REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DR. YAHIA FARES DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCES

Mémoire de fin d'étude
En vue de l'obtention d'un diplôme de Master en
Domaine : Science de la Nature et de la Vie
Filière : Biologie
Spécialité : *Microbiologie appliquée*
Thème :

Valorisation de l'activité enzymatique,antimicrobienne et probiotique des bactéries isolées à partir de plusieurs variétés de produits laitiers

Presenté par :

REKIK Fatima

Devant le Jury composé de :

Dr. **HOCEINI .A**	MCB	Univ- MEDEA	Promotrice
Dr. **ZERGOUG.A**	MCB	Univ- MEDEA	Examinatrice
Dr. **CHAOUATI.K**	MAA	Univ- MEDEA	Examinatrice

Année universitaire
2020-2021

REMERCIEMENTS

Nous tenons avant tout à remercier ***le bon dieu*** *tout puissant de nous avoir donné la force et la volante pour achever ce modeste travail .*

Je tiens à remercier sincèrement le docteur ***HOCEINI.A*** *maitre de conférence A à université de MEDEA, ma promotrice pour leur gentillesse et sa patience. C'est un immense plaisir d'avoir travaillée avec vous.*

Nos vifs remercîments vont également aux Dr ***ZERGOUG.A*** *Maitre de conférence A et Dr* ***CHAOUATI.K*** *Maitre de conférence B pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions*

Mes remerciements s'adressent aussi à tout les professeurs ,de la faculté des sciences

Dédicaces

Tout au début, je tiens à remercier le bon dieu de m'avoir donné du courage et de patience afin de réaliser ce modeste travail que je dédie :

A mon très cher ***PAPA*** *que je n'ai pu remercier car il est parti ,que dieu lui pardonne repose en paix* ***PAPA****.*

A ma très chère ***maman*** *que dieu te garde pour nous en bonne santé encore très longtemps.*

A mes petites princesses, mes adorables filles
Lina,Maya,Razane,Maram et Loudjaine.

A mon cher ***époux*** *qui ma soutenue tout au long de ce projet*

Mes sœurs *et très* ***chers frères***

A ma ***belle famille***

Toute la famille ***REKIK*** *avec mes respects*

A ma nièce ***Sarah*** *pour leurs encouragements et je leur souhaite tout le bonheur et la réussite*

Mes amies *et à tous ceux qui me sont chers.*

FATIMA

Résumé

Ce présent travail représente une étude bibliographique sur les bactéries isolées des produits laitiers ,et leurs activités enzymatique, antimicrobienne et probiotique ainsi une simple introduction de lait et ses dérivés.

Le but c'est de mettre en évidence l'effet primordial de ces bactéries lactiques dans l'alimentation et leur role important dans l'entretien et l'amélioration de la santé de l'homme.

La recherche de certaines caractéristiques d'intérêt technologique tel que l'activité enzymatique , probiotique et antibactérienne a pris un essor considérable en industrie alimentaire que pour le domaine thérapeutique .

Cette aperçu bibiolgraphique permet de mettre en evidence l'importance des bacteries lactiques à travers des resultats obtenues de quelque etudes antécédentes en algerie et au autres pays

Mots clés : activité enzymatique, antimicrobienne, probiotique ,bactéries lactiques, produits laitiers, thérapeutique.Algerie ,Autre Pays

Abstract

This present work respects a bibliographic study on the bacteria isolated of buitier products and their enzymatic activity ,antimicrobial and probiotic ,as well as simple introduction of milk and its derivatives

The aim is to demonstrate the primary effect of lactation bacteria in the diet an their important role in the maintenance and improvement of human health

Finding certain characteristic of interest technologie such as enzymatic, probotic and antibacterial, then a considerable boom in industry aliment than for the therapeutic field.

this bibliographic study makes it possible to highlight the importance of lactic acid bacteria through the results obtained from some previous studies in Algeria and in other countries

Keyword: enzymatic ,activities ,antimicrobial ,probiotic ,lactic bacteria ,dairy products, Algeria , other countries

ملخص :

يتعلق هذا العمل بدراسة نظرية حول البكتيريا المعزولة من منتوجات الألبان ونشاطها الانزيمي ومضادات البكتيريا والمضادات الحيوية بالإضافة الى مقدمة بسيطة حول الحليب ومشتقاته .

