'eau physiologique stérile contiens 0.1% $tween_{80}$ pour dispersé les spores. Le dénombrement fait par cellule de Malassez.

La numération cellulaire est la détermination du nombre de cellules ou spores contenues dans un volume précis de milieu liquide. On exprime le résultat de la numération en concentration cellulaire, ou sporale.

La numération est réalisée directement par comptage au microscope, à l'aide d'une cellule de comptage (par ex : cellule de Malassez ou autres cellules). La cellule de Malassez est constituée d'une lame et d'une lamelle permettant de définir un volume fixe. Sur la lame sont gravés 100 rectangles. Parmi les 100 rectangles totaux, on trouve 25 rectangles qui sont subdivisés en 20 petits carrés afin de faciliter le comptage. Le volume correspondant au quadrillage total est égal à 1 mm^3 soit 1 µL.

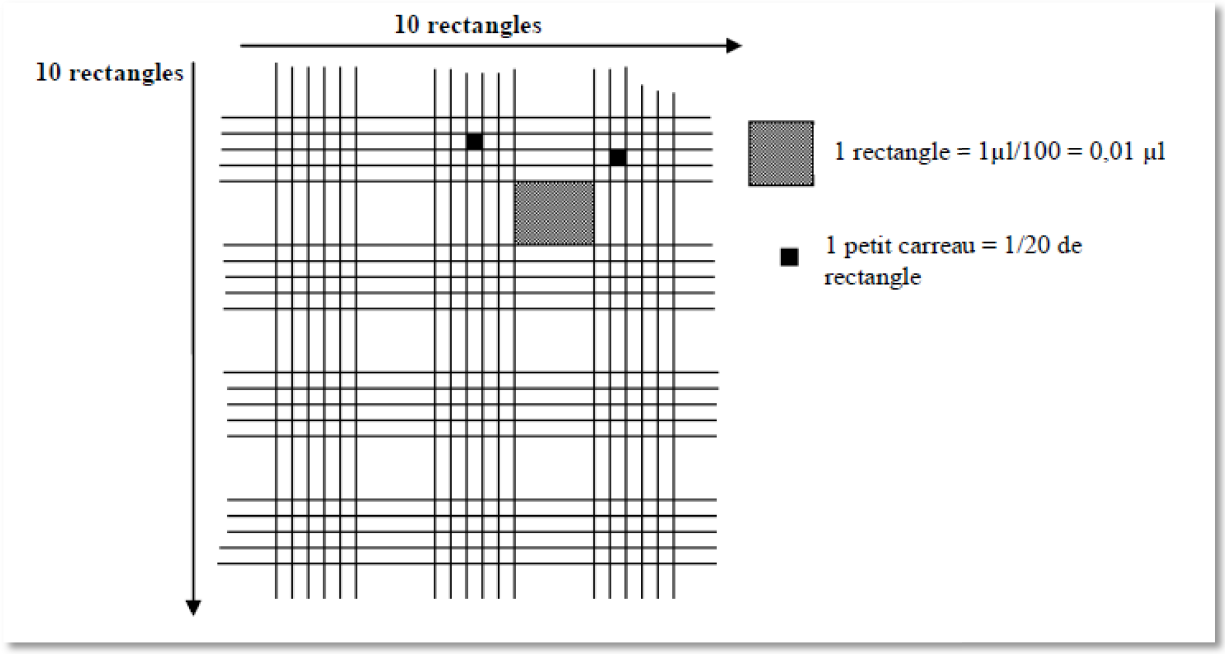


Figure 10. Schéma d'une portion de la lamelle.

Le comptage se fait comme suit :

- Compter le nombre de cellules dans au moins 4 rectangles jusqu'à concurrence de 100 cellules environ.
- Pour les cellules qui chevauchent 2 rectangles, ne les compter qu'une fois : en pratique, compter les cellules qui chevauchent la ligne horizontale supérieure et la ligne verticale droite.
- faire la moyenne du nombre de cellules par rectangle.

II.7.2.2. Méthode de double couche (contacte directe)

Pour la recherche de l'activité antifongique, la méthode de double couche ou recouvrement décrit par **Magnusson et *al*., (2003)** a été utilisée. Les isolats ont d'abord ensemencé en deux stries sur MRS, puis incubés à 30C° pendant 48h. Les colonies obtenues ont été ensuite recouvertes par 10 ml de milieu PDA semi solide (0.7% d'agar) contenant la charge obtenu par numération cellulaire de la souche cible. Après incubation de 72h pour moisissures, et 24 h pour les levures à 25C°, les zones d'inhibition ont été évaluées autour des stries de bactéries selon les critères suivant :

(-) : absence de zone d'inhibition ;
(+) : Zone d'inhibition comprise entre 0.1 à 3% de la surface de la boite de pétri ;
(++) : Zone d'inhibition comprise entre 3 à 8% de la surface de la boite pétri ;
(+++) : Zone d'inhibition supérieur à 8% de la surface de la boite de pétri.
Les tests d'inhibition ont été réalisés en triplicat.

II.7.2.3. Méthode de diffusion par puits (contacte indirecte)

Pour la recherche des substances antifongique, la méthode de diffusion par puits a été recommandée pour les souches lactiques actives sélectionnées.

Sur les boites de pétri contenant la gélose PDA semi solide (0.7% d'agar), coulée et solidifiée, préalablement ensemencé par les souches indicatrices standardisées : *Penicilium sp, Rhizopus sp* et la levure endogène C_3J_7.

En parallèle les cultures lactiques actifs sont centrifugées (10 000 tours/10min) et les surnageants sont récupérés. On a confectionnés des puits de 5 mm de diamètre, chaque puits a reçu 20 µL de surnageant natifs, les boites sont ensuite placées à 4 °C pendant 4 heures. Après incubation (25C° pendant 24h pour la levure C_3J_7 et 48h à 72h pour les moisissures *Penicillium sp* et *Rhizopus)*, les diamètres des zones d'inhibition autour des puits sont mesurés.

II.7.3. Caractérisation de l'agent inhibiteur des surnageants actifs

Les bactéries lactiques sont capables d'inhiber d'autres bactéries du même groupe ou d'autres genres par la production d'un grand nombre d'agents inhibiteurs. Parmi lesquels nous pouvons citer principalement les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène ou les bactériocines, etc. La recherche de la nature de l'agent inhibiteur est devenue indispensable. L'utilisation des enzymes protéolytiques, la trypsine, la présure et l'α-amylase permet de déterminer la nature protéique des substances inhibitrices, la sensibilité thermique de la substance a été testée par un chauffage à déférents température. La présence de la zone d'inhibition après chaque traitement indique la stabilité de la substance inhibitrice **(Menad, 2017)**

Le protocole décrit par **Yaakoubi et** *al.,* **(2009)** permet de mettre en évidence la nature de l'agent inhibiteur, il se base sur un arbre décisionnel présenté par la figure 11.

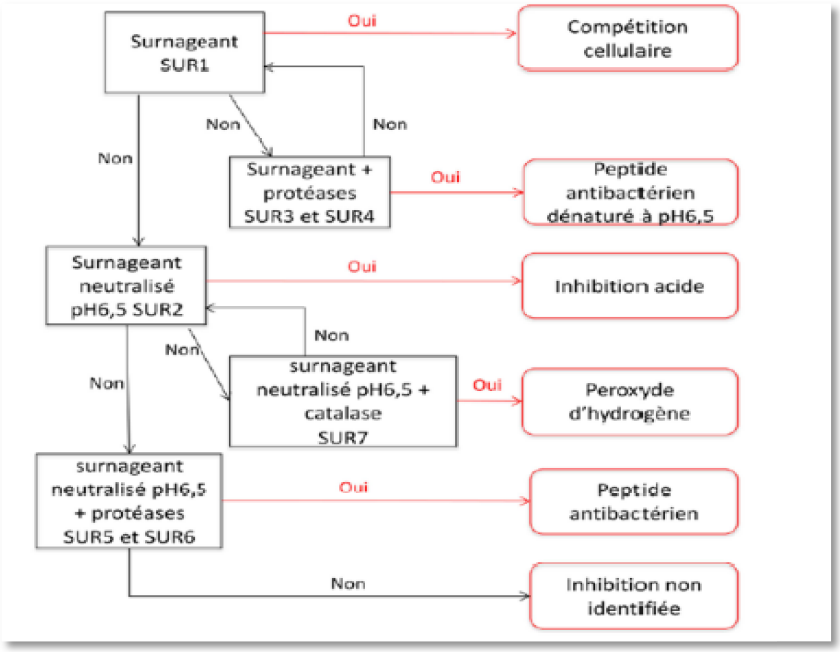


Figure 11: Arbre décisionnel des modalités d'identification des produits responsables de l'inhibition portant sur la question de la croissance des souches indicatrices (« oui » traduisant une croissance des souches indicatrices et « non » une absence de croissance) (**Duniere, 2012).**

II.7.3.1. Inhibition due à la production des acides organiques

L'étude de l'effet de l'abaissement du pH du milieu sur l'inhibition des souches fongiques est réalisée sur le surnageant neutralisé à pH 6,5 par ajout d'une solution NaOH 5N, puis le surnageant neutralisé sont stérilisés avec travers des membranes de diamètre 0,22 µm (**Castro et *al.*, 2011**). Sur les boites de pétri contenant la gélose PDA semi solide (0.7% d'agar), coulée et solidifiée, préalablement ensemencé par les souches indicatrices standardisées *Penicilium sp, Rhizopus* et la levure C_3J_7. En parallèle les cultures lactiques actifs sont centrifugées (10 000 tours/10min) et les surnageants sont récupérés puis neutralisé. On a confectionnés des puits de 5 mm de diamètre, chaque puits a reçu 20 µl de surnageant neutralisé, les boites sont ensuite placées à 4 °C pendant 4 heures. Après incubation (25C° pendant 24h pour la levure C_3J_7 et 48h à 72h pour les moisissures *Penicilium sp* et *Rhizopus* les diamètres des zones d'inhibition autour des puits sont mesurés.

II.7.3.2. Inhibition due au peroxyde d'hydrogène

Pour l'étudié Inhibition due au peroxyde d'hydrogène la méthode de diffusion par est toujours utilisé, des boites de pétri contenant la gélose PDA semi solide, coulée et solidifiée, préalablement ensemencé par les souches indicatrices standardisées codées (C_5 J_0, C_7 J_0 et C_3 J_7). En parallèle les bouillons des cultures lactiques actifs sont centrifugées (10 000 tours/10min) et les surnageants sont récupérés puis on a ajouté l'enzyme catalase à raison de 1%. Sur la gélose PDA semi solide (0.7% d'agar), des puits de 5 mm de diamètre sont confectionnés, chaque puits a reçu 20 µl de surnageant catalisé, les boites sont ensuite placées à 4 °C pendant 4 heures. Après incubation (25C° pendant 24h pour la levure C_3 J_7 et 48h à 72h pour les moisissures *penicillium sp* et *rhizopus* les diamètres des zones d'inhibition autour des puits sont mesurés.

Par la suite on a combiné Inhibition due à la production des acides organiques et Inhibition due au peroxyde d'hydrogène ; on suivre le protocole de méthode de diffusion par puits utilisé, les surnageants de culture lactique sont neutralisé par NAOH à pH 6.5 puis catalisé à raison de 1%, les puits confectionné préalablement sur le PDA semi solide reçoivent 20 µL des surnageants traité les boites sont ensuite placées à 4 °C pendant 4 heures. Après incubation (25C° pendant 24h pour la levure C_3 J_7 et 48h à 72h pour les moisissures C_5 J_0 et C_7 J_0) les diamètres des zones d'inhibition autour des puits sont mesurés.
La technique à été appliqué comme suit :

- Puit 1 : 20 µL du surnageant natif.
- Puit 2 : 20 µL du surnageant natif + NaOH (5N) + filtration (pour mettre en évidence l'effet du H_2O_2 et d'autres agents antifongiques présents).
- Puit 3 : 20 µL du surnageant natif + catalase (1mg/ml du tampon PBS pH 7,2) + filtration pour éliminer l'effet du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 présent dans le surnageant.
- Puit 4 : 20 µL du surnageant natif + NaOH + Catalase + filtration (pour éliminer l'effet du H_2O_2, les acides organiques et confirmer la présence d'autres substances antifongiques).

Après incubation, les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés.

II.7.3.3. Effet des enzymes digestifs

La détection de la nature protéique et/ou glycoprotéique des substances antifongiques est mise en évidence par l'étude de la stabilité de l'inhibition après traitement par déférentes enzymes protéolytiques.

Les cultures lactiques actifs sont centrifugées (10 000 tours/10min) et les surnageants sont récupérés puis chaque surnageant est traité a raison de 1% avec les différents enzymes (protéinase K, trypsine, présure et α-amylase), les enzymes préparés selon le protocole de a raison 20mg dans 10mL de tampon PBS stérile, puis stérilisé le tout par filtration, puis incuber surnageants traités avec les enzymes à 37C° pendant 2h pour permettre le contact surnageant-enzyme **(Benkerroum et *al.*, 2000 ; Chen et Hoover, 2003)**. Sur une boite contenant la gélose PDA semi solide (0.7% d'agar), des puits de 5 mm de diamètre sont confectionnés, chaque puits a reçu 20 µL de surnageant traité comme suit :

- Puit 1 : 20 µL du surnageant natif ;
- Puit 2 : 20 µL du surnageant natif + protéinase K ;
- Puit 3 : 20 µL du surnageant natif + trypsine ;
- Puit 4 : 20 µL du surnageant natif + présure ;
- Puit 5 : 20 µL du surnageant natif + α-amylase.

Les boites sont ensuite placées à 4 °C pendant 4 heures, puis ré-incubés à 25C° pendant 24h pour les levures et 48h à 72h pour les moisissures. Les diamètres des zones d'inhibition autour des puits sont mesurés.

II.7.3.4. Effet de température

Les substances antifongiques vont l'objet d'étude de leur résistance à la température et la conservation de leur activité vis-à-vis des souches indicatrices. Dans tout les cas l'activité inhibitrice est évaluée par la technique de diffusion en puits **(Achemchem et *al.*, 2004)**

Chaque surnageant des souches lactiques productrices est placé dans un tube eppendorfs puis placé dans un bain marré à différentes températures : à 45C°, 70C°, 100C°, et 120C° pendant 20min. sur boite de Pétri contenant le milieu PDA semi-solide (0.7% d'agar), des puits de 5 mm de diamètre sont confectionnés, chaque puits a reçu 20 µL de surnageant traité. Comme suit :

- Puit 1 : 20 µL du surnageant natif (témoin) ;
- Puit 2 : 20 µL du surnageant chauffé à 45C° pendant 20 min ;
- Puit 3 : 20 µL du surnageant chauffé à 70C° pendant 20 min ;
- Puit 4 : 20 µL du surnageant chauffé à 100C° pendant 20 min ;
- Puit 5 : 20 µL du surnageant chauffé à 120C° pendant 20 min.

Apres incubation 25C° pendant 24h pour les levures et 48h à 72h pour les moisissures. Les diamètres des zones d'inhibition autour des puits sont mesurés.

Résultats et Discussion

III. Résultats et Discussion

III.1. Caractérisation morphologique et physiologique des souches

III.1.1. Caractérisation des souches lactiques

Pour les isolats lactiques, on a observé sur milieu MRS solide des petites colonies d'environ 1mm de diamètre, de forme circulaire de couleur blanchâtre, marron ou crémeuse, avec une surface lisse et un pourtour circulaire régulier ou irrégulier (photo 1).

Les vignt-neuf (29) souches lactiques ont été cultivées sur milieu MRS un milieu riche, du fait des exigences nutritionnelles des bactéries lactiques, les milieux de culture doivent être très riches en sucres, en matières azotées et surtout en facteurs de croissances **(Pilet *et al.*, 2005).**

Les souches présentent un trouble homogène sur le bouillon MRS qui caractérise le groupe des bactéries lactiques. Les cultures obtenues sur les boites de Pétri sont observées à l'œil nu pour caractériser la forme, la taille, l'aspect ainsi que la couleur des colonies **(Badis et *al.*, 2005).** Sur bouillon MRS (photo 1) les souches présentent un trouble homogène qui caractérise le groupe des bactéries lactiques avec la formation d'un précipité au fond du tube. Selon **Carr et *al.*, (2002).**

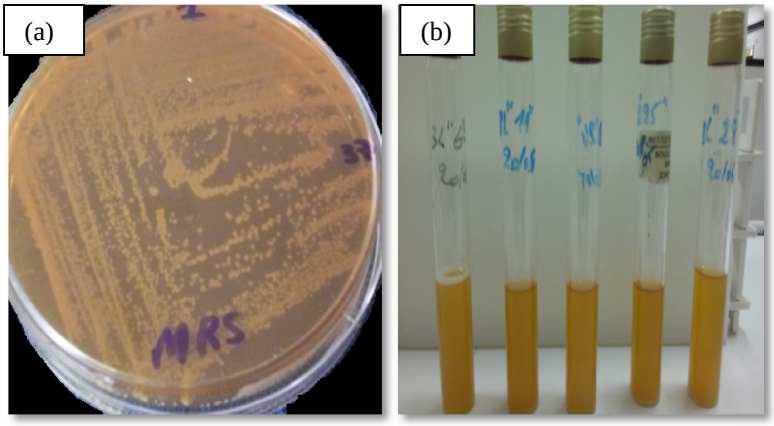


Photo 1. Aspect des bactéries lactiques
[(a)]: sur gélose MRS, [(b)]: sur bouillon MRS.

L'observation microscopique des bactéries lactiques à l'état frais a révélé la présence des cellules immobile, et après coloration de Gram on a constaté que l'ensemble des souches sont à Gram positif, l'observation microscopique des souches après coloration (photos 2) a révélé deux formes de cellules : Les coques sont isolé ou disposées en pairs (diplocoques ou en chênette), bacilles ou coccobacille.

III.1.2. Test catalase

D'après ce teste, nous avons observé l'absence totale de dégagement de bulles d'oxygène ce qui montre que toute les souches lactiques sont à catalase négative.