الهدف هو تسليط الضوء على التأثير الذاتي لبكتيريا الحليب في التغذية ودورها المهم في الحفاظ على صحة الانسان وتحسينها .

البحث عن خصائص معينة ذات اهمية تكنولوجية مثل النشاط الانزيمي والمضادات الحيوية ومضادات البكتيريا،وكان هذا انطلاقة كبيرة في مجال صناعة الاغذية من اجل تحسين المسار العلاجي .

تتيح هذه الدراسة النظرية إبراز أهمية بكتيريا الحليب من خلال النتائج التي تم الحصول عليها من بعض الدراسات السابقة في الجزائر ودول أخرى.

الكلمات المفتاحية: نشاط الإنزيم ، مضاد الميكروبات،مضاد حيوي ،بكتيريا الحليب،الحليب ومشتقاته ، الجزائر ، دول أخرى.

Sommaire

Remerciement

Dédicaces

Résume

Listes des Figures

Listes des Tableaux

Liste d'abréviation

CHAPITRE I:Lait et produits laitiers

Introduction : 1

1.Généralités sur le lait : 2

1.1.Définition : 2

1.2.composition physique et chimique du lait cru : 2

1.3.Caractéristiques physico-chimiques du lait : 3

1.4. Microflore de lait : 4

1.4.1.Flore originale : 4

1.4.2. Flore pathogène : 4

1.4.3.Flore psychrotropes: 4

CHAPITRE II: Les bactéries lactiques

2.Les produits laitiers: 4

2.1.Généralités : 4

2.2.Les différents types de produits laitiers : 5

2.2.1. Yaourts (ou yoghourts) : 5

2.2.2. Crèmes laitières : 6

2.2.3. Desserts lactés : 7

2.2.4. Fromages : 8

1.Généralité sur les bactéries lactiques : 9

1.1.Historique de bactéries lactique : 9

1.2.Habitat : 9

1.3.Définition : 9

1.4.Innocuité des bacteries lactiques : 10

2.Classification des bactéries lactiques : 10

3. Caractéristiques des genres liés aux produits laitiers : 12

3.1. Lactobacillus : 12

3.2.Lactococcus : 14

3.3. Leuconostoc : 15
3.4. Pediococcus : 16
3.5. Streptococcus : 17
3.6. Enterococcus : 18
4. l'utilisation des bactéries lactiques au niveau des produits laitiers : 19
5.Importance des Bactéries Lactiques 21
3.1 Importance en alimentation 21
3.2Importance sur la Santé 22

CHAPITRE III:L'activité enzymatique

1. Les enzymes de lait : 23
1.1 la plasmine: 23
1.2 la lipoprotéine lipase: 23
1.3 Autres enzymes de lait : 23
2.1. Intérêt technologique de la protéolyse : 24
2.2. Processus de l'autolyse : 24
2.2.1.Les facteurs qui influencent l'autolyse : 25

CHAPITRE IV:L'activité antimicrobienne

1.Le pouvoir antibactérien : 26
2. Phénomène d'antagonisme : 26
3. Production de métabolites inhibiteurs : 27
3.1. Production de peroxyde d'hydrogène (H2O2) : 27
3.2. Dioxyde de carbone (CO2) : 27
3.3. Diacétyle 27
3.4. Bactériocine : 28
3.5.Classification des bactériocines : 28
3.6 Mécanisme d'action des bactériocines : 29
3.7. Les applications des bactériocines en agroalimentaire : 30

CHAPITRE V:L'activité probiotique

1.Les probiotiques : 34
1.1.Historique et définition : 34
1.2.Les principaux micro-organismes probiotiques : 34
1.3. Rôle des Probiotiques 35
1.3.1. Sur la santé humaine 35

1.3.2 Sur la santé animale 37
Résultats de quelques études antécédentes : 39

Materiels et Metodes

1.Materiels : 41
2.Methodes : 41
2.1. Isolement et purification des bactéries lactiques 41
2.2. Conservation des isolats 41
2.3. Identification phénotypique des souches isolées 41
2.3.1 Identification morphologique 42
2.4 Identification biochimique et physiologique 42
2.4.1 Test de catalase 42
2.4.2 Production de CO_2 à partir de glucose 43
2.4.3. Hydrolyse de l'arginine 43
2.4.4. Croissances à différentes températures 43
2.4.5. Croissance à différentes concentrations d'NaCl 43
2.4.6. Croissance à différentes valeurs de pH 43
2.4.7. Croissance à 0.1% de bleu de méthylène 44
2.4.8. Thermorésistance 44
2.4.9. Résistance à l'éthanol 44
2.4.10. Production de dextranes 44
2.5.Mesure de l'activité enzymatique : 44
2.5.1. Mesure de l'autolyse 44
2.5.2 Mesure de l'activité protéolytique 45
2.6.Recherche de pouvoir antibactérien 45
2.6.1 Mise en évidence de l'effet antagoniste 45
2.7. Caractérisation probiotique et technologique 47
2.7.1 Antibiogramme 47
2.7.2. Tolérances à l'acidité et aux conditions gastriques 47
2.7.3 Tolérance aux sels biliaires 48
Conclusion : **49**
Références bibliographiques
Annexes

Listes des figures

Figure 1 : Proportion relative des principaux composants de lait **(Institut de l'élevage**..... 3
Figure 2: Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres 11
Figure 3 : Lactobacillus casei 14
Figure 4 : Lactococcus lactis 15
Figure 5 : Streptococcus thermophilus.....18
Figure 6 : Enterococcus faecalis 19
Figure 7 : e I. 43. Nisaplin™ 32
Figure 8 : Mise en évidence du pouvoir antibactérienne par la méthode directe.....47

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux genres de bactéries lactiques (MATAMOROS, 2008).....12
Tableau 2 : Exemples d'applications des bactériocines comme conservateurs alimentaires (Gálvez et al., 2011).....31
Tableau 3 : Principales espèces utilisées comme probiotiques (Robinson, 2002).....35
Tableau 4 : Effets positifs des probiotiques sur la santé humaine (effets probables ou suspectés) (Izquierdo Alegre, 2009).....37

Liste d'abréviation :

FAO :l'Organisation des Notions unies pour l'agriculture et l'alimentation

OMS :l'Organisation Mondiale pour la Santé

NA DH : Nicotinamide adénine dinucléotide hydrogène.

Ca CL_2 : Chlorure de calcium

MH : Mueller Hinton

L D H : Lactate Déshydrogénase

M R S : Man Rogosa Sharp

L A B : Lactic acid bacteria

PePN,PePo :aminopeptidase

Pepx :X protyl dipeptidyl

V/V : Volume /Volume

m/v :masse /volume

ml : Millilitre

nm : Nanomètre

h :heure

C° :degrés Celsius

Sp :espèce non précisé

Spp :plusieurs espèces non précisées

ML : Microlitre

mM :milimolaire

PH : Potentiel d'hydrogène

U :unité

Introduction

Introduction :

Le lait et les produit laitiers font partie des aliments les plus importants dans la nutrition et la santé humaine.

Considérés primordialement comme une source de calcium incontournable et incomparable avec n'importe quels autre produits ,le calcium issu de denrées laitières est caractérisé par sa biodisponibilité et sa facilité d'assimilation par l'organisme **(Pointillard et Guéguen,2006).**

Les bactéries lactiques sont largement impliquées dans la fabrication de produits laitiers fermentés du fait de leurs activités métaboliques particulières.
La production d'acide lactique est essentielle à la production des produits laitiers fermentées et leur confère une saveur typique, l'acidification , la production d'acide organique et d'autre composés antimicrobiens , telles les bactériocines ,jouent un rôle majeur dans la conservation des produit laitiers fermentés **(Desmazeaud,1996,Cherl-Ho,1997 ;Qywele 1997 ;Daly and Qavis,1998 ;Ouwehand 1998)**