Et ceci est la cause de l'incapacité des bactéries lactiques de synthétiser les porphyrines (et donc des cytochromes et de la catalase) de ce fait elles ne dégradent pas le peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène qui se manifeste par la formation de bulles **(Whittenbury, 1998).**

Whittenbury (1998) a considéré que les bactéries lactiques comme des germes anaérobies facultatifs préfère qu'elles soient dans des conditions anaérobies, et qu'apparemment, elles ne sont pas capables de former de l'ATP par la chaîne de transport des électrons (ou phosphorylation oxydative

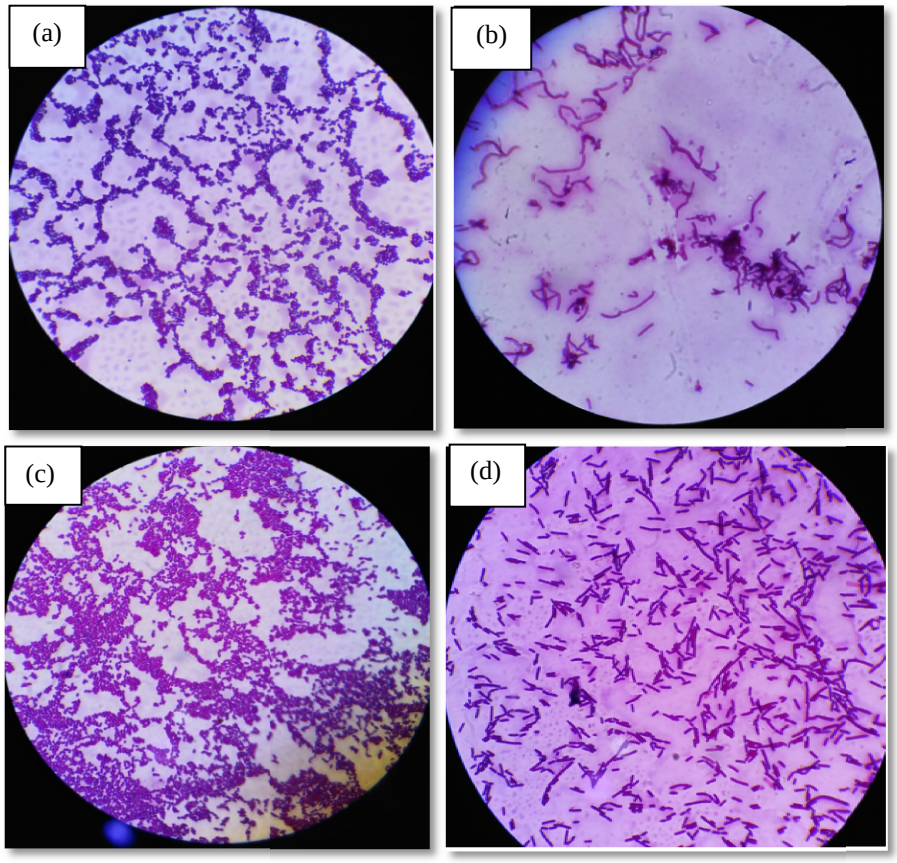


Photo 2. Observation microscopique de quelque souche lactique (microscope optique Gx100)
[a]: cocci, [b]: long bacille, [c]: cocci ovoïde, [c] : bacille.

Tableau 6. Les caractères microscopiques et test catalase des bactéries lactiques.

La souche	Etat frais	catalase	gram	Mode de regroupement	Identification
BL1	immobile	négatif	positif	Coccobacille	*Lactobacillus*
BL2	immobile	négatif	positif	Cocci	*Leuconostoc*
BL3	immobile	négatif	positif	Cocci	*Enterococcus*
BL4	immobile	négatif	positif	Cocci	*Leuconostoc*
BL5	immobile	négatif	positif	Cocci	*Leuconostoc*
BL6	immobile	négatif	positif	Cocci	*Enterococcus*
BL7	immobile	négatif	positif	Cocci	*Leuconostoc*
BL8	immobile	négatif	positif	Cocci	*Leuconostoc*
BL9	immobile	négatif	positif	Cocci	*Leuconostoc*
BL10	immobile	négatif	positif	Cocci	*Leuconostoc*
BL11	immobile	négatif	positif	Bacille	*Lactobacillus*
BL12	immobile	négatif	positif	Coccobacille	*Lactobacillus*
BL13	immobile	négatif	positif	Cocci	*Leuconostoc*
BL14	immobile	négatif	positif	Cocci	*Leuconostoc*
BL15	immobile	négatif	positif	Cocci	*Leuconostoc*
BL16	immobile	négatif	positif	Cocci	*Lactococcus*
BL17	immobile	négatif	positif	Coccobacille	*Lactobacillus*
BL18	immobile	négatif	positif	Cocci	*Leuconostoc*
BL19	immobile	négatif	positif	Cocci	*Leuconostoc*
BL20	immobile	négatif	positif	Cocci (tétrade)	*Pediococcus*
BL21	immobile	négatif	positif	Cocci (tétrade)	*Pediococcus*
BL22	immobile	négatif	positif	Cocci (tétrade)	*Pediococcus*
BL23	immobile	négatif	positif	Cocci	*Lactococcus*
BL24	immobile	négatif	positif	Bacille	*Lactobacillus*
BL25	immobile	négatif	positif	Cocci (tétrade)	*Pediococcus*
BL26	immobile	négatif	positif	Bacille	*Lactobacillus*
BL27	immobile	négatif	positif	Bacille	*Lactobacillus*
BL28	immobile	négatif	positif	Cocci (tétrade)	*Pediococcus*
BL29	immobile	négatif	positif	Bacille	*Lactobacillus*

III.1.3. l. Caractérisation des souches indicatrices

III.1.3.1.Caractérisation des bactéries indicatrices endogènes

Les souches indicatrices endogènes *Enterobacter amnigenus* (C_1), une souche présumée comme *Streptococcus* sp (C_2), *Staphylocoque aureus* (C_3), *Pseudomonas luteola* (C_4), *Enterobacter aerogenes* (C_6) et *Eshirichia coli* (C_7), ces souches poussent bien sur milieu BHA donnent des colonies moyennes de diamètre 2 à 3 mm de couleur crémeuse avec une surface lisse et un pourtour régulier ou irrégulier.

Pour la souche présumée *Pseudomonas* sp (C_5) on a observé des colonies lisses envahissante de couleur crémeuse avec centre opaque et aux bords clairs irréguliers.
L'observation microscopique des bactéries indicatrices à l'état frais a révélé la présence des cellules mobile ou immobiles, après coloration de Gram la présence des bactéries Gram+ et Gram- (photo 3), et deux forme des cellules : Les coques et les bacilles ou coccobacille. (Tableau 7).

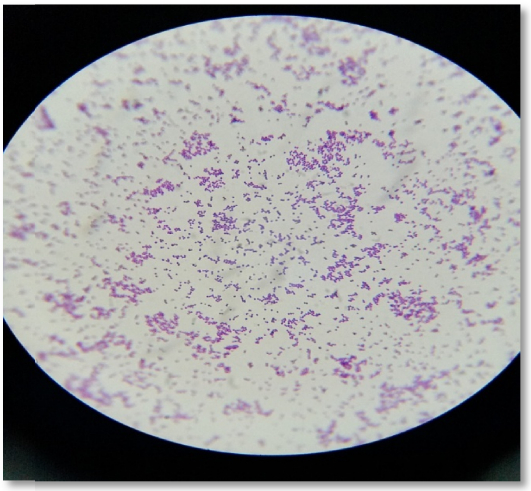


Photo 3. L'observation microscopique de la souche *S.aureus* (C_3)
(microscope optique Gx100)

Tableau 7. Les caractères microscopiques des souches indicatrices endogènes.

	Les tests			
Les souches indicatrices	mobilité	catalase	Gram	forme
Enterobacteramnigenus C_1	+	+	-	Coccobacille
Streptococcus sp C_2	-	-	+	cocci
Staphylocoque aureus C_3	+	+	+	cocci
Pseudomonas luteola C_4	+	+	-	bacille
*Pseudomonas*sp C_5	+	+	-	bacille
Enterobacteraerogenes C_6	+	+	-	coccobacille
Eshirichia coli C_7	+	+	-	Bacille

III.1.3.2. Caractérisation des souches fongiques

Les caractères macroscopiques de l'isolat sélectionné sont étudiés sur le milieu PDA le plus communément utilisé à cet effet **(Botton, 1990).**

Selon **Botton** et *al.* **(1990),** l'identification des moisissures fait essentiellement appel aux caractères culturaux et morphologiques : Les caractères culturaux reposent sur des critères macroscopiques**.** Tels, la vitesse de croissance, la texture, la couleur du thalle, la couleur du revers de la culture, l'odeur, l'exsudat et la présence d'un pigment diffusible. Les deux moisissures utilisées sont souches pré-identifiées comme *Rhizopus* sp (C_5J_0) et *Penicilium* sp (C_7J_0).

Tableau 8. Identification macroscopique des moisissures

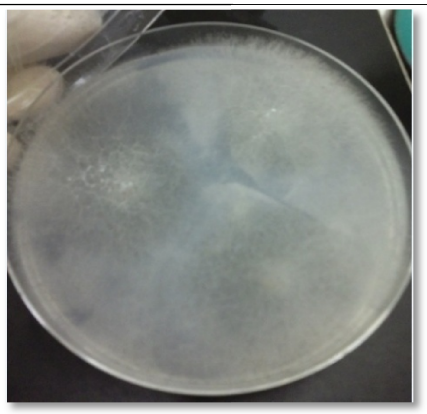
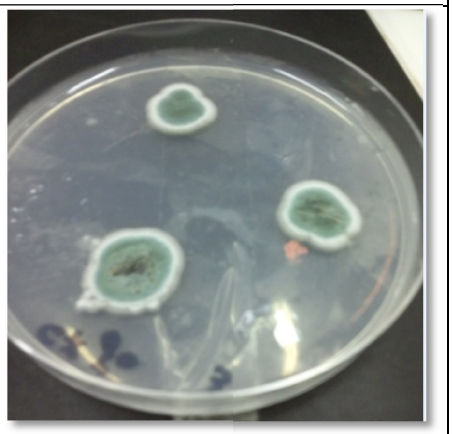
La souche	Relief	Vitesse de croissance	Couleur	Aspect macroscopique
Rhizopus sp C_5J_0	plane	Rapide (72h)	Surface cotonneuse, blanc beige à brun	
Penicilium sp (C_7J_0)	plane	Rapide (72h)	vert cotonneuse, revers blanc	

Tableau 9. Identification microscopique des moisissures.

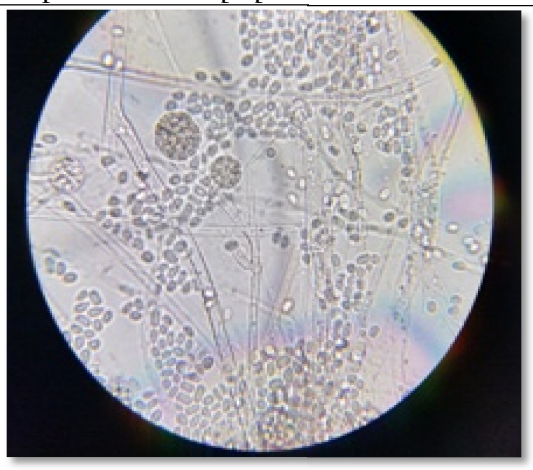
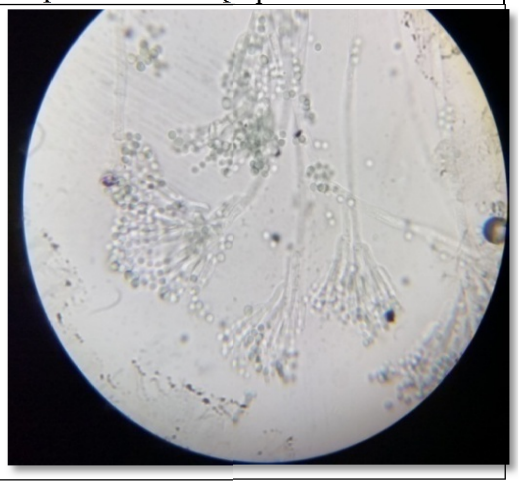
La souche	Caractère microscopique	Aspect microscopique
Rhizopus sp (C_5J_0)	le mycélium de type cloisonné portant des sporanges bruns et des Sporocystophore non ramifié ovoïde. les chlamydospores sont isolé et en chênettes.	

Tableau 9. Identification microscopique des moisissures (suite).

La souche	Caractère microscopique	Aspect microscopique
Penicilium sp C_7J_0	Le mycélium de type cloisonné portant de nombreux conidiophores isolés, ramifiés, terminés par un pénicille, le Pénicille constitue de phialides branchés directement à l'extrémité du conidiospores	

Les levures sont étudiées sur milieu PDA, après 24h d'incubation elles donnent des petites colonies (voir moyen) ronde, pourtour régulière de couleur blanchâtre et lisse.

L'observation microscopique des levures (Photo 4) a réveillée la présence de levures rondes ou ovales (2 à 4 µm) bourgeonnante et absence de mycélium. Ces résultats sont conformes à ceux donnés par **Davise Larone (1987)** pour le genre *Cryptococcus.*

Tableau 10. Caractérisation macroscopique des levures.

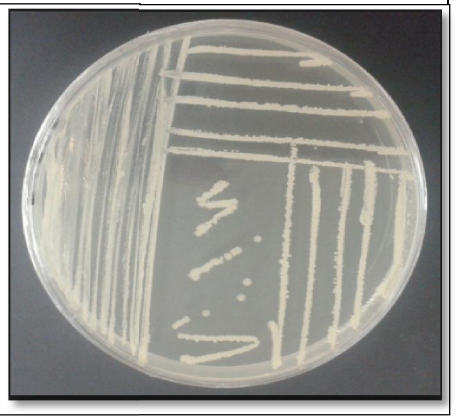
La souche	caractères	couleur	Vitesse de croissance	Aspect macroscopique
La levure (C_3J_7)	Colonies ronde ou circulaire pourtour régulière	Blanc crémeuse	Rapide (24h)	

Tableau 10. Caractérisation macroscopique des levures (suite)

La souche	caractères	couleur	Vitesse de croissance	Aspect macroscopique
Sc. cerevicea	Colonies ronde ou circulaire pourtour régulière	Blanchâtre	Rapide (24h)	

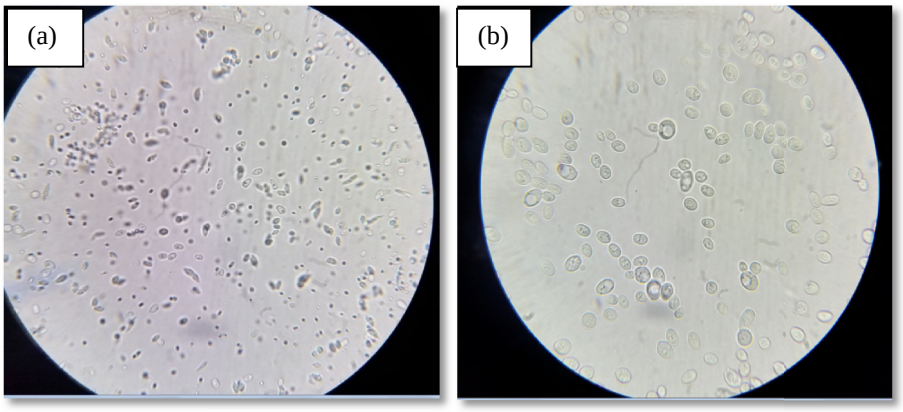


Photo 4. Observation microscopique des levures (microscope optique Gx100):
[(a)] : levures endogène (C_3J_7); [(b)] : *Saccharomyces cerevicea.*

Le développement des levures et moisissures en surface des produits carnés séchés et affinés participe directement à l'acquisition et à l'amélioration des qualités organoleptiques. Toutefois, un développement incontrôlé d'une flore fongique contaminante peut être à l'origine d'une altération de l'aspect voire conduire à la production et à l'accumulation de mycotoxines (**Tabuc et *al*., 2004**).

A nos connaissances, il n'existe pas une étude mycologique publiée sur le kaddid, des analyses mycologiques réalisées sur des échantillons de jambon Istrian produit dans le sud de la Croatie, ont mis en évidence la présence de 17 espèces fongiques appartenant aux genres *Penicillium*, *Aspergillus, Eurotium* et *Mucor*. Les espèces de *Penicillium*, *Aspergillus* et *Eurotium* représentaient plus de 97 % d'espèces isolées (**Comi et *al*., 2004**). Ainsi une étude sur les levures dans les saucisses sèches artisanales révèle la dominance du genre *Debaryomyces* suivi par *Candida, Rhodotorula, Trichosporon, Yarrowia* et *Pichia* dans l'intérieur et l'extérieur du produit (**Mendonça et *al*., 2013**).

III.2.3. Identification biochimique des bactéries indicatrices endogènes

III.2.3.1.Test catalase

Après réalisation de test catalase on estimé quel es souches indicatrices *Enterobacter amnigenus* (C_1), *Staphylocoque aureus* (C_3), *Pseudomonas luteola* (C_4), la souche présumé *Pseudomonas* (C_5), *Enterobacter aerogenes* (C_6), et *Eshirichia coli* (C_7) possèdent une catalase alors que la souche présumée *Streptococcus* sp (C_2) dépourvu de la catalase. (Tableau7).

III.2.3.2.Test de coagulase

La souche présumée *Staphylococcus aureus* (C_3) testée est capable de provoquer la coagulation du plasma sanguin c qui traduit par la formation d'un coagulum.

III.2.3.3. Profile biochimique des souches identifiées

L'identification biochimiques est réalisé sur les galeries miniaturisées API staph pour la souche staphylococcale C_3 (Tableau 11 et photo 6) et la galerie Api 20E pour les entérobactéries (C_1, C_4, C_6 et C_7) (Photo 5, 7 et tableau 12).

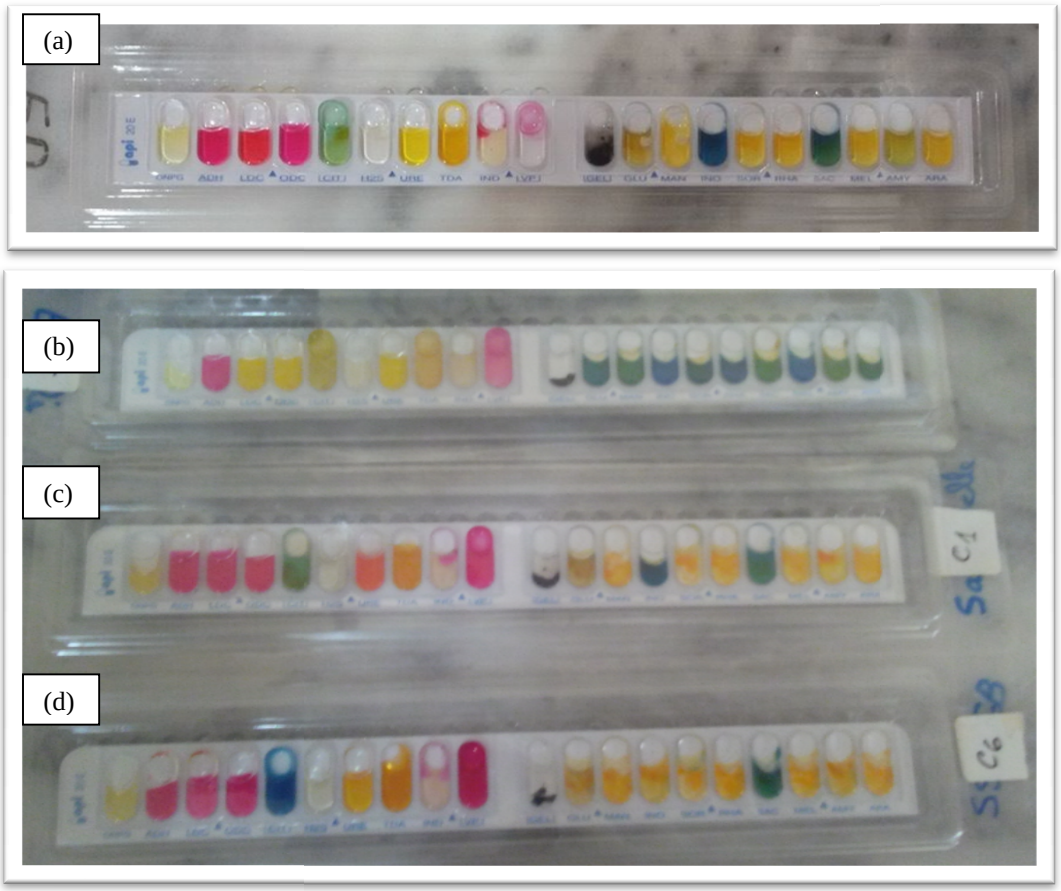


Photo 5. Résultats de profile biochimique des Entérobactéries utilisés
[a] : *E. coli* C_7, [b] : *Pseudomonas luteola* C_4, [c] :*Enterobacter amnigenus* C_1, [d]:*Enterobacter aerogene* C_6.

Tableau 11. Résultats d'identification biochimique la souche endogène *S. aureus* C_3.

Tests	substrats	résultat
0	Aucun	négatif
GLU FRU MNE MAL LAC TRE MAN XLT MEL	D-Glucose D-Fructose D-Mannose Maltose Lactose D-Trehalose D-Mannitol Xylitol D-Melibiose	positif
NIT	Nitrate depotassium	positif
PAL	β-naphtylacphosphate	negatif
VP	Pyruvate desodium	negatif
RAF XYL SAC MDG NAG	Raffinose Xylose Saccharose α-methyl-Dglucoside N-acetylglucosamine	negatif positif negatif negatif positif
ADH	Arginine	negatif
URE	Uree	negatif
Test coagulase	positif	
résultat	*Staphylococcus aureus* (88%)	

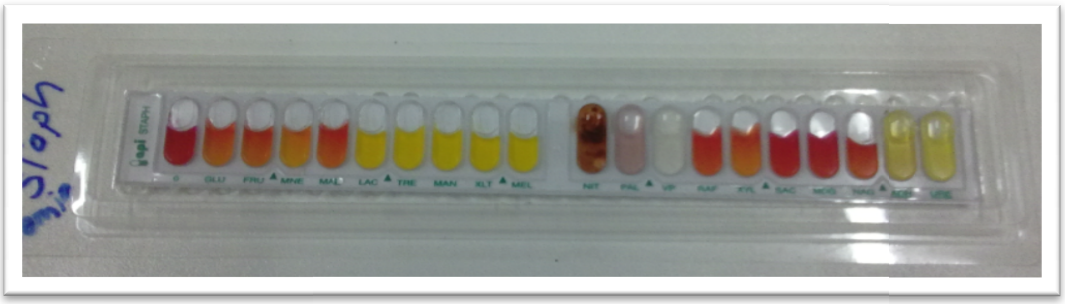


Photo 6. Résultats de profile biochimiques de la souche *S. aureus* C_3.

.

Les staphylocoques sont les micro-organismes les plus reliés à la sécurité du produit, puisqu'ils sont des micro-organismes halophiles qui peuvent survivre à des concentrations élevées en sel (**Casaburi et *al*., 2005**), de ce fait leur présence dans les échantillons n'est pas inattendue. En effet, la présence des staphylocoques à coagulase positive (SCP) peut induire des intoxications alimentaires, la production des toxines par ces microorganismes durant leur croissance dans la viande et au cours de séchage du kaddid où la valeur de l'a_W n'est pas suffisamment basse pour arrêter la croissance de la plupart des microorganismes.

Tableau 12. Résultats des tests physiologiques et biochimiques des *Enterobacteriacae*.

Code	C_1	C_4	C_6	C_7
forme	coccobacille	Bacille	Coccobacille	Bacille
Mobilité	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+
Gram	-	-	-	-
ONPG	+	+	+	+
ADH	+	+	+	+
LDC	+	-	+	+
ODC	+	-	+	+
CIT	+	-	+	-
H2S	-	-	-	-
URE	+	-	-	-
TDA	-	-	-	-
IND	+	-	+	+
VP	+	+	+	+
GEL	-	-	-	+
GLU	+	-	+	+
MAN	+	-	+	+
INO	-	-	+	-
SOR	+	-	+	+
RHA	+	-	+	-
SAC	-	-	-	-
MEL	+	-	+	+
AMY	+	-	+	+
ARA	+	-	+	+
Résultats	*En.amnigenus* 93.5%	*Ps.luteola* 81 %	*En.aerogenes* 67.1%	*E. coli* 75.4%
(+): test positif ; (-): test négatif				

La présence des coliformes comme *Escherichia coli*, *Klebsiella* et *Citrobacter*, etc ainsi des entérobactéries pathogènes comme *Salmonella* dans le kaddid est due à l'insuffisance d'hygiène durant l'abattage et l'éviscération et/ou le non-respect des risques de la contamination croisée, la présence des nuisibles peut aussi jouer un rôle dans la contamination du kaddid durant la maturation, ils sont des vecteurs des microorganismes tels les Salmonelles et les Staphylocoques, les Entérobactéries et les Clostridies. Ces nuisibles contaminent le kaddid exposé par leur fèces, par leur pelage et par leurs urines (**Chevallier et *al*., 2006**).

III.3. Résultats de l'activité antibactérienne des souches lactiques

III.3.1. Contacte directe (test de spots)

Les résultats de l'interaction obtenue révèlent la présence des zones claires autour des souches lactiques ensemencées en touches (Photo 8), Ces résultats indiquent la présence des zones d'inhibitions des souches indicatrices auteur des spots des bactéries lactiques (Figure 12).

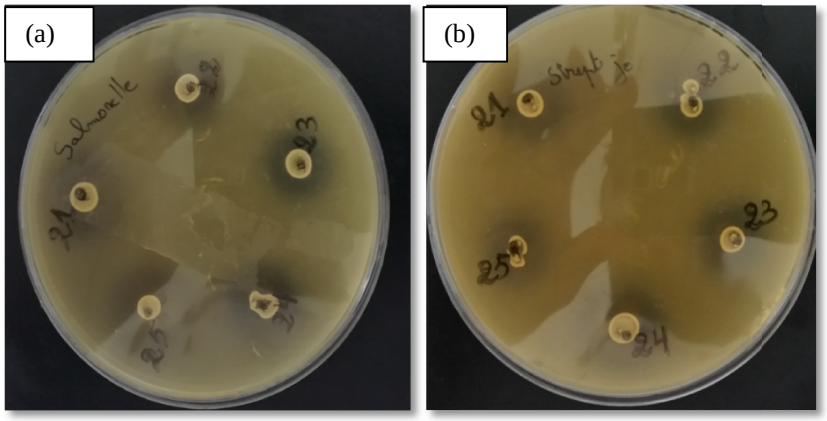


Photo 7. Activité inhibitrice de bactéries lactiques par contact direct contre : [a] : *Salmonella* sp ; [b] : *Streptococcus* sp.

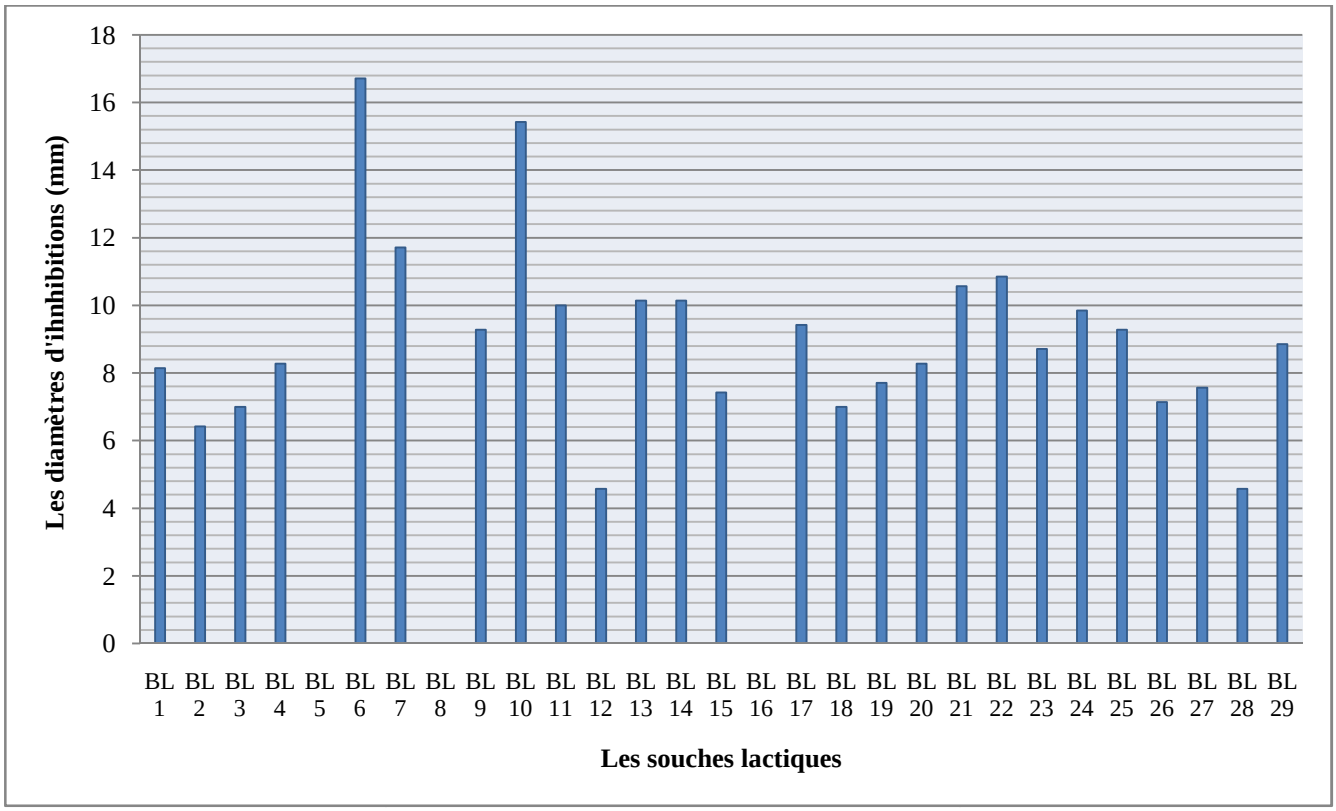


Figure 12. Les diamètres d'inhibition en (mm) par contact direct.

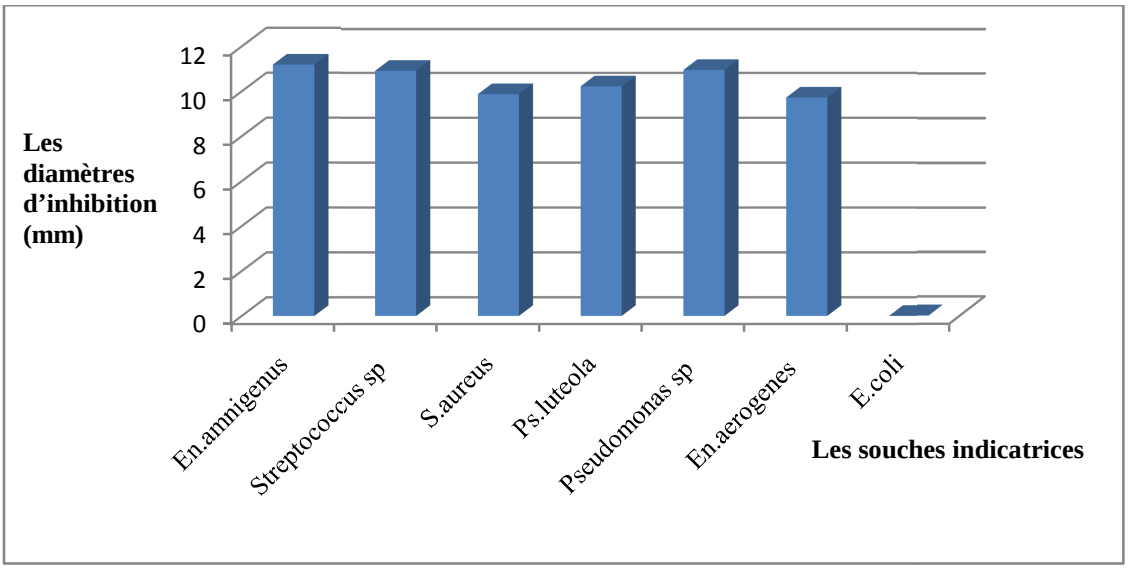


Figure 13. Représentation des diamètres d'inhibition en (mm) pour chaque souche indicatrice.

D'après la Figure 12, Parmi les 29 souches lactiques utilisés, 26 souches possèdent une activité antibactérienne vis-à-vis : *Enterobacter amnigenus* C_1, *Streptococcus* sp C_2, *Staphylococcus aureus* C_3, *Pseudomonas luteola* C_4, *Pseudomonas* sp C_5 et *En.aerogenes* C_6. Les diamètres des zones d'inhibition des bactéries lactiques sont différents (Figure 13), nous pouvons noter la souche *En.amnigenus* à Gram-, est la souche la plus sensible aux 26 souches lactiques avec un moyen d'inhibition 11.19 mm, par la suite vienne la souche présumée *Streptococcus* sp une bactérie a Gram+ et considérée comme BL, ensuit les deux souches saprophytes *Ps.luteola* et la souche *Pseudomonas* sp avec des diamètres de 10.23à 10.96 mm respectivement, et après *S.aureus* avec un moyen de 9.88 mm, enfin la souche *E.coli* n'a montrée aucune sensibilité vis-à-vis les toutes les BL utilisées.

Ababsa, (2012) a été observé que l'effet des souches lactiques était significativement différent selon le type de Gram, il est plus important contre les bactéries indicatrices à Gram négatif que contre celles à Gram positif. Ceci laisse suggérer que ces bactéries lactiques ont agit par un mécanisme autre que la production de bactériocines.

Yateem et *al.*, **(2008)** ont isolé des souches lactiques à partir du lait de chamelle au Kuwait dont l'effet antagoniste s'était exercé uniquement sur les bactéries à Gram négatif (*Salmonella* sp et *E. coli*), mais aucun effet n'a été détecté sur *Staphylococcus aureus* . Au contraire, **Ammor et *al*. (2006)** ont isolé des souches lactiques dont l'effet antagoniste était restreint aux bactéries à Gram positif, celles à Gram négatif étant résistantes.

Dans notre étude la souche *En.amnigenus* C_1 la plus sensible aux 26 souches lactiques par des zones d'inhibition d'environ 20 mm**,** d'apres **Boudjani (2009)**, les diamètres des zones d'inhibition de bactéries lactiques peuvent atteindre environ 20 mm.

Les vingt-neuf (29) souches étudiées n'ont pas d'activité inhibitrice contre la souche endogène *Eshirichia coli* (C_7), aucune zone d'inhibition n'a été observée autour des spots.

Ammor et *al*., **(2006)** ont signalé également la résistance des *Pseudomonas* sp à toutes les souches lactiques testées.

L'activité antibactérienne constatée entre les souches lactiques par la méthode de contact direct peut être due à la compétition cellulaire ou la synthèse de certains métabolites **(Yaakoubi et *al*., 2009)**. La différence de l'activité inhibitrice entre les souches d'une même espèce est due à une faible homologie de leurs acides nucléiques responsables des caractères héréditaires (**Huang et *al*., 2010**).

Dix-sept (17) souches les plus inhibitrices *Lactobacillus* BL1, *Enterococcus* BL6, *Leuconostoc* BL7, *Leuconostoc* BL9, *Leuconostoc* BL10, *Lactobacillus* BL11, *Leuconostoc* BL13, *Leuconostoc* BL14, *Lactobacillus* BL17, *Pediococcus* BL20, *Pediococcus* BL21, *Pediococcus* BL22, *Lactococcus* BL23, *Lactobacillus* BL24, *Pediococcus* BL25, *Lactobacillus* BL27 et *Lactobacillus* BL29 ont été retenues pour la caractérisation partielle de métabolites inhibiteurs en l'occurrence la recherche de la production des bactériocines.

La souche BL6 pre-identifiée comme *Enterococcus* sp considérée comme la souche la plus compétitive avec un moyen d'inhibition 16.71mm. Selon **Ababsa, (2012)** l'étude statistique, il s'est avéré que l'effet inhibiteur contre les souches pathogènes diffère très significativement (*P<0.0001*) d'une souche lactique à l'autre à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa* qui a réagi de la même manière vis-à-vis de toutes les bactéries lactiques testées.