Les bacteries lactiques rentrent de nombreux processus de fermentation des aliments et dans la nutrition humaine et sont considérées comme probiotique,car elles contribuent positivement à la santé humaine **(Klean hammer et all,2008 ;Makarova et all 2006)**

Notre travail représente une étude bibliographique sur les bactéries isolées de produits laitiers qui nous a permet de comprendre mieux l'effet bénéfique de ces bactéries et leur role dans l'industries laitires.

Le but de cette thèse est de mettre une meilleure connaissance des activités enzymatique antibactérienne et probiotique de bactéries isolées de produits laitiers et de valoriser ces pouvoirs afin d'améliorer l'industrie agroalimentaire et par conséquence la santé humaine .

Chapitre I :

Lait et produit laitiers

1.Généralités sur le lait :

1.1.Définition :

Le congrès international pour la répression des fraudes alimentaires de 1909 a été définie le lait comme un produit intégral de la trait totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne doit pas contenir de colostrum **(Luquet et al. 2005).**

Le lait est un aliment complet, très nourrissant, à lui seul tous les composants nécessaires à l'alimentation humaine; dans 100 kg de lait il y à 37 kg d'eau et 13 kg de matière sèche.

D'après **(Carole ,2002)** ; le lait est le produit de sécrétion des glandes mammaires des mammifères, comme la vache, la chèvre et la brebis, il est destiné à l'alimentation du jeune animal naissant. Du point de vue physicochimique, le lait est un produit très complexe. Une connaissance approfondie de sa composition, de sa structure et de ses propriétés physiques et chimiques sont indispensables à la compréhension des transformations du lait et des produits obtenus lors des différents traitements industriels.

Selon **(Brule ,2003)** ; le lait est un aliment adapté aux besoins nutritionnels et physiologiques du jeune. Il couvre les besoins énergétiques, structuraux et fonctionnels et contribue à défendre l'organisme contre les agressions bactériennes et virales en augmentant les défenses immunitaires du nouveau-né.

1.2.composition physique et chimique du lait cru :

Le lait est un substrat très riche, fournissant à l'homme et aux jeunes mammifères un aliment presque complet **(Larpent, 1997).** Il contient une forte proportion d'eau environ 87%. Le reste est représenté par l'extrait sec (environ 130g par litre). Les principaux constituants de cet extrait sec **:** les lipides, les glucides, les protides, les vitamines et les éléments minéraux (Ca2+, Na+, K+, Mg2+ et Cl-) **(Larpent, 1997)**.(Figure 01)

Le lait contient également des anticorps, des hormones et peut parfois contenir des résidus d'antibiotiques **(Vilain, 2010)**.