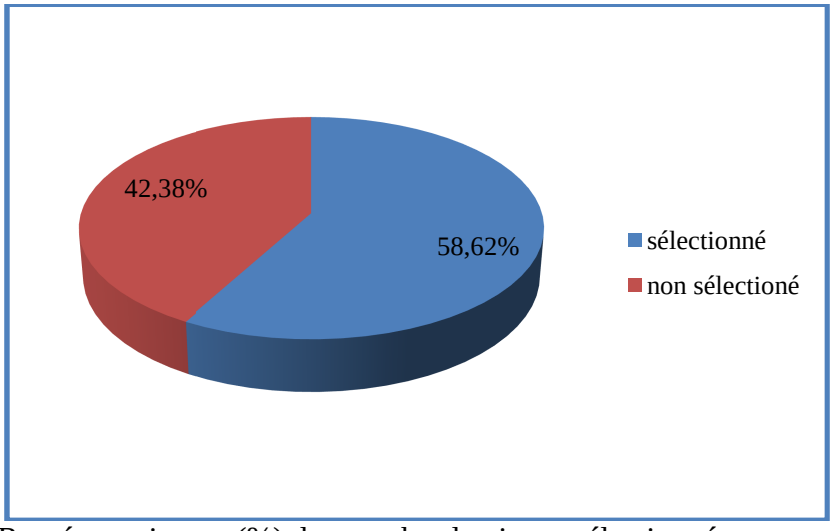


Figure 14. Représentation en (%) des souches lactiques sélectionnées par contact direct.

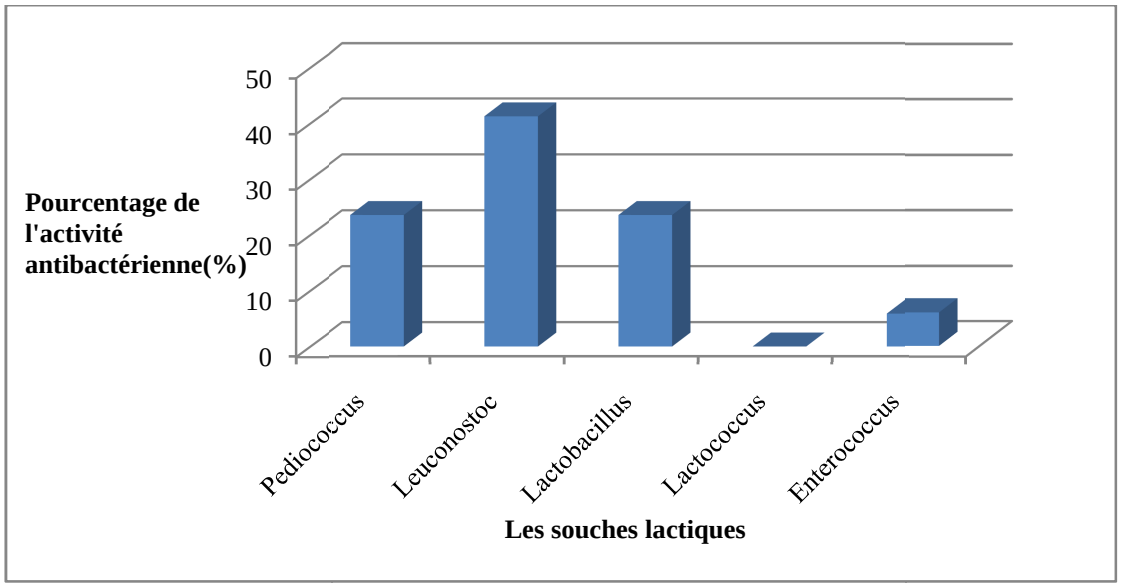


Figure 15. La répartition en (%) de l'activité antibactérienne des souches sélectionnées au sein de chaque genre lactique.

Nous pouvons noter que plus que la moitié (58.62%) des isolats lactiques sont retenu par le premier screening (Figure 14), ainsi nous avons constaté que le genre *Leuconostoc* le plus compétitif (41.17%) vient ensuite les deux genres *Lactobacillus et Pediococcus* qui occupent un pourcentage de (23.52 %), enfin le genre *Enterococcus* (5.88 %), d'un autre coté aucune souche de genre *Lactococcus* n'a été retenu (0%) (Figure 15).

La capacité inhibitrice *in vitro* des bactéries lactiques vis-à-vis des germes pathogènes semble être une bonne propriété probiotique, comme elle peut jouer un rôle dans la préservation de la qualité hygiénique des denrées alimentaires **(Ammor et *al.*, 2006)**.

III.3.2. Contacte indirecte (test de puits)

L'activité antibactérienne des surnageants natifs de dix-sept (17) souches lactiques sélectionnées a partir de premier screening de contacte directe, pour la caractérisation partielle des métabolites inhibiteurs potentiellement secrétées dans le surnageant, nous avons utilisé de la méthode de contacte indirecte ou la méthode de la diffusion décrite par **Barefoot** et *al.* **(1983)** vis-à-vis les six (6) souches indicatrices sensibles par contacte directe à savoir *En.amnigenus* C1, *Streptococcus* sp C2, *S.aureus* C3, *Pseudomonas luteola* C4, *Pseudomonas sp* C5 et *En. aerogenes* C6.

D'après les résultats obtenus (Tableau 14), nous constatons que l'activité antibactérienne des surnageants natifs des cultures pures était semblable envers toute la collection des souches cibles. Aucun surnageant n'arrivé à inhiber les souches endogènes indicatrices, nos résultats était en accord avec les travaux de **Boubakri, (2015)** qui à montré qu'aucun surnageant natif n'arrivé à inhiber la souche *E.coli* ATCC25922.

Selon **Riley et Chavan, (2007)**, la production de bactériocines est un système de défense dont les bactéries lactiques utilisent contre les autres bactéries avec les quelles elles entrent en

compétition pour l'habitat et les nutriments dans la nature. Sous les conditions du laboratoire où la bactérie se trouve en monoculture, en absence de concurrence et en excès de nutriment, la production de bactériocines s'avère alors sans sens et inutile pour la bactérie lactique.

Il apparait également d'après les résultats obtenus, que certains isolats lactiques ayant donnés une activité inhibitrice par la méthode de contacte directe, leurs surnageants ne présentent aucune activité contre les souches indicatrices, ces résultats se concorde avec les résultats de **Boubakri, (2015)** en citant a titre d'exemple que certains souches comme *Pediococcus* S4E4 et S6E4 contre *E.coli*, et *Enterococcus* S9E2 contre *Ps. Frederiksbergenisis*. Dans les méthodes de contact direct, l'effet de l'inhibition par compétition cellulaire est très remarqué (**Yaakoubi et *al*., 2009**).

Tableau 13. Résultats de l'activité antibactérienne des surnageants natifs (mm).

Les souches lactiques	Les souches indicatrices					
	En.amnigenus ($C_{1)}$	*Streptocccus* sp ($C_{2)}$	*S.aureus* ($C_{3)}$	*Ps. luteola* ($C_{4)}$	*Pseudomonas* sp ($C_{5)}$	*En. aerogenes* ($C_{6)}$
BL1	0	0	0	0	0	0
BL6	0	0	0	0	0	0
BL7	0	0	0	0	0	0
BL9	0	0	0	0	0	0
BL10	0	0	0	0	0	0
BL11	0	0	0	0	0	0
BL13	0	0	0	0	0	0
BL14	0	0	0	0	0	0
BL17	0	0	0	0	0	0
BL20	0	0	0	0	0	0
BL21	0	0	0	0	0	0
BL22	0	0	0	0	0	0
BL23	0	0	0	0	0	0
BL24	0	0	0	0	0	0
BL25	0	0	0	0	0	0
BL27	0	0	0	0	0	0
BL29	0	0	0	0	0	0

III.4. Résultats de l'activité antifongique des souches lactiques

III.4.1. L'activité antifongique par contacte directe: méthode de double couche

La recherche de l'activité antifongique a l'égard des souches endogènes *Rhizopus* sp, *Penicillium* sp, Levure C_3J_7 et *Sc. cerevicea* à été recherché par la méthode de double couche.

Les résultats obtenus montrent que des isolats lactiques présentaient un spectre d'activité antifongique différentes vis-à-vis les souches cibles, Il faut signaler ici que l'activité inhibitrice des 29 souches lactique contre la levure endogène C_3J_7 été observée a 100%, d'autres part, la sensibilité de la moisissure *Penicillium* sp C_7J_0 était avec un pourcentage

48.27%, et pour la souche *Rhizopus* sp C_5J_0 était avec un pourcentage de 41.37%, et enfin la nous avons constaté que la souche *Sc. cerevicea* n'a montrée aucune sensibilité vis-à-vis les 29 souches lactiques utilisées. Ces résultats est en concorde avec les travaux de **Sahnouni et *al*. (2012)** d'après les auteurs une collection de bactéries lactique isolées a partir de la flore intestinale des poissons marin de l'Algérie, aucune souche n'a montré une activité contre la souche *Saccharomyces* sp

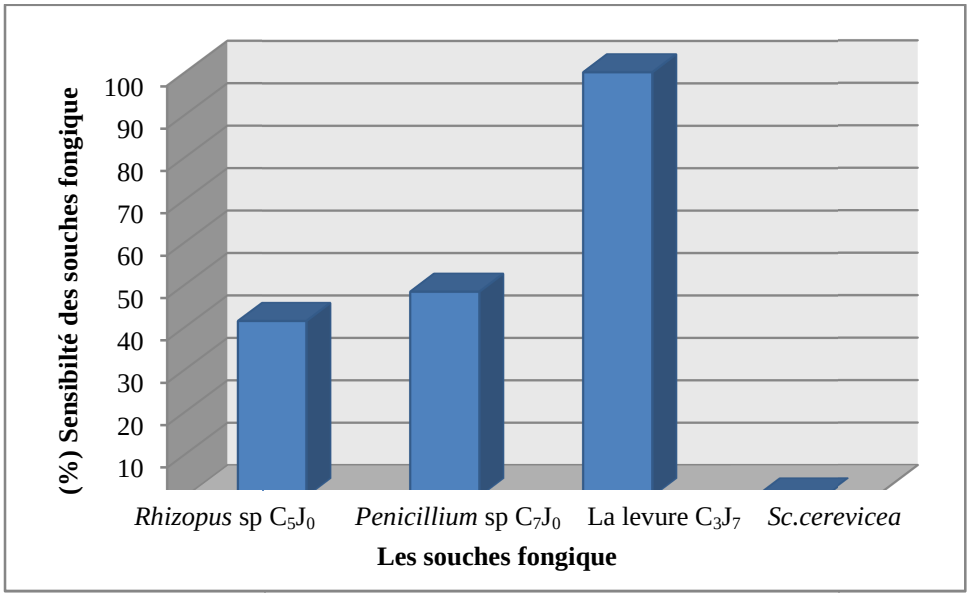


Figure16. Pourcentage (%) des souches fongique sensible a l'activité antifongique des souches lactique par contacte directe.

A partir de ce screening, nous avons sélectionnés (13) souches codées BL1, BL6, BL7, BL11, BL13, BL15, BL16, BL17, BL19, BL23, BL24, BL25 et BL28, elles sont retenues de leur pouvoir antifongique important (photo 11).

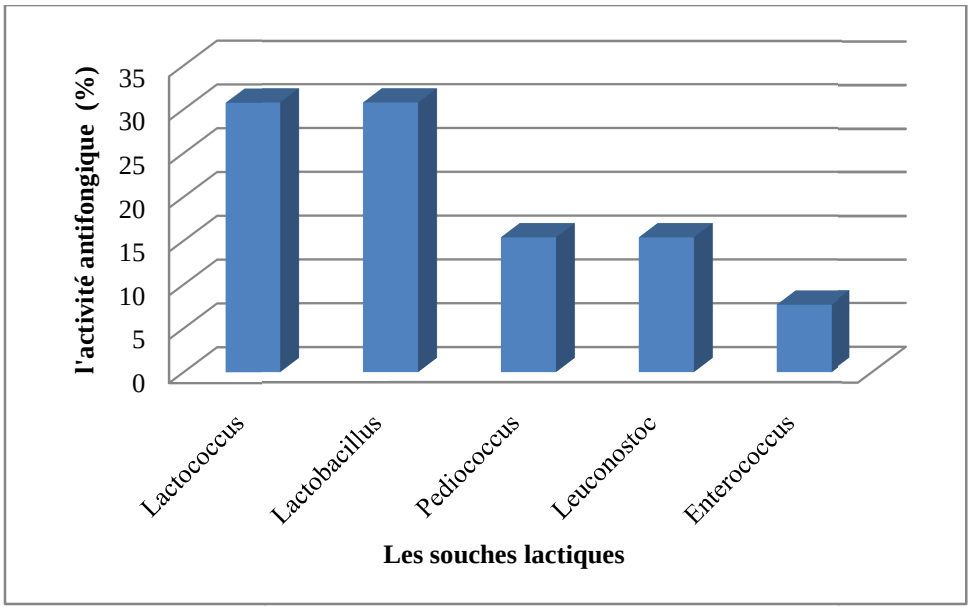


Figure 17. Répartition en (%) de l'activité antifongique au sein de chaque genre lactique.

D'après la Figure 15, nous pouvons noter les genres pré-identifies *Lactococcus* et *Lactobacillus* sont les genres les plus actifs avec un pourcentage de 30.76%, alors que les souches attachées aux genres *Leuconostoc* et *Pediococcus* occupent le même pourcentage de 15.38 %, enfin la plus faible activité antifongique est remarque chez les souches pré-identifiées comme *Enterococcus* sp avec un pourcentage de 7.69 %.

Tableau 14. Résultats de l'activité antifongique par méthode de double couche.

SF / SL	*Rhizopus* sp (C_5J_0)	*Penicillium* sp **(**C_7J_0**)**	Levure C_3J_7	*Sc. cerevicea*
BL1	-	++	+++	-
BL2	-	-	++	-
BL3	-	-	++	-
BL4	-	+	+++	-
BL5	+	-	+++	-
BL6	+	++	+++	-
BL7	-	++	+++	-
BL8	-	-	+++	-
BL9	-	-	+++	-
BL10	+	-	+++	-
BL11	+	++	+++	-
BL12	-	-	+++	-
BL13	++	+	++	-
BL14	-	-	+++	-
BL15	+	+	+++	-
BL16	+	+	+++	-
BL17	+	+	+++	-
BL18	-	-	+++	-
BL19	+	++	+++	-
BL20	-	+	+++	-
BL21	-	-	+++	-
BL22	-	+	+++	-
BL23	+++	-	+++	-
BL24	++	-	+++	-
BL25	++	++	+++	-
BL26	-	-	+++	-
BL27	-	+	+++	-
BL28	+	++	+++	-
BL29	+	-	+++	-

SL : souches lactiques, SF : souches fongiques,
(-) absence d'une zone d'inhibition ; (+) zone d'inhibition comprise 0,5 à 1cm de la boite de Pétri ; (++) zone d'inhibition supérieur 1cm de la boite de Pétri ; (+++) zone d'inhibition comprise 4 cm.

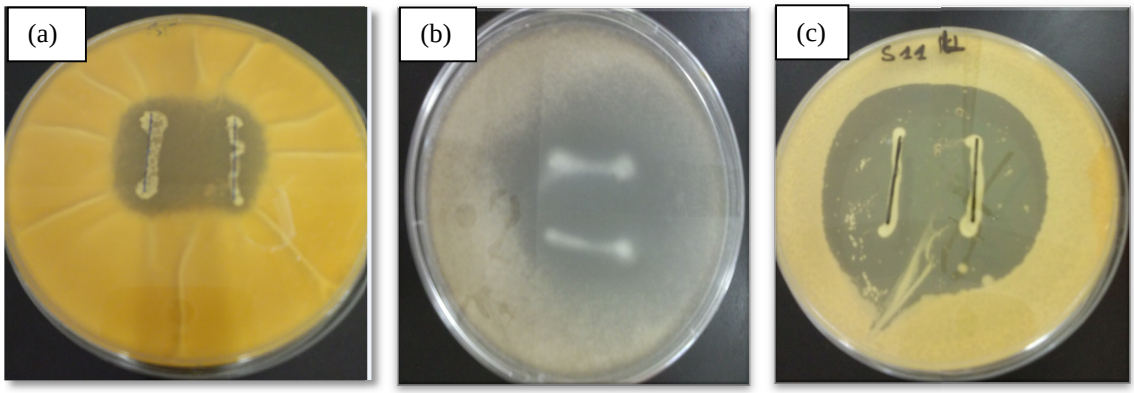


Photo 8. L'activité antifongique des souches lactiques par contacte directe ;
[(a)] : BL_{11} contre *pénicillium* sp ; [(b)]: BL_{23}*Rhizopus*sp; [(c)] : BL_{11} contre la levure endogène C_3J_7.

Le contrôle de la contamination fongique dans l'alimentation humaine et animale est devenu une priorité en industrie agroalimentaire, car cette dernière cause des pertes économiques non seulement à cause de sa prolifération rapide dans les aliments, mais aussi à cause de la toxicité de certaines souches fongiques (**Ho et *al*., 2009** ; **Crowley et *al*., 2012**).

Certaines espèces de *Penicillium, Fusarium et Aspergillus* sont reconnus comme des organismes d'altération des produits alimentaires ou ils pourraient produire un certain nombre de mycotoxines **(Samson et *al*., 2000)**. A cet effet, plusieurs techniques sont utilisées pour la conservation des produits alimentaires **(Farkas, 2001)**. L'inhibition de la croissance de champignons, et l'accumulation des mycotoxines par les bactéries lactique et/ou leurs métabolites semble être une stratégie de lutte biologique prometteuse dans les aliments sensible à la contamination par les champignons toxinogènes **(Dalie** et **Deschamps, 2010)**.

À travers nos résultats, il apparait que 9 souches lactiques parmi les 29 souches mises au test arrivent à inhiber *Rhizopus* sp C_5J_0, *Penicillium* sp C_7J_0 et la levure endogène C_3J_7 dont les souches (BL13, BL16 et BL17) et (BL19, BL25 et BL28) pré-identifiées respectivement comme *Leuconostoc* et *Pediococcus* représente les genres les plus actifs. Deux isolats attachés au genre *Lactobacillus* codés BL11 et BL15 ont montré une large zone d'inhibition contre la souche levurienne non identifiée C_3J_7, *Penicillium* sp C_7J_0 et *Rhizopus* sp C_5J_0 et enfin une souche considérée comme *Enterococcus* BL6 possède une activité moins importante.

Selon les résultats de **Boubakri, (2015)** il apparait que sept (7) isolats sur les 18 mises au test arrivent à inhiber *Aspergillus flavus* dont les *Lactobacillus* représentent le genre le plus actif. Deux isolats du genre *Lactobacillus* ont montré une large zone d'inhibition contre *Aspergillus Flavus.*

D'après **Sahnouni et *al*. (2012),** l'activité antifongique des bactéries lactiques isolées des poissons contre *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus niger* a été décelé généralement chez des souches du genre *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* et *Leuconostoc*. Ce qui concorde partiellement avec nos résultats.

L'activité antifongique de souches du genre *Lactobacillus* a été élucidée par quelques études. **Ho et *al*. (2009)**, ont trouvé que certaines souches de *Lactobacillus* isolées des produits végétaux fermentés avaient une forte activité telles *Lb.plantarum* (HA3 et HA9) et *Lb.fermentum* (HA7), et d'autres ont une faible activité telles *Lb.acidophilus* (HA4 et HA12) et *Lb.brevis* (HA11).

III.4.2.Détection de la nature de l'agent inhibiteur des souches actives

La présence de zones d'inhibition auteur de souches sélectionnées par contacte directe codées BL1, BL6, BL7, BL11, BL13, BL15, BL16, BL17, BL19, BL23, BL24, BL25 et BL28, peut avoir plusieurs origines. Nous pouvons mentionner la compétition cellulaire, la production des acides organiques, de peroxyde d'hydrogène, d'autres métabolites (**Yaakoubi et *al*., 2009**). Les surnageants des souches actives sont étudiés pour mettre en évidence la nature des agents antifongiques.

Parmi les treize (13) souches retenues de leur activité par contacte directe, onze (11) souches ont gardé leur activité avec les surnageants natifs, tandis que la souche codée BL15 a perdu leur activité contre les trois (3) souches fongiques indicatrices, alors que la souche codée BL13 leur surnageants natif inhibe seulement les deux moisissures endogènes *Rhizopus* sp C_5J_0 et *Penicillium* sp C_7J_0.

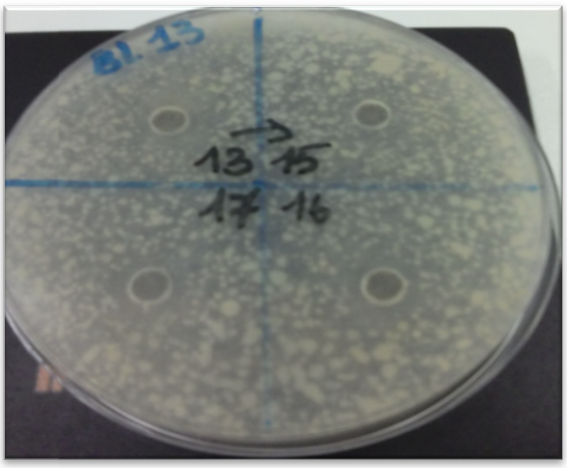


Photo 9. Résultats de l'activité Anti-levure (C_3J_7) des surnageants natifs des souches *Leuconostoc* BL13, *Leuconostoc* BL15, *Lactococcus* BL16, *Lactobacillus* BL17.

Tableau 15. Résultats de l'activité antifongique des surnageants natifs (mm)

BL / SF	BL1	BL6	BL7	BL11	BL13	BL15	BL16	BL17	BL19	BL23	BL24	BL25	BL28
La levure C_3J_7	12	14	10	13	0	0	10	10	10	11	12	13	12
Rhizopus sp (C_5J_0)	12	10	9	15	10	0	10	11	12	15	14	15	13
Pénicillium sp(C_7J_0)	9	10	8	9	9	0	10	8	8	6	12	11	12

L'étude a été réalisée sur les surnageants natifs des souches actives par contacte directe, en effet ce screening de l'activité des surnageants natifs a montré que leurs surnageants des cultures pures n'ont pas le même spectre d'inhibition, en effet, ce phénomène proviendrait du fait que des concentrations plus importantes sont retrouvées localement, autour des colonies bactériennes **(Sjögrenet** *al.*, **2003)**, de même, dans les méthodes de contacte directe la compétition cellulaire est très remarqué.

Dans ce screening on a pris en compte uniquement les 6 souches (BL 1, BL6, BL11, BL24, BL25 et BL28), qui ont des surnageants natifs potentiellement actifs contre les souches fongiques indicatrices *Rhizopus* sp (C_5J_0), *Penicillium* sp (C_7J_0) et la levure C_3J_7 pour la caractérisation partielle de leurs métabolites antifongiques.

III.4.3. Caractérisation partielle des métabolites antifongiques

Après élimination de l'effet des acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, traitement avec les enzymes de digestions, et par différentes températures les surnageants traités ont été testés pour leur activité inhibitrice contre les trois (3) souches fongiques sensibles aux surnageants natifs. Les résultats sont résumés dans les Tableaux 17, 18 et 19.

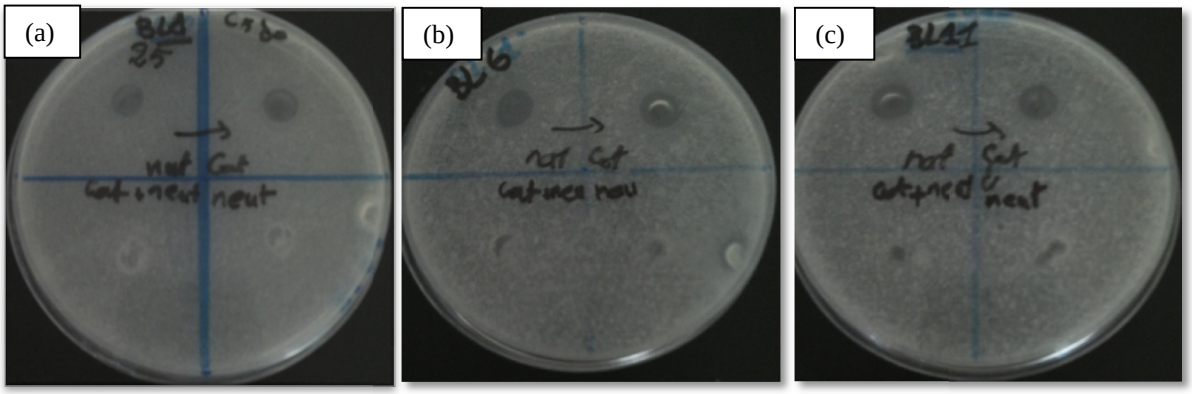


Photo 10. Résultats de l'activité antifongique des surnageants natifs et traités
[(a)]: *Pediococcus* BL25 contre *Rhizopus*sp; [(b)]: *Enterococcus* BL6 contre *Pénicillium* sp; [(c)]: *Lactobacillus* BL11contre la levure C_3J_7.

Tableau 16. Détermination de la nature de l'agent inhibiteur et activité inhibitrice (mm).

Souches lactiques	Souches fongiques	surnageant				Inhibiteur majeur
		nat	cat	neut	Cat+neut	
BL1	la levure C_3J_7	15	14	0	0	Acides organiques
	Rhizopus sp (C_5J_0)	9	11	0	0	Acides organiques
	Pénicillium sp (C_7J_0)	10	15	0	0	Acides organiques
BL6	la levure C_3J_7	12	12	0	0	Acides organiques
	Rhizopus sp (C_5J_0)	10	12	0	0	Acides organiques
	Pénicillium sp (C_7J_0)	10	10	0	0	Acides organiques
BL11	la levure C_3J_7	10	9	0	0	Acides organiques
	Rhizopus sp (C_5J_0)	12	10	0	0	Acides organiques
	Pénicillium sp (C_7J_0)	9	10	0	0	Acides organiques
BL24	la levure C_3J_7	12	9	0	0	Acides organiques
	Rhizopus sp (C_5J_0)	9	7	0	0	Acides organiques
	Pénicillium sp (C_7J_0)	10	7	0	0	Acides organiques
BL25	la levure C_3J_7	13	12	0	0	Acides organiques
	Rhizopus sp (C_5J_0)	8	10	0	0	Acides organiques
	Pénicillium sp (C_7J_0)	11	10	0	0	Acides organiques
BL28	la levure C_3J_7	10	10	0	0	Acides organiques
	Rhizopus sp (C_5J_0)	12	10	0	0	Acides organiques
	Pénicillium sp (C_7J_0)	10	8	0	0	Acides organiques

nat : surnageant natif, cat : surnagent catalisé, neut : surnagent neutralisé,
cat+neut : surnagentneutralisé à pH 6.5 et catalisé.

Ces résultats (Tableau 17) montrent une stabilité de l'activité des six (6) surnageants traités seulement par la catalase, et la perte de l'activité inhibitrice avec ceux neutralisés à pH 6,5 et neutralisés et catalisés. Le pH surnageants des cultures pures après 48h d'incubation était acide avec des valeurs qui oscillent entre 3,32 et 3,60. Tout cela nous laisse supposer que l'inhibiteur majeur des surnageants natifs est l'acide lactique et autres acides organiques. Ces résultats sont en accord avec les résultats de **Boubakri, (2015)** qui montrent une diminution de l'activité des surnageants traités seulement par la catalase, et la perte totale de l'activité inhibitrice avec ceux seulement neutralisés à pH 6,5, ainsi le pH des surnageants des souches après 48 h d'incubation était entre 3,61 et 3,69.

Le rôle des acides organiques comme composés antifongiques est devenu plus visible avec l'acide phénylique, les hydroxylates et les acides gras identifiés comme composés antifongiques produits par certaines souches de bactéries lactiques (**Prema** et *al*.**, 2010**). Par ailleurs, une gamme d'acides organiques tels les acides acétique, formique, caproïque,

propionique, butyrique et valérique libérés par *Lb.sanfranciscensis* CB1, possèdent le même effet contre *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* et *Monilia*. Ces acides agissent d'une manière synergique (**Lavermicocca** et *al*., **2003** ; **Gobbetti** et *al*., **2005**).

Tableau 17. Activité inhibitrice des surnageants natifs traités par les enzymes digestifs (mm).

Souches lactiques	Souches indicatrices	surnageant				
		nat	prés	α-amy	tryp	pro.K
BL1	la levure C_3J_7	8	8	8	8	9
	Rhizopus sp (C_5J_0)	10	10	10	09	10
	Pénicillium sp (C_7J_0)	9	9	8	10	9
BL6	la levure C_3J_7	12	10	10	12	11
	Rhizopus sp (C_5J_0)	10	10	10	10	11
	Pénicillium sp (C_7J_0)	10	11	10	12	13
BL11	la levure C_3J_7	10	10	9	9	10
	Rhizopus sp (C_5J_0)	10	9	8	9	10
	Pénicillium sp (C_7J_0)	9	9	8	9	10
BL24	la levure C_3J_7	8	8	8	9	10
	Rhizopus sp (C_5J_0)	9	9	9	9	7
	Pénicillium sp (C_7J_0)	9	8	8	8	9
BL25	la levure C_3J_7	10	9	10	10	8
	Rhizopus sp (C_5J_0)	8	8	8	9	11
	Pénicillium sp (C_7J_0)	9	8	8	9	8
BL28	la levure C_3J_7	10	8	9	8	8
	Rhizopus sp (C_5J_0)	8	8	9	10	10
	Pénicillium sp (C_7J_0)	8	8	8	08	10

nat: surnageant natif, prés: présure, α-amy: α-amylase, tryp: trypsine, pro.K : protéinase K.

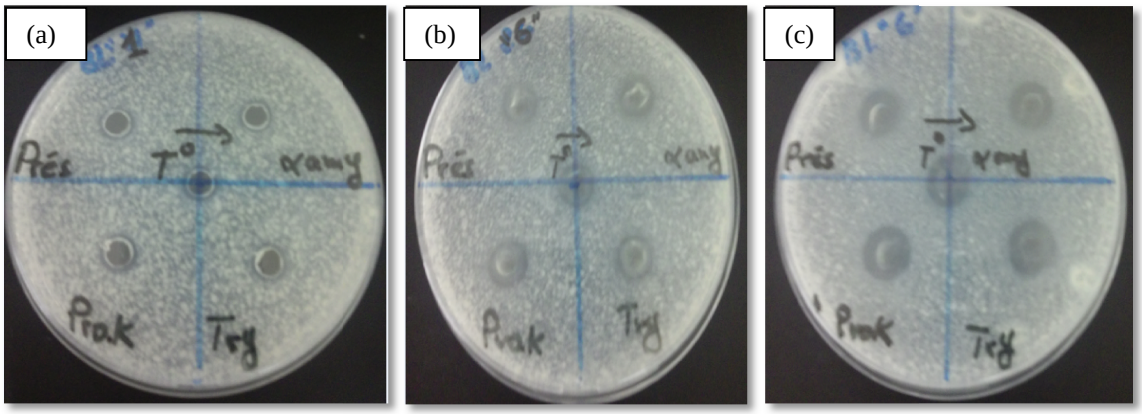


Photo 11. L'activité antifongique des surnageants traité par les enzymes (protéinase K, trypsine, présure et α-amylase).

(a) : BL1 contre la levure C3J7; (b): BL6 contre *Rhizopus* sp C5J0; (c) : BL6 contre *Pénicillium* sp C7J0.

Tableau 18. Activité antifongique des surnageants traités avec les différentes températures (mm)

Souches lactiques	Souche fongique	surnageant				
		nat	45C°	70C°	100C°	120C°
BL1	*Rhizopus* sp (C_5J_0)	9	0	0	0	0
	la levure C_3J_7	9	10	9	9	8
	Pénicillium sp (C_7J_0)	9	8	8	8	8
BL 6	*Rhizopus* sp (C_5J_0)	8	0	0	0	0
	la levure C_3J_7	9	9	9	9	10
	Pénicillium sp (C_7J_0)	11	11	10	10	10
BL 11	*Rhizopus* sp (C_5J_0)	9	0	0	0	0
	la levure C_3J_7	9	9	8	8	8
	Penicilium sp	9	8	8	8	0
BL 24	*Rhizopus* sp (C_5J_0)	8	0	0	0	0
	la levure C_3J_7	8	8	8	8	8
	Pénicillium sp (C_7J_0)	9	8	8	8	8
BL25	*Rhizopus* sp (C_5J_0)	9	0	0	0	0
	la levure C_3J_7	9	10	9	9	8
	Pénicillium sp (C_7J_0)	10	9	9	8	8
BL 28	*Rhizopus* sp (C_5J_0)	8	0	0	0	0
	la levure C_3J_7	9	9	9	0	0
	Pénicillium sp (C_7J_0)	10	8	8	9	10

BL: bactérie lactique, nat: surnageant natif

Selon les résultats résumés dans le Tableau 18, Le traitement des substances antifongiques par les enzymes digestifs comme : la présure, la trypsine, la protéinase K et l'α-amylasene change pas l'activité inhibitrice, ce qui suggère que l'activité antifongique pourrait être due à des composés autres que les protéines et les glucides, ou bien les métabolites antifongique ne sont pas sensibles aux enzymes utilisées. **Niku-Paavola et** *al.*,**(1999)** ont montré que les enzymes protéolytiques n'ont pas affecté l'activité antifongique de *Lb. plantarum.* **Gerez et** *al.*, **(2009)** ont également signalé que la protéinase K n'a pas affecté l'activité inhibitrice du surnageant de plusieurs lactobacilles.

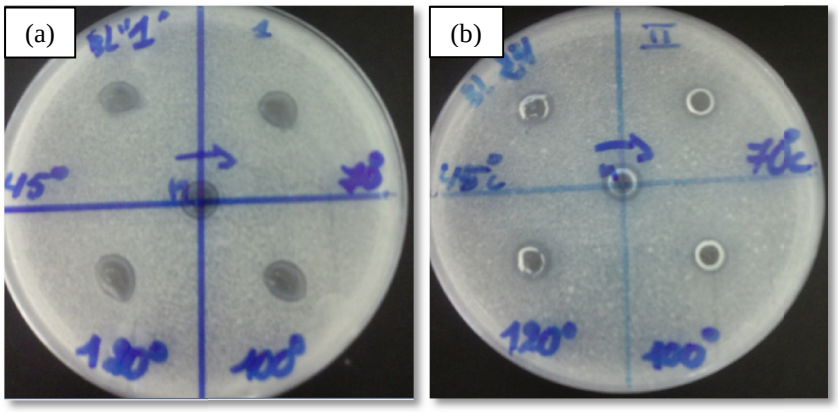


Photo 12. Effet de traitement thermique sur les surnageants natifs
[(a)] : *Lactobacillus* BL1 contre la levure C3J7; [(b)]: *Lactobacillus* BL24 contre *Rhizopus* sp.

Aucune perte d'activité antifongique n'à été observé après traitement thermique des surnageants natifs avec les différentes températures 45, 70, 100 et 120°C pendant 20 min. Les surnagents natifs des cultures pures des souches sélectionnées et pré-identifiées comme *Lactobacillus* (BL11 et BL24), *Enterococcus* (BL6), *Pediococcus* (BL25 BL28) et *Leuconostoc* (BL13) leurs surnageants n'étaient pas sensible a la chaleur et gardent une activité contre les deux (2) souches endogènes en l'occurrence de *Pénicillium* sp (C_7J_0) et la levure C_3J_7. En revanche, les mêmes surnagents ont perdus leur activité anti-*Rhizopus* sp (C_5J_0) même avec les températures basse de 45°C pendant 20 min (Tableau 19).

Des résultats similaires ont été rapportés quand le surnageant de *Lb.plantarum* est chauffé à 120°C pendant 15 min et à 80°C pendant 1h ou à 120°C pendant 15 min (**Rouse et *al*., 2008)** Cependant, **Gourama (1997)** a montré que l'activité inhibitrice a été perdu lors du traitement du surnageant de *Lb. casei* à 100°C pendant une durée de 10 min.

La totalité des souches lactiques sélectionnée présent une activité antifongique contre le *penicillium* sp à différents température (45C°, 70C°,100C° et 120C° pendant 20 min.