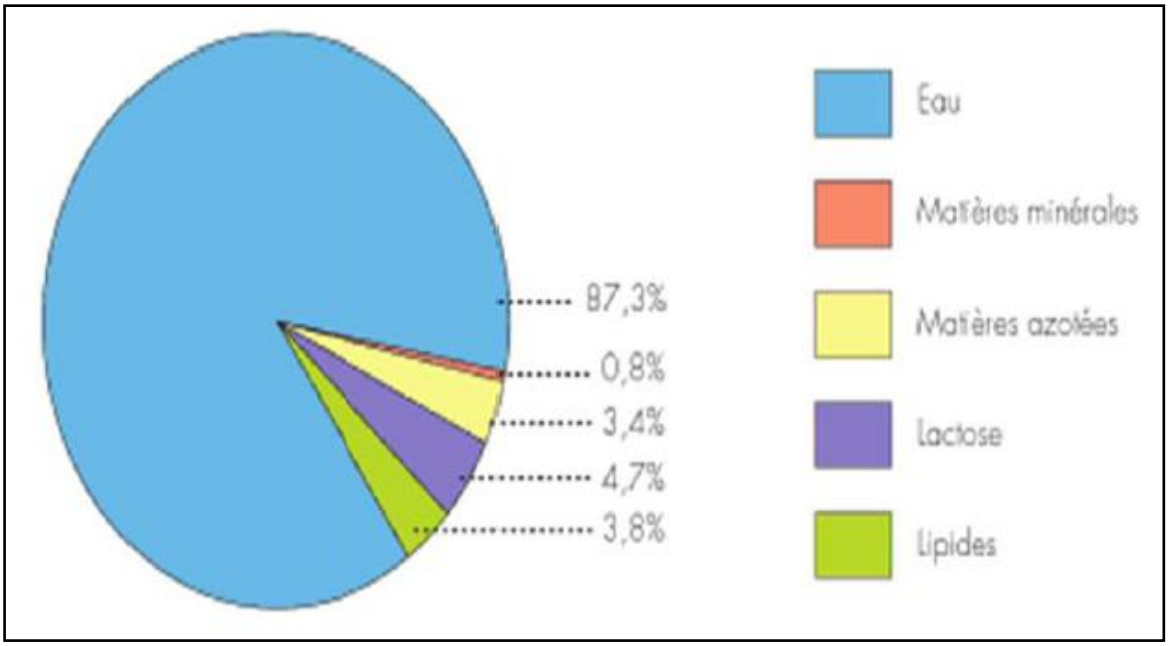


Figure 1 : Proportion relative des principaux composants de lait **(Institut de l'élevage (France) 2009).**

1.3.Caractéristiques physico-chimiques du lait :

Le lait est un liquide blanc mat, légèrement visqueux, dont la composition et les caractéristiques physico-chimiques varient sensiblement selon les espèces animales, et même selon les races **(Rahali et Ménard, 1991; Soryal et *al*., 2004)**. Ces caractéristiques varient également au cours de la période de lactation, de la traite ou de l'allaitement. Elles sont aussi tributaires de la nature de l'alimentation des animaux **(Coulon et *al*., 1995).** Les principales propriétés physico-chimiques du lait sont représentées par sa densité, son point de congélation, son point d'ébullition et son acidité.

Sur le plan physique, c'est à la fois une solution (lactose, sels minéraux), une suspension (matières azotées) et une émulsion (matières grasses). Son pH est légèrement acide (pH compris entre 6,5 et 6,8 pour le lait de vache et entre 6,2 et 6, 82 pour le lait de chèvre). Par contre, il estlégèrement basique pour le lait humain (pH compris entre **7** et 7.5), l'acidité du lait augmenteavec le temps suite à la transformation du lactose en acide lactique.

Cette acidité permis d'avoir un indicateur du degré de conservation. Pour cela, on utilise le degré Dornic (°D) **(Hebboul et*al.*, 2005 ; Dillon, 2008).**

1.4. Microflore de lait :

Le lait contient peu de micro-organismes lorsqu'il est prélevé dans des bonnes conditions, à partir d'un animal sain (moins de 5000 germes/ml) **(Larpent, 1997)**.

Le lait dans les cellules du pis est stérile **(Tolle, 1980),** mais la glande mammaire, la peau dupis, le matériel de traite, la litière, la qualité de l'air et les pratiques des éleveurs sont des sources de contamination **(Ménard et *al*., 2004**).

Le lait cru peut être contaminé par différents microorganismes avant, pendant et après la traite :selon **Betsi et al ;(1997)** in **Chaouch** et **Tebichek (2001)** ils peuvent être classés dans les flores suivantes :

1.4.1.Flore originale :

Lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions, le lait contient essentiellement des germessaprophytes du pis et des canaux galactophores**.**

1.4.2. Flore pathogène :

Elle présente un danger pour le consommateur c'est le cas de : *Mycobacteriumbovis, M.tuberculosis, Bacillus cereus,* et des représentants des genres Brucella et Salmonella **(Fukushima et *al*., 1984 in Bourgeois et *al*., 1996)**.