Gerez et *al*. (2009) ont prouvé que l'activité antifongique de quatre souches *Lb.plantarum* CRL 778, *Lb.reuteri* CRL 1100, et *Lb.brevis* CRL 772 et CRL 796 contre *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium* est liée en majeure partie à des composées inhibiteurs, l'acide acétique et l'acide phénylique. Les résultats de l'étude menée sur l'activité antifongique de 87 souches de *Lb.plantarum*, 4 souches *Pediococcus pentosaceous* et 3 souches *Weissella confusa* contre *Penicillium expansum, P.digitatum, P.notatum, P.roqueforti, Rhizopus stolonifer, Fusarium culmorum, Aspergillus Fumigatus* et *Rhodotorula mucilaginosa* par **Crowley et *al*. (2012)** ont montré que deux souches de *Lb.plantarum* inhibent partiellement les souches fongiques et que cela est lié à la production des acides organiques dont l'identification de ces derniers par HPLC a révélé la présence de l'acide acétique, lactique et phénylique en taux insuffisant pour contribuer à une activité antifongique efficace.

Le rôle des acides organiques comme composés antifongiques est devenu plus visible avec l'acide phénylique, les hydroxylates et les acides gras identifiés comme composés antifongiques produits par certaines souches de bactéries lactiques (**Prema et *al*., 2010**). Par

ailleurs, une gamme d'acides organiques tels les acides acétique, formique, caproïque, propionique, butyrique et valérique libérés par *Lb.sanfranciscensis* CB1, possèdent le même effet contre *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* et *Monilia*. Ces acides agissent d'une manière synergique (**Lavermicocca et *al*., 2003** ; **Gobbetti et *al*., 2005**).

Le nombre d'études publiées sur l'effet antifongique des bactéries lactiques est encore faible et la majorité des travaux décrit uniquement l'action inhibitrice de ces bactéries. À notre connaissance, très peu d'études ont été menées sur la caractérisation des composés ou du mécanisme d'action sauf ceux publiés par **Gerez et *al*. (2009)**, **Prema et *al*. (2010)**, **Hongjuan et *al*. (2012)** et **Crowley et *al*. (2012**), dont il apparait clairement dans la majorité de ces publications que les souches lactiques étudiées sont du genre *Lactobacillus*.

Conclusion et perspectives

Conclusion et prescriptives

Les bactéries lactiques sont largement utilisées dans les industries agro-alimentaires dans le but d'exploiter leur activité aromatisant et acidifiant, on les emploie surtout dans la fabrication des fromages et de yaourts. Une autre activité a été envisagé ces dernières années sur ces germes lactiques est celle de leur capacité à secréter des substances antimicrobiennes, ce qui a intéressé les chercheurs et les investisseurs afin d'augmenter la duré de conservation des produits alimentaires par l'utilisation de ces substances bioconservatrices de type bactériocine et/ou d'autres métabolites.

L'objectif de notre étude, est la mise en évidence de l'activité antimicrobiennes d'une collection des souches lactiques (29 souches) isolées dans les différents stades de maturation de kaddid vis-à-vis quelques souches indicatrices endogènes, des bactéries (Gram+ et Gram-), des levures et des moisissures.

La première étape de cette étude consiste de faire des screening des souches lactiques inhibitrices par les méthodes de contacte directe. Les souches lactiques actives avec le premier screening sont retenues pour la caractérisation partielle des métabolites inhibiteurs majeurs.

Le screening de l'activité antimicrobienne par contacte directe a montré que parmi les 29 souches lactiques, 26 souches possèdent une activité antibactérienne vis-à-vis : *Enterobacter amnigenus* C_1, *Streptococcus* sp C_2, *Staphylococcus aureus* C_3, *Pseudomonas luteola* C_4, *Pseudomonas* sp C_5 et *En.aerogenes* C_6. La souche *E.coli* C_7 n'a montrée aucune sensibilité vis-à-vis les toutes les BL utilisées.

Les résultats d'étude de l'activité antifongique par contacte directe des 29 souches lactiques a montre une forte activité antifongique vis-à-vis la levure endogène C_3J_7, *pénicillium* sp et *Rhizopus* sp et aucune souches actifs contre *saccharomyces cerivecea*.

Dans l'étude de l'activité antibactérienne par contacte indirecte contre les souches bactériennes sensible par contacte directe à savoir: *Enterobacter amnigenus* C_1, *Streptococcus* sp C_2, *Staphylococcus aureus* C_3, *Pseudomonas luteola* C_4, *Pseudomonas* sp C_5, *En.aerogenes* C_6 et *Eshirichia coli* C_7, a montré que ces souches mises en test ne sont pas sensible a l'activité des surnageants natifs.

Parmi les treize (13) souches retenues de leur activité antifongique par contacte directe, onze (11) souches ont gardé leur activité antifongique des surnageants natifs, alors que le surnagent natif de la souche *Leuconostoc* BL15 n'a pas montré une activité antifongiques, d'autres part, la souche *Leuconostoc* BL13 leur surnageants natif inhibe seulement les deux moisissures *Rhizopus* sp C_5J_0 et *Penicillium* sp C_7J_0.

Les résultats de la caractérisation des métabolites antifongiques de six (6) souches lactiques les plus performantes montrent une stabilité de l'activité des surnageants traités seulement par la catalase, et la perte de l'activité avec ceux neutralisés et les surnageants neutralisé et catalisé. Le traitement par les enzymes protéolytiques (protéinase K, trypsine, présure) et l' α-amylase ne change pas significativement l'activité inhibitrice. Enfin la détermination de

stabilité des surnageants à différentes températures 45, 70, 100 et 120°C pendant 20 min montre qu'aucune perte d'activité antifongique n'à été observé.

Les résultats de notre recherche permettent d'ouvrir de nouvelles perspectives. Pour compléter ce travail, nous proposons :

- D'utiliser des techniques moléculaires pour l'identification de des bactéries lactiques étudiées ;
- D'utiliser d'autres souches indicatrices sensibles aux bactériocines des BL notamment du genre *Listeria* sp.
- Caractérisation et purification des inhibiteurs antifongiques majeurs des souches performantes, et l'étude des conditions de synthèse de ces métabolites.

Références bibliographiques

A

Aasen I.M., Moretro T., Katla T., Axelsson L., Storro I. (2000). Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *L. sakei* CCUG 42687. Appl. Microbiol. Biotechnol., 53: 159-166.

Ababsa A. (2012). Recherche de bactériocines produites par les bactéries lactiques du lait.

Achemchem F. et Abrini J. (2004). Production de bactériocines par des bactéries lactiques à partir du jben de chèvre du nord du Maroc. Journal of Applied Microbiology, 70, 660-669

A. Cherif, W. Rezgui, N. Raddadi, D. Daffonchio, and A. Boudabous, "Characterization and partial purification of entomocin 110, a newly identified bacteriocin from *Bacillus Thuringiensis* subsp. *Entomocidus* HD110," *Microbiological Research*, vol. 163, no. 6, pp. 684–692, 2008.

Albano H., Todorov S.D., Van Reenen C.A., Hogg T., Dicks L.M.T., Teixeira P. (2007). Characterization of two bacteriocins produced by *Pediococcus acidilactici* isolated from "Alheira", a fermented sausage traditionally produced in Portugal. Elsevier. International Journal of Food Microbiology. 116: 239-247.

Alomar J., (2007). Etude de propriétés physiologiques de *Lactococcus lactis* et *Lactococcus gracieae* pour la maitrise de *staphylococcus aureus* en technologie fromagère. Thèse de doctorat INPL. Laboratoire de Sciences et Génie Alimentaires. Nancy, pp, 3-5.

Ammor S., Rachman C., Chaillou S., Prévost H., Dousset X., Zagorec M., Dufour E and Chevallier I. (2005). Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages. *Food Microbiology*. **22:** 373382.

Ammor S., Tauveron G., Dufour E., Chevallier I. (2006). Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogens bacteria isolated from the same meat small-scale facility. Food Control 17: 454-468.

Ana Belen F., Lopez-Diaz M.C., Alvarez-Martin P. et Mayo B.(2006). Microbienne caractérisation de la traditionnelle espagnole à pate persillée fromage de cabrale ; identification des dominantes des bactéries lactiques. Eur. Res. Trchnol. Aliment. 223, 503-508.

Anastasiadou S., Papagianni M., Ambrosiadis I., Koidis P. (2008). Rapid quantifiable assessment of nutritional parameters influencing pediocin production by *Pediococcus acidilactici* NRRL B5627. Bioresource Technol., 99(14): 6646-6650.

Arous S., Dalet K., Héchard Y. (2004). Involvement of the mpo operon in resistance to class IIa bacteriocins in *L. monocytogenes*. FEMS Microbiol. Lett., 238: 37-41.

Aslam S. et Qazi J.I., (2010). Isolation of acidophilic lactic acid bacteria antagonistic to microbial contaminants. *Pakistan. J. Zool.* **42**(5) : 567-573.

Axelsson, L. (2004). Classification and physiology. In: Salsinen, S., Wright, A.V., Ouwehand, A. (Eds). Lactic acid bacteria: Microbiological and functiona l aspects (3ed Edition) Marcel Dekker, Inc. New York, USA. Vol. 633, 1 - 66.

B

Badis, A., Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M., Ouzrout, R. (2005). Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales «Arabia et Kabyle». *Sci. Technol.*, **23:** 30-37.

Barefoot S.F. et Klaenhammer T.R. (1983). Detection and activity of lactacin B, a bacteriocins production by *Lactobacillus acidophillus*. Appl. Environ. Microbiol. 45 :1808-1815.

Bauer R., Dicks L.M.T. (2005). Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. International Journal of Food Microbiology. 101: 201-216.

Bayrock d.P, Ingledew W.M. (2004), Inhibition of yeast by lactic acid bacteria in continouos culture : nutrient depletion and/or acid toxicity ? , Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 31, 362-368

BEERENS H. & LUQUET F.M. (1987). Guide pratique d'analyse microbiologique des laits et produits laitiers. Ed : *Lavoisier*, Paris, 144 : 107- 108.

Benkerroum N. (2002). Behavior of listeria monocytogenes and *Staphylococcus aureus* in yaourt fermented with a bacteriocin-producing thermophilic starter.J.food Prot.65 :799-805.

Bennani L., Faid M and Bouseta A., 2000. Experimental manufacturing of kaddid, a salted dried meat product: Control of the microorganisms. *European Food Research and Technology*. **211(3)**: 153-157.

Björkroth, J., Holzapfel, W. (2006) Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus*and *Weissella*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., and Stackebrandt, E. (Eds). *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological*

Borriello SP, Hammes WP, Holzapfel W, Marteau P, Schrezenmeir J, Vaara M, Boudjani, W. (2009). Action de la flore lactique sur les bactéries contamination. Mémoire d'ingéniorat, Institut de biologie, Université de Tlemcen. Pages 73.

Botton, B., Breton, A., Fèvre, M., Gauthier, S., Guy, P., Larpent, J.P., Reymond, P., Sanglier, J.J., Vayssier, Y., Veau, P., (1990). Moisissures utiles et nuisibles, Importance industrielle, *Ed. Masson*, Paris, 512p.

Botton, B., Breton, A., Fèvre, M., Gauthier, S., Guy, P., Larpent, J.P., Reymond, P., Broadbent J.R. (2001). Genetics of Lactic Acid Bacteria. In: Applied Dairy Microbiology (Marth E.H. et Steele J.L.). 2e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 243-300.

Boubakri K., 2015. Aptitude à la bioconservation de quelque produits alimentaires par des bactéries lactiques locales: étude sur une gamme de matrices alimentaires, mémoire Magister en biologie, Option : Microbiologie et sécurité sanitaire des aliments, Université de Béchar. 78-101-103

Brogden, KA. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers ormetabolic inhibitors in Bacteria? Nat Rev Microbiol 3: 238–250.

Brul S., Coote P. (1999). Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms. Int. J. Food Microbiol. 50(1-2): 1-17.

C

Caplice E. et Fitzgerald G.F. (1999). Food fermentation : role of microorganisms in food production and preservation. Int. J. food Microbiol. 50 : 131-149.

Casaburi A., Blaiotta G., Mauriello G., Pepe O and Villani F., 2005. Technological activities of *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus simulans* strains isolated from fermented sausages. *Meat Science*. **71**: 643-650.

Castellano, P., Belfiore, C., Fadda, S., et Vignolo, G. (2008). A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat Science,* 79 : 483–499.

Castro M.P., Palavecino N.Z., Herman C., Garro O.A and Campos C.A. (2011). Lactic Acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: Characterization of antibacterial Compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. *Meat Science*. **87**: 321-329.

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

Chen H., Hoover D.G. 2003. Bacteriocins and their Food Applications. Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety. 2: 82-100.

Chen Y.S., Srionnual S., Onda T., Yanagida F. (2007). Effects of prebiotic oligosaccharides and trehalose on growth and production of bacteriocins by lactic acid bacteria. Lett. Appl. Microbiol., 45: 190-193.

Cherif A., Rezgui W., Raddadi N., Daffonchio D., Boudabous A. (2008). Characterization and partial purification of entomocin 110, a newly identified bacteriocin from *Bacillus thuringiensis* subsp *entomocidus* HD110. Microbiological Research, 163(6): 684-692.

Cocolin L., Rantsiou K. (2007). Sequencing and expression analysis of sakacin genes in *Lactobacillus curvatus* strains. Applied Microbiology and Biotechnology. 76, 6, 1403-11.

Collins E .B , Hardt P . (1980). Inhibition of Condida albicans by Lactobacillus acidophilus , Journal of Dairy Science , 63 , 830-832 .

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

Comi G., Orlic S., Redzepovic S., Urso R and Iacumin L., 2004. Moulds isolated from Istrian dried ham at the pre-ripening and ripening level. *Int. J. Food Microbiol*. **96**: 29-34.

Cotter P.D., Hill C. (2003). Surviving the acid test: response of Gram-Positive bacteria to low pH. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67(3): 429-453.

Crowley S., Mahony J and van Sinderen D., 2012. Broad-spectrum antifungal-producing lactic acid bacteria and their application in fruit models. *Folia Microbiol*. DOI 10.1007/s12223-012-0209-3.

D

Dalié DKD, Deschamps AM, Richard-Forget F (2010) : Lactic acid bactéria-Potential for control of control of mould growth and mycotoxine : A review. Food control.21 :370-380.

Davis Larone, H., 1987. Medically important fungi. A guide to identification. 2nd edition Elsevier, London, 230 p.

Desar I.M.E., De Boer M., Bens C.C.P.M. (2008). Rapid and reliable identification of *Streptococcus anginosus* group isolates to the species level by real-time PCR and melting curve analysis. Journal of Microbiological Methods. Vol. 75, 372-374.

De Vuyst L., Leroy F. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology. 13, 4, 194-9.

DE VUYST LUC. Et LEROY F. (2007). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol*. 13:194–199

Diep D., Salehian Z., Holo H., Nes I.F. (2007). Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocin. Proc. Natl Acad. Sci., 104: 2384-2389.

Djadouni, F., Khalil, R., Elbahloul, Y., Omar, S.(2012). Isolation and partial Characterization of bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus megaterium*19 strains. Botany Department Scien. Alexandria. Egypt. 8 (3): 242-250.

Djadounil F. et Kihal M. (2012) . Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria and the Spectrum of their Biopeptides against Spoiling Germs in Foods . Braz . Arch .Biol and Biotechnol . 55.(3) : 435-443.

Djossou O , Perraud-Gaime I , Lakhal Mirlrau F , Rodriiguer-Serrano G , Karou G , Niamke S , Ouzari I , Boudabous A , Roussos S .(2011). Robusta coffee beans post harves microflora : Lactobacillus plantarum sp . As potential antagonist of Aspergillus carbonarius, Anaerobe, 17, 267-272.

Dobson C.M., Deneer H., Lee S., Hemmingsen S. (2010). Phylogenetic analysis of the genus Pediococcus, including *Pediococcus claussenii* ssp. Nov, a novel lactic acid bacterium isolated from beer. Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

Dortu, C, (2008). Isolement d'une bactérie lactique produisant de la sakacin G et utilisation sur des matrices alimentaires, Thèse de doctorat, Université de Liège, Belgique.

Dortu, C. et Thonart, P. (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêt pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* , **13:** 143-154.

Drider D., Fimland G., Hechard Y., Mc Mullen L.M., Prévost H. (2006). The continuing story of class IIa bacteriocins. Microbiol. Molec. Biol. Rev. 70: 564-582.

Duniere L. (2012). Stratégies de limitation du portage sain des *Escherichia coli* producteurs de Shigatoxines (STEC) par les bovins. Potentiel bio-protecteur des bactéries lactiques en alimentation animale**.** Thèse de doctorat**.** Université Blaise Pascal.

E

El-Ghaish, S., Ahmadova, A., Hadji-Sfaxi, I., El-Mecherfi, K.E., Bazukyan, I., Choiset, I., Rabesona,H., Sitohy, M., Popov, Y. G., Kuliev, A. A., Mozzi, F., Chobert, J. M., Haertlé, T. (2011). Potential use of lactic bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods. *Trends in Food Sci. Technol.*, **22:** 509-516.

El-Ziney M.G., Uyttendaele M., Debevere J., Jakobsen M. (1998). Characterization of growth and metabolite production of *Lb. reuteri* during glucose/glycerol cofermentation in batch and coutinuous cultures. Biotechnol. Lett. 20 (10): 913-916.

Endo A., Okada S.(2005). Monitoring the lactic acid bacterial diversity during shochu fermentation by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. Journal of Bioscience and Bioengineering., vol. 99, 216-221**.**

Ennahar S., Sashihara T., Sonomoto K., Ishizaki A. (2000). Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. FEMS Microbiol. Rev., 24: 85-106.

F

Farkas J. (2001) : Physical methods for food preservation. In food microbiology : fundamentals and frontiers. Erontiers. Editer by M.P Doyle, L.R. Beuchat and T.J. Montville. Pp. 567-592.

Falagas, M. E., Betsi, G. I., Athanasiou, S. (2006) Probiotics for prevention of recurren Vulvovaginal candidiasis: a review. *J Antimicrob Chemother*.*58*: 266-272.

Franz C.M.A.P., Stiles M.E., Schleifer K.H., Holzapfel W.H. (2003). Enterococci in foods - a conundrum for food safety. International Journal of Food Microbiology Enterococci in Foods. Functional and Safety Aspects. vol. 88,105-122.

Franz C.M., Van Belkum M.J., Holzapfel W.H., Abriouel H., Galvez A. (2007). Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. FEMS Microbiology Reviews. 31, 3, 293-310.

G

Galverz A., Abriouel H., Lopez R.L., Omar N.B.(2007). Bacteriocin- based strategies for food bioservation. Int. J. Food Microbiol. 120 (1-2):51-70.

Gálvez, A., Abriouel, H., Ben Omar, N., and Lucas, R. (2011). Food Applications and Strategy for safe use of fungi and fungal derivatives in food processing in Mycotoxins in Food chain, (Le Bars, J., Galtier, P., eds), Revue Méditerranéene Vétérinaire.149: 493-500

Gerez C.L, Torino M.L, Rollan G, De Valdez G.F. (2009). Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties, Food Control, 20,144-148.

Gill A.O. et Halley R.A. (2003). Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at. 24C°. *int.J.* food Microbiol. 80 : 251-259.

Gillor O., Nigro L.M., Riley M.A. (2005). Genetically bacteriocins and their potential as the next generation of antimicrobials. Current Pharmaceutical Design, (11).

Giraffa, G. (2003). Functionality of Enterococci in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* **88**: p215–222.

Gobbetti M., De Angelis M., Corsetti A and Di Cagno R., 2005. Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. *Trends Food Sci. Tech*. **16**: 57-69.

Gonzalez L., Sandoval H., Sacristan N., Castro J.M., Fresno J.M., Tornadijo M.E. (2007). Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. Food Control., 18: 716-722.

Gould G.W.(2000). Preservation : past, present and future, Brrtish Medical Bulletin, 56, 84-96.

Gourama H. (1997), Inhibition of growth and mycotoxin production of *Penicillium* by *Lactobacillus* species, LWT Food Sciance Technology, 30,279-293.

Guessas B., Ghazi F. Z., Aggad H., Henni D. et Kihal M. (2006). Phenotypic identification and whole cell protein analysis by SDS-Page for dominants lactic acid bacteria isolated from Algerian raw milk. Journal Algérien des zones arides, 5: 25-35.

Guessas B. (2007). Les potentialités métaboliques des lactiques isolées du lait cru de chèvre dans le bio-contrôle de Staphylococcus aureus. Thèse de Doctorat d'Etat. Université d'Oran. 216 pp.

Guillo N. (1958). Elaboration par Lactobacillus acidophilus d'un produit actif contre Candida albicans, Annales de l'institut de l'institut Pasteur, 95, 194 – 207.

Guiraud J.P. (2003). Microbiologie alimentaire. Dunod-RIA.p696, 144.

Guiraud, J.P. (2003). Microbiologie alimentaires. Paris : Ed. Dunod. RIA, pp 651.

Gurira O.Z., Buys E.M. (2005). Characterization and antimicrobial activity of Pediococcus species isolated from South African farm-style cheese. Food Microbiology., 22: 159-168

Guo J, Mauch A, Galle S, Murphy P, Arendt E.K, Coffey A.(2011). Inhibition of growth of *Trichophyton tonsurans* by *lactobacillus reuteri*, Journal of Applied Microbiology, 2111, 474-483.

H

Haddie J.M. (1995). The genus *Streptococcus*. In The genera of Lactic acid Bacteria. Wood B.J.B., Holzapfel W.H. Chapman & Hall, London., 392, 55 - 124.

Hammes W.P. et Hertel C. (2003). The Genera Lactobacillus and Carnobacterium. In The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community. Edited by M. Dworkin. New York. Springer-Verlag. Haris C introduction to modern microbiologie black wall scientific publication.1989 179p

Hassan A.N. et Frank J.F., 2001. Starter Cultures and their use. *In*: Applied Dairy Microbiology (Marth E.H. et Steele J.L.) *2e Ed., Marcel Dekker, Inc.* New York. 151-205.

Herrerosa M.A., Sandovalb H., González L., Castrob J.M., Fresnoa J.M and Tornadijoa Holzapfel W.H., Geisen R., Schillinger U. (1995). Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. International Journal of Food Microbiology.

Holzapfel W.H., Schillinger U. (2002). Introduction to pre- and probiotics. Food Research International, 35, 109-116.

Ho .N.T, Tuan N. Deschamps A. et Caubet R. (2007). Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product of Vietnam. *International. Workshop on Food Safety and Processing Technology*. 134-142.

Hongjuan L., Lu L., Shuwen Z.h., Wenming C and Jiaping L., 2012. Identification of Antifungal Compounds Produced by *Lactobacillus casei* AST18. *Current Microbiol*. **65**: 156-161.

Ho P.H., Luo J. B and Adams M. C., 2009. Lactobacilli and Dairy Propionibacterium with Potential as Biopreservatives against Food Fungi and Yeast Contamination. *Applied Biochemistry and Microbiology*. **45**(4): 414-418.

Hsiao C., Siebert K. (1999). Modeling the inhibitory effects of organic acids on bacteria. Int. J. Food Microbiol. 47 (3): 189-201.

Huang, W. P., Hertel, C. (2006). The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*.

Huang C. H., Lee F.L and Liou J. S., 2010. Rapid discrimination and classification of the *Lactobacillus plantarum* group based on a partial dnaK sequence and DNA fingerprinting techniques. *Antonie van Leeuwenhoek*. **97(3)**: 289-296.

Hutkins. R.W. (2006). Microbiology and Technology of fermented foods. Blackwell Publishing. Premier edition.

I

Idoui T., BOUDJERDA J., LEGHOUCHE E. et KARAM N.E. (**2009).** Lactic acid bactéria from «Sheep's Dhan », a traditional butter from sheep's milk : isolation, identification and major technological traits. Gr.Y.Aceites. 60 (2) : 177-183

J

Joffin JN., Leyral G. (2001). Microbiologie technique : Dictionnaire des techniques. Bordeaux : CRDP d'Aquitaine, 320p.

K

KHAOUA Saida ELHALOUI Nour eddine & LEFFEBVRE Gerard. (1997). Caractérisation. Purification et détermination de la structure partielle d'une bactériocine de la souche Lactococcus lactis C 16. Actes Inst. Agron. Veto (maroc). Vol. 17. 1,25-25 Actes Editions. Rabat.

Klaenhammer T.R.(1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev., 12(1-3): 39-85.

Klein C., Kaletta C., Etian K.D. (1993). Biosynthesis of the lantibiotic subtilin is regulated by ahistidine kinase/responce regulator system. Appl. Environ. Microbiol. 59:296–303.

Kobilinsky A., Nazer A.I., Dubois-Brissonnet F.(2007). Modeling the inhibition of *Salmonella typhimurium* growth by combination of food antimicrobials. Int. J. Food Microbiol. 115: 95-109.

Koort J., Coenye T., Santos E.M. (2006). Diversity of *Weissella viridescens* strains associated with "Morcilla de Burgos". International Journal of Food Microbiology. Vol. 109, 164-168.

Kumari A., Makeen K., Garg A.P., Marotta F., Gupta1 C., Divya. (2009). Effet of the bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* CCSUB202, on mode of action of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* MTCC3038. Int. J. Prob. Preb. 4(3) : 1-6.

L

Lamontagne, M., champagne, C. P., Ausseur, J. R., Moineau, S., Gardner, N., Lamoureux, M., Jean, J., Fliss, I. (2002). Microbiologie du lait. In: **Vignola, C.**

LARPENT J.P. (1997). Microbiologie alimentaire. Ed : *Lavoisier*, Paris, 1073(4) : 133-218.

(Arrêté 11 septembre 2004, JORA n° 70 du 7 novembre 2004

Lavermicocca P., Valerio F and Visconti A., 2003. Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. *Applied Environment and Microbiol*. **69(1)**:634-640.

Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A., Gobetti, M. **(2000).** Purification and characterization of novel antifungal compound from the sourdough *Lactobacillus plantarum strain 21B*. Applied and Environmental Microbiology, 66, 4084–4090.

Leclerc H., Gaillard F.L., Simonet M. 1994. Les grands groupes de bactéries. In: Microbiologie générale : la bactérie et le monde microbien. DOIN. Paris. 445.

Lee K.H., Kim J.H., Lim D.S., Kim C.H. (2000). Anti-leukaemic and antimutagenic effect sof di (2.ethylhexyl) phthalate isolated from aloe linne. J. Pharm. Pharmacol. 52, 593.

Leroy F., De Winter T., Adriany T., Neysens P., De Vuyst L. (2006). Sugars relevant for sourdough fermentation stimulate growth of and bacteriocin production by *L. amylovorus* DCE 471. Int. J. Food Microbiol., 12 : 102-111.

Le Marrec C., Hyronimus B., Bressollier P., Verneuil B., Urdaci M.C. (2000). Biochemical and genetic characterization of coagulin, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins, produced by *Bacillus coagulans*. Appl. Environ. Microbiol. 66 : 5213–5220.

Liebefeld. (2002). Microbiologie des cultures. Unité de recherche sur le lait et le fromage. pp,

Liu S. (2003). Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. Int. J. Food Microbiol. 83 (2): 115-131.

Luquet F.M., et Corrieu G., (2009), Question sur les bactéries lactiques. Santé et Nutrition. Vol 30. Word Newsletter n°5.France.

M

Magnusson J and Genty-Weeks C.R.(1996). Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques in « Bactérie lactique », de Roissard et luquet. Tech.Doc.Lavoisier, Paris

Magnusson, J., Strom, K., Roos, S., Sjogren, J. & Schnurer, J. (2003). Broad and Complexe antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **219**, 129-135.

Makhloufi M., Rebuffat S., Drider D. (2011). Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du Boza. Thèse Doctorat. Université Pierre et Marie CURIE UPMC. Paris. France.

Mami A.(2013) . Rechaerche des bactéries lactiques productrices de bactériocines à large spectre d'action vis-à-vis des germes impliqué dans les toxi-infections alimentaires en Algérie.

Mansour N.K. (2004). La valeur nutritionnelle des viandes dans la santé, 1ére édition. Université OMARELMOKHTAR Libye. pp357.p1832.

Marroki A. (2010). Caractérisation phénotypique et génotypique des souches de lactobacillus isolées du lait cru de chèvre et étude de leurs propriétés technologiques . Thèse de doctorat. Département de biolohie . Faculté des sciences .Université d'oran .

Marrth E.H, Hussong R.V. (1993). Effect of skim milks cultured with different strains of Luconostoc citrovorum on growth of some bacteia and yeasts, 46, 1033-1037

Marth, E. H. et Steele, J. L. (2001). Applied dairy microbiology. Marcel Dekker, Inc., New York.

Martirani L., Varcamonti M., Naclerio G., De Felice M. (2002). Purification and partial characterization of bacillocin 490, a novel bacteriocin produced by à thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. Microb Cell Fact. 18: 1(1):1.

Masuda S., Yamaguchi H., Kurokawa T., Shirakami T., Tsuji R.F., Nishimura I.(2008). Immunomodulatory effect of halophilic lactic acid bacterium *Tetragenococcus halophilus* Th221 from soy sauce moromi grown in high-salt medium. International Journal of Food Microbiology., vol. 121, 245-2.

Mauch A, Dal Bello F, Coffey A, Arendt E.K.(2010). The use of *Lactobacillus brevis* PS1 to in vitro inhibit the outgrowth of fusarium culmorum and other common fusarium species found on barley, International Journal of food Microbiology, 141, 116-121.

Mayr-Harting A, Hedges AJ, Berkeley, RCW. (1972). Methods for studying bacteriocins In : Norris JR, Ribbons, DW, editors. Methods in microbiology. Vol, 7A. New York : Academic Press 315-422.

Mc Auliffe O., Hill C.(2001). Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. FEMS Microbiology Review. 25: 285-308.

MENAD N. (2015) : Effet antagoniste des bactéries lactiques isolées à partir du lait de vache vis-à-vis de *Salmonella* sp.

Mendonça R.C.S., Gouvêa D.M., Hungaro H.M., Sodré Arthur de F and Querol-Simon A., 2013. Dynamics of the yeast flora in artisanal country style and industrial dry cured sausage (yeast in fermented sausage). *Food Control*. **29**: 143-148.

Mkrtchyan, H., Gibbons, S., Heidelberger, S., Zloh, M., Limaki, H.K. (2010). Purification, characterization and identification of acidocin LCHV, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus acidophilus* n.v. Er 317/402 strain narine. *Int.J. Antimicrobial Agents*., **35:** 255-260.

Moreno M.R.F., Sarantinopoulos P., Tsakalidou E., De Vuyst L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. International Journal of Food Microbiology 106, 1–24.

Moretro T., Aasen I.M., Storro I., Axelsson L. (2000). Production of sakacin P by *Lactobacillus sakei* in a completely defined medium. J Appl Microbiol. 88: 536-545.

Morgan S.M., O'connor P.M., Cotter P.D., Ross P., Hill C. (2005). Sequential actions of the two component peptides of the lantibiotic lacticin 3147 explain its antimicrobial activity at nanomolar concentration. Antimicrob. Agents Chemother., 49 (7): 2606-2611.

Nel H.A., Bauer R., Vandamme E.J., Dicks L.M. (2001). Growth optimization of *Pediococcus damnosus* NCFB1832 and the influence of pH and nutrients on the production of pediocin PD-1. J. Appl. Microbiol., 91: 1131-1138.

Nigutova K., Morovsky M., Pristas P., Teather R.M., Holo H., Javorsky P. (2007). Production of enterolysin A by rumen *Enterococcus faecalis* strain and occurrence of enlA homologues among ruminal Gram-positive cocci. J. Appl. Microbiol. 102(2): 563-569.

Niku-Paavola M.G, Laitila A, Mattial-Sandholm T, Haikara A. (1999), New types of antimicrobial compound production by *Lactobacillus plantarum*, Journal of Applied Microbiology, 86, 29-35.

Nilsen T., Nes I.F., Holo H. (2003). Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. Applied and Environmental Microbiology. 69, 5, 2975-84.

O

Ogier J.C., Casalta E., Farrokh C., Saïhi A. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Leuconostoc* genus. Int. J. Food Microbiol. 126: 286-290.

Olga, D. (2011) Mycoflore post-récolte du café robusta et utilisation des bactéries lactiques pour le contrôle des moisissures mycotoxinogènes et de l'Ochratoxine A p. 17-38

Oppegard C., Rogne P., Emanuelsen L., Kristiansen P.E., Fimland G., Nissen-Meyer J. (2007). The two-peptide class II bacteriocins: structure, production and mode of action. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 13(4): 210-219.

O'Sullivan L., Ross R.P., Hill C.(2003). Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. Biochimie. 84: 593-604.

P

Papagianni M. (2003). Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function and applications. Biotechnol. Adv., 21(6): 465-499.

Papagianni M., Avramidis N., Filioussis G. (2007). High efficiency electrotransformation of *Lactococcus lactis* spp. *Lactis* cells pretreated with lithium acetate and dithiothreitol, BMC Biotechnologie, 7: 15.

Parente E., Ricciardi A. (1999). Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol., 52: 628-638.

Patton G.C. & **Van Der Donk** W.A. **(2005).** New developments in lantibiotic biosynthesis and mode of action. Curr. Opin. Microbiol., 8, *543-55 1.*

Peirson M.D., Guan T.Y., Holley R.A. (2003). Aerococci and carnobacteria cause discoloration in cooked cured bologna. Food Microbiology., 149 - 158.

Prema P., Smila D., Palavesam A and Immanuel G., 2010. Production and Characterization of an Antifungal Compound (3-Phenyllactic Acid) Produced by *Lactobacillus plantarum* Strain. *Food Bioprocess Technol*. **3**: 379-386.

Pilet M.F., Magras C., Federigh M. (2005). Bactéries lactiques. In : bactériologie alimentaire (Federighi M.). 2e Ed., Economica. Paris. 219-240.

Piraino P., Ricciardi A., Salzano G., Zotta T., Parente E. (2006). Use of unsupervised and supervised artificial neural networks for the identification of lactic acid bacteria on the basis of sds-page patterns of whole cell proteins. Journal Of Microbiological Methods. Vol. 66, 336-346.

Pirotta, M., Gunn, J., Chondros, P., Grover, S., O'Malley, P., Hurley, S., and Garland, S. (2004) Effect of *Lactobacillus* in preventing post-antibiotic vulvovaginal candidiasis: a randomised controlled trial. *BMJ*.***329***: 548.

Pirotta, M., Gunn, J., Chondros, P., Grover, S., O'Malley, P., Hurley, S., and Garland, Pot B. (2008). The taxonomy of lactic acid bacteria. In: Corrieu G., and Luquet F.M. (Eds). Bactéries lactiques. De la génétique aux ferments. Lavoisier. Paris, France pp 1–152.

ℛ

Richard C., Canon R., Naghmouchi K., Bertrand D., Prévost H., Drider D.(2006). Evidence on correlation between number of disulfide bridge and toxicity of class IIa bacteriocins. Food Microbiol. 23(2): 175-183.

Riley, M. A. et Chavan, M. A. (2007). Bacteriocins: Ecology and Evolution. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

Rishi P, Preet S, Kaur P. (2011). Effect of *L. plantarum* cell-free extract and cotrimoxazole against *Salmonella Typhimurium*: a possible adjunct therapy. *Ann. Clin. Microbiol*. Antimicrob.10:9. http://www.ann-clinmicrob.com/content/10/1/9.

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

Rodriguez J.M., Martinez M.I., Kok J. (2002). Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. Crit. Rev. Food Sci. Nul, 42: 91-121.

Rouse S, Harnett D, Vaughan A, Van Sinderen D. (2008). Lactic acid bacteria with potentiel to eliminate fungal apoilage in foods, Journal of Applied Microbiology, 104, 915-923.

Romain.H. (2011). Caractérisation des régulateurs transcriptionneis Rgg et étude du role de la protéine Rgg0182 de *streptococcus thermopilus*. Thèse de doctorat .Université Henri poincare.

Rossetti L., Giraffa G. (2005). Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. Journal of Microbiological Methods., vol. 63, 135-144.

Ruiz, F. O., Gerbaldo, G., Asurmendi, P., Pascual, L. M., Giordano, W., Barberis, I. L. (2009). Antimicrobial activity, inhibition of urogenital pathogens, and synergisticinteractions Between *Lactobacillus* strains. *Curr Microbiol*.***59***: 497-501.

Ruiz-Moyano S., Martin A., Benito M.J., Nevado F.P., Cordoba M.G. (2008). Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. Meat Science., In Press, Corrected Proof.

S

Sabia C., De Niederhäusern S., Messi P., Manicardi G., Bondi M. (2003). Bacteriocin-producing *Enterococcus casseliflavus* IM 416K1, a natural antagonist for control of *Listeria monocytogenes* in Italian sausages ("cacciatore"). International Journal of Food Microbiology. Vol. 87, 173-179.

Sabia C., Manicardi G., Messi P., De Niederhäusern S., Bondi M. (2002). Enterocin 416K1, an antilisterial bacteriocin produced by *Enterococcus casseliflavus* IM 416K1 isolated from Italian sausages. International Journal of Food Microbiology, vol. 75, 163-170.

Sahnouni F., Matallah-Boutiba A., Chemlal D and Boutiba Z., 2012. Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of marine fish in the Oran Algeria coast. *African Journal of Microbiology Research*. **6(13)**: 3125-3133.

Saidi N, GUESSAS B, BENSALAH F, BADIS A, HADADJI M, HENNI JE, PREVOST H, KIHAL M. (2002). Caractérisation des Bactéries Lactiques Isolées du lait Cru de Chèvre des Région Aride d'Algérie .Journal Algérien des Region Aride, 01 :01-14.

Saidi Nour Eddine (2007). La microflore lactique du lait cru de chèvre local : études, microbiologique. Biochimique et génétique des bavtéries lactiques d'intérêt bio-préservateur Thèse de Doctorat. Université d'Oran. 216 pp.

Samson R.A., Hoekstre E.S., Frisvad J.C. et Filtenborg O. (2000) : Intoduction to food and airborne fungi, 6th edn. Centraalbureau voor schimmelcultures, Utrecht.

Savijoki K., Ingmer H., Varmanen P.(2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol., 71: 394-406.

Schneider R., Fernandez F.J., Aguilar M.B., Guerrero-Legarreta I., Alpuche- Solis A., Ponce-Alquicira E. (2006). Partial characterization of a class IIa pediocin produced by *Pediococcus parvulus* 133 strain isolated from meat (Mexican "chorizo"). Food Control., vol. 17, 909-915.

Settanni L., Corsetti A. (2008). Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. Elsevier. International Journal of Food Microbiology. 121: 123–138.

Sjögren J, Magnusson J, Broberg A, Schnurer J, Kenne L.(2003). Antifungal 3-hydroxy Fatty acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14. *Appl Environ Microbiol* **69**: 7554-7557.

Simpson W.J. et Taguchi H. 1995. The genus Pediococcus with notes on the genera *Tetragenococcus* and *Aerococcus*. In The Genera of Lactic Acid Bacteria. Wood B.J.B., Holzapfel W.H. Chapman & Hall, London., 125 - 172.

Stiles J. Penkar S. Plockova M. Chumchalova J. Bullerman L.B. (2002). Antifungal activity of sodium acetatae and *Lactobacillus rhamnosus*, Journal of food Protection, 65, 1188-1191.

Stiles M. et Holzapfel W.H. (1997). Review article Lactic acid bacteria of Foods andtheircurrent taxonomy. *International Journal of food microbiology*. 36: 1-29

Stroim, K., Sjo¨gren, J., Broberg, A., Schnurer, J. **(2002).** *Lactobacillus plantarum* MiLAB, 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo (L-Phe-L-Pro) and cyclo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and phenyl lactic acid. Applied and Environmental Microbiology, 68, 4322–4327. *Systematic Bacteriology*, **39**, pp: 279-283.

Strus M., Cosiewski T., Kochan P., Heczko P.B. (2005). The *in vitro* effect of Hydrogen proxide on vaginal microbial. 48: 56-63.

SUTRA L., FEDERIGHI M. & JOUVE J.L. (1998). Manuel de bactériologie alimentaire. Ed : *POLYTECHNICA*, Paris, 308(6) : 31-249.

T

Tabuc C., Bailly J.D., Bailly S., Querin A and Guerre P., 2004. Toxigenic potential of fungal mycoflora isolated from dry cured meat products: preliminary study. *Revue. Méditéranienne Vétérinaire*. **156**: 287-291.

Tagg J.R., Da jani A.S., Wannamaker L.W. (1996). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. Bacteriol. Rev. 40: 722-756.

Tamime A.Y. 2002. Microbiology of starter cultures. In: Dairy microbiology handbook (Robinson R.K.). 3e Ed., John Wiley and Sons, Inc., New York. 261-366.

Teixeira L.M., Carvalho M.G.S., Facklam R.R. 1999. *Vagococcus*. In Encyclopedia of Food Microbiology. Robinson R.K. Oxford, Elsevier. 2215-2220.

Tomé, E., Pereira, C.V., Lopes, C.L Gibbs, P.A et Teixiera, P.C (2008). *In vitro* tests of suitability of bacteriocin-producing lactic acid bacteria, as potential biopreservation cultures in vacuum-packaged cold-smoked salmon. Elsevier. Food control. 19 :535-543.

Thompson J and Gentry-Weeks C.R., 1996. Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques *in* « Bactérie lactique », de Roissard et luquet. *Tech.Doc*. Lavoisier, Paris.

Todorov S.D., Dicks L.M. 2004. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp *lactis* ST34BR, a strain isolated from barley beer. J. Basic Microbiol., 44: 305-316.

Tosukhowong A., Nakayama J., Mizunoe Y., Sugimoto S., Fukuda D., Sonomoto K. 2005. Reconstitution and function of *Tetragenococcus halophila* chaperonin 60 tetradecamer. J. Biosci. Bioengin. 99: 30-37.

Twomey D., Ryan M., Meaney B., Hill C. 2002. Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. Antonie van Leeuwenhoek., 82: 165-185.

U

Uehara, S., Monden, K., Nomoto, K., Seno, Y., Kariyama, R., Kumon, H. (2006). A pilot study evaluating the safety and effectiveness of *Lactobacillus* vaginal suppositories in patients with recurrent urinary tract infection. *Int. J. Antimicrobial Agents*, **28:** 30-34.

V

Vadyvaloo V., Snoep J.L., Hasting J.W., Rautenbach M. 2004. Physiological implications of class IIa bacteriocin resistance in *L. monocytogenes* strains. Microbiology, 150: 335-340.

Vandamme P., Pot B., Gillis M., DeVos P., Keresters K., Swwings J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. Microbiol. Rev. 60: 407.

Verluyten J., Leroy F., De Vuyst L. 2004. Influence of complex nutrient source on growth of and curvacin A production by sausage isolated *L. curvatus* LTH 1174. Appl. Environ. Microbiol., 70, 5081-5088.

Vermeiren L., Devleighere F. et Debevere J. 2004. Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. Int .J. Food Microbiol. 96 : 149-164.

VINOD KUMAR J ., SOMESH S . ET NEERJA S ., (2006) . Production, purification, stability and efficacity of bacteriocin from isolated of Natural Lactic acid fermentation of vegetables. Food technology and biotechnology, 44 (3) : 435-439

Vollenweider S. 2004. 3-hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. Appl. Microbiol. Biotech. 64: 16-27.

W

Welman A.D., et Madox I.S., (2003). Exopolysaccharides from lactic acid bactéria : Perspective and challenges. Trend in biotechnol. 21 ; 269-274.

Whittenbury(R.) (1998). - Biochemical characteristics of *Streptococcus* species. In: *Streptococci.* Ed. Skinner (F. A.) and Quesnel (L. B.), London. Academie Press.

Wiedemann I., Böttiger T., Bonelli R.R., Wiese A., Hagge S.O., Gutsmann T., Seydel U., Deegan L., Hill C., Ross P., Sahl H.G. 2006. The mode of action of the lantibiotic lacticin 3147 - a complex mechanism involving specific interaction of two peptides and the cell wall precursor lipid II. Molecular Microbiology. 61(2): 285-296.

Wiseman D.W , Marth E.H.1981 , Growth and aflatoxin production by Aspergillus parasiticus when in the presence of presence of Streptococcus lactis , Mycopathologia , 73 , 1188-1191 .

W. J. Lyon and B. A. Glatz, "Partial purification and characterization of a bacteriocin produced by *Propionibacterium thoenii*," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 57, no. 3, pp. 701–706, 1991.

y

Yaakoubi K., Benkerroum N., Wiorowski F., Sanson F., Haydersah J and Chevallier I., 2009. Development of a multiwell antagonistic activity assay for the detection of bacteriocin production by lactic acid bacteria. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*.**17**: 32-45.

Yateem, A., Balba, M. T., Al-Surrayai, T., Al-Mutairi, B., Al-Daher, R. (2008). Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potential from camel milk. *Int. J. Dairy Sci.* , **3:** 194-199.

z

Zaier A., Essid I., Chabbouh M., Bellagha S and Sahli A., 2011. Physico-chemical and microbial caracteristics of traditional and industrial kaddid. *European Drying Conference - EuroDrying'*2011. Palma. Balearic Island, Spain, 26-28 October 2011.

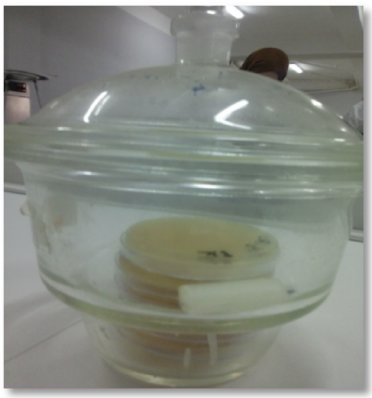
Zalan Z., Barath A., Halasz A. 2005. Influence of growth medium on hydrogen peroxide and bacteriocin production of Lactobacillus strains. Food Technol. Biotech. 43(3): 219- 225.

Zhou WM, Liu W., et Wu DG. (2000): Isolation and characterization of new *Lactobacillus gasseri* KT7. J Appl Microbiol. 88: 877-886.

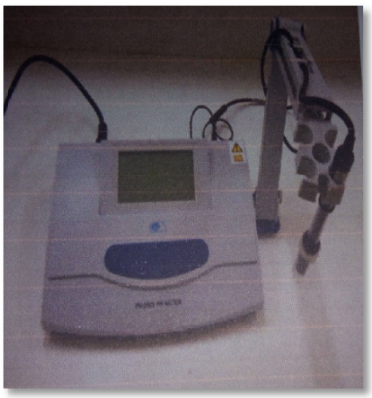
Annexes

Annexe n° I

Matériel et appareillage



Dessiccateur



pH mètre



Balance de précision



Agitateur magnétique



Vortex



Les micropipettes



Centrifugeuse



Bain Marie



Autoclave





Bec bensen **Etuve** **Microscope**

Annexe n° II

Composition des milieux de culture, réactifs et tampons

1. Milieux solides

- **Gélose MRS (**Man, Rogosa et Sharpe)
  - Polypeptone ……. 10 g
  - Extrait de viande …….....10 g
  - Extrait autolytique de levure …….....5 g
  - Glucose ……....20 g
  - Tween 80 ……....1 ml
  - Phosphate dipotassique ……..…....2 g
  - Acétate de sodium ……...……..5 g
  - Citrate d'ammonium……..……2 g
  - Sulfate de magnésium …….……..…….0,20 g
  - Sulfate de manganèse…….……..…….0,05 g
  - Agar…….…15 g
  - Eau distillée ……..……..….. 1000 ml

  PH 5,7 Autoclavage 120°C/ 20 minutes

- **Gélose BHI (**Brain heart infusion)
  - Extrait cœur-cervelle.....17,5 g
  - Peptone pancréatique de gélatine .....10,0 g

- Chlorure de sodium.....5,0 g
- Phosphate disodique .....2,5 g
- Glucose.....2,0 g
- Agar …….15g
- Eau distillée ……..……..….. 1000 ml

PH 7.5 Autoclavage 120°C/ 20 minutes

- **Gélose PDA** (Potato dextrose agar)
  - Extrait de pomme de terre ……..200g
  - Glucose……..……20g
  - Agar ……..……15g
  - Eau distillée ……..……..…….. 1000 ml

PH 5.6 Autoclavage 120°C/ 20 minutes

2. *Milieux liquides*

- **Bouillon MRS**
  - Polypeptone ……... 10 g
  - Extrait de viande …….……..…..10 g
  - Extrait autolytique de levure …….…..……...5 g
  - Glucose ……..…..20 g
  - Tween 80 ……..…....1 ml
  - Phosphate dipotassique …….....2 g
  - Acétate de sodium ……...…….5 g
  - Citrate d'ammonium ……2 g
  - Sulfate de magnésium …….……0,20 g
  - Sulfate de manganèse…….…….…….0,05 g
  - Eau distillée …….……..……..……..… 1000 ml

PH 5,7

- **Bouillon BHI**
  - Extrait cœur-cervelle.....17,5 g
  - Peptone pancréatique de gélatine .....10,0 g
  - Chlorure de sodium.....5,0 g
  - Phosphate disodique .....2,5 g
  - Glucose.....2,0 g

- Eau distillée ……..……...……..….. 1000 ml

PH 7.5 Autoclavage 120°C/ 20 minutes

- **Bouillon PDA**
  - Extrait de pomme de terre ……..200g
  - Glucose……..……20g
  - Eau distillée ……..……..….. 1000 ml

PH 5.6 Autoclavage 120°C/ 20 minutes

3. *Milieux semi solide*

- **Gélose BHI semi solide**
  - Extrait cœur-cervelle.....17,5 g
  - Peptone pancréatique de gélatine .....10,0 g
  - Chlorure de sodium.....5,0 g
  - Phosphate disodique .....2,5 g
  - Glucose.....2,0 g
  - Agar ……..……7g
  - Eau distillée ……..……..……..….. 1000 ml

PH 7.5 Autoclavage 120°C/ 20 minutes

- **Gélose PDA semi solide**
  - Extrait de pomme de terre ……..200g
  - Glucose……..……20g
  - Agar ……..……..……7g
  - Eau distillée ……..……..….. 1000 ml

PH 5.6 Autoclavage 120°C/ 20 minutes

4. *Tampon et réactifs*

- **Tampon PBS** (pH 7.2)
  - Na_2HPO_4 ..... 10.9g
  - $Na_2H_2PO_4$ 3.2g
  - NaCl 90g
  - Eau distillée qsp 1000ml

Autoclavage 120°C/ 20 minutes

- **Eau physiologique** (pH 7)
  - Chlorure de sodium ……8.5g
  - Eau distillée …….. 1000ml

- **Cristal violet**

Solution A

  - Cristal violet ……..……..2g
  - Alcool à 95o ……..……..20ml

Solution B

  - Oxalate de NH4 ……..…….……0.8g
  - Eau distillée qsp ……..……...20ml

Mélanger les solutions A et B.

- **Fuschine**

Fuschine basique ……..1g

Alcool éthylique à 90o 10ml

Phénol ……..……..5g

Eau distillée qsp …….. 100ml

La solution est diluée au 1/15.

- **Lugol**
  - Iode ……..……. 1g
  - Iodure de potassium ……..…….2g
  - Eau distillée qsp ……...300ml

- **Catalase (réactif pour la mise en évidence)**
  - Eau oxygénée 10 volumes ……..…. (10%).
- **Lactophénol**
  - Eau bidistillée ……...…20ml

- Glycérine …….40g
- Acide lactique……..……20g
- Phénol en cristaux ……..…….20g

Annexe n° III

Le protocole de coloration de gram

Technique

Réaliser un frottis et fixer le.

- Plonger la lame dans le violet de gentiane (ou cristal violet) phéniqué pendant 1 minute.
- Laver la lame à l'eau distillée.
- Plonger la lame dans une solution de lugol pendant 1 minute
- Laver à l'eau distillée
- Décolorer dix secondes à l'alcool.
- Rincer immédiatement a l'eau distillée
- Plonger la lame dans la safranine (ou la fuchsine) phéniquée pendant 1 minute
- Laver la lame à l'eau distillée.
- Sécher la lame en la tamponnant avec du papier Joseph.
- Observer à l'objectif x100 à l'immersion dans l'huile.

Annexe n° IV

Tableau de la lecture de la galerie

- **Tableau de lecture da la galerie Api 20 E**

Test	Substrat	Caractère recherché	Résultat	
			Négatif	positif
ONPG	Ortho-nitro-phenyl-galactosidase	Beta-galactosidase	Incolore	jaune
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	
LDC	Lysine	Lysine décarboxylase	Jaune	
ODC	Ornithine	Ornithine décarboxylase	Jaune	
CIT	Citrate de sodium	Utilisation de citrate	Vert pale/ Jaune	
H2S	Thiosulfate de sodium	Production de H2S	Incolore/grisâtre	
URE	Urée	Uréase	Jaune	
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	TDA/Immédiat	
			Jaune	Marron foncé
IND	Tryptophane	Production d'indole	IND/2 min, maxi	
			jaune	Anneau rouge
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétone	VP 1 + VP 2	
			Incolore	Rosé /rouge
GEL	Gélatine de kohn	Gélatine	Non diffusion	Diffusion de pigment noire
GLU	Glucose	Fermentation/oxydation	Bleu /bleu-vert	jaune
MAN	Manitol	Fermentation/oxydation	Bleu /bleu	jaune
INO	Inositol	Fermentation/oxydation	Bleu /bleu	jaune
SOR	sorbitol	Fermentation/oxydation	Bleu /bleu	jaune
RHA	Rhamnose	Fermentation/oxydation	Bleu /bleu	jaune
SAC	Saccharose	Fermentation/oxydation	Bleu /bleu	jaune
MEL	Melibiose	Fermentation/oxydation	Bleu /bleu	jaune
AMY	Amygdaline	Fermentation/oxydation	Bleu /bleu	jaune
ARA	Arabinose	Fermentation/oxydation	Bleu /bleu	jaune

Tableau de lecture de la galerie Api staph

tests	substrats	Caractère recherché	Résultat	
			Négatif	Positif
0	Aucun	Témoin négatif	Rouge	-
GLU	D-glucose	Témoin positif	Rouge	Jaune
FRU	D-fructose	Acidification à partir du carbohydrate		
MNE	D-mannose			
MAL	Maltose			
LAC	Lactose			
TRE	D-tréhalose			
MAN	D-mannitol			
XLT	Xylitol			
MEL	D-melibiose			
NIT	Nitrate de potassium	Réduction des nitrates en nitrite	Nit 1 + Nit 2 / 10 min	
			Incolore /Rose	Rouge
PAL	β-naphtyl ac.phosphate	Phosphatase alcaline	ZYM A + ZYM B / 10 min	
			Jaune	Violet
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétyl méthyl-carbonyl	VIP 1 + VIP 2/ 10 min	
			Incolore / rose	Violet / Rose
RAF	Raffinose	Acidification à partir de carbohydrate	Rouge	Jaune
XYL	Xylose			
SAC	Saccharose			
MDG	α-méthyl-d-glucosamine			
NAG	N-acétyl-glucosamine			
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Orange /Rouge
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge /Violet