1.4.3.Flore psychrotropes:

Il s'agit essentiellement de : Acinetobacteres, Clostridium, Pseudomonas et Flavobacterium qui se développent à une température de 3 à 7°C **(Hicks et *al*., 1985; Jooste et *al*., 1985 in Leveauet Bouix, 1993)**. *Listeria monocytogenes*capable de se multiplier à une température comprise entre 0°C et 10°C est qualifiée de ce fait de psychrotrophe**(Rosset,2001)**

2.Les produits laitiers:

2.1.Généralités :

C'est l'augmentation de la production du lait durant certaines saisons et la difficulté de son préservation sous la forme fraîche a conduit au développement des technologies de production traditionnel (**Dharam et Narender 2007 *in* Lahsaoui, 2009).**

Les procédés de fabrication sont nombreux et conduisent à une grande variétés de produits laitiers fermentés .Il existe une grande diversité de laits fermentés à travers le monde ,dont des laits fermentés acides (yaourt,laban), acides et alcoolisés (Kefir,Koumis),peu acides (lait ribot) ou épaissis (viili)

Les procédés de fabrication des produit laitiers fermentés sont relies à la physiologie des ferments et des flores d'affinage ,notamment à leur température de croissance, à l'utilisation de différents substrats et à leur métabolisme fermentaire, les microorganismes ont une action déterminante sur la texture et le gout des produits fermentés par la formation ou non de gaz, de composés aromatiques.

2.2.Les différents types de produits laitiers :

2.2.1. Yaourts (ou yoghourts) :

La dénomination yaourt (ou yoghourt) est réservée au lait fermenté obtenu, selon les usages loyaux et constants, par le développement des seules bactéries lactiques thermophiles spécifiques dites Lactobacillus bulgaricus et Streptococcus thermophilus, qui doivent être ensemencées simultanément et se trouver vivantes dans le produit fini jusqu'à la DLC, à raison d'au moins 10 millions de bactéries par gramme rapportées à la partie lactée. De plus, la quantité d'acide lactique libre contenue dans 100 g de yaourt ne doit pas être inférieure à 0,7 g.

Un yaourt (ou yoghourt) peut se décliner avec un taux de matière grasse variable, selon celui du lait utilisé pour sa fabrication et des matières laitières ajoutées. Il peut être nature, sucré ou non, ou contenir des ingrédients autres que laitiers qui ne doivent pas représenter plus de 30% du poids final du yaourt (morceaux de fruits, miel, confiture, arômes naturels ou de synthèse autorisés). Ces ingrédients sont pasteurisés ou stérilisés avant d'être incorporés. L'addition de stabilisateurs, épaississants ou gélifiants hormis ceux provenant des préparations de fruits, est interdite.

La dénomination de vente est complétée de l'espèce ou des espèces animales si les produits utilisés ne proviennent pas de l'espèce bovine.

- **Les ferments du yaourt :**

Il y a 2 organismes vivants que l'on retrouve habituellement dans le yaourt : lactobacillus delbrueckii subsp , bulgaricus et streptococcus salivarius subsp . thermophilus.

lactobacillus bulgaricus apporte essentiellement de l'acidité . il se développe bien à une température allant de 47 à 50 ° C.

Streptococcus thermophilus est moins acidifiant que le précédent ; il se développe bien à une l'arome . il se développe à une température allant de 42 à 45 °C.

- **Les types de yaourt :**

  - **Le yaourt ferme :**

le lait et les ferments sont mis en pots dans le récipient définitif . Dés la fin da la fermentation , le yaourt est refroidi . c'est le yaourt grand classique .

  - **Le yaourt brassé** :

le lait et les ferments sont mis à fermenter dans un récipient intermédiaire. après fermentation , le yaourt est brassé , souvent aromatisé ensuite il est mis en pot avant refroidissement , sa texture est lisse , crémeuse . dans cette catégorie se retrouvent la plupart des yaourts du commerce.

2.2.2. Crèmes laitières :

La dénomination crème est réservée au lait contenant au moins 30 g de matière grasse provenant exclusivement du lait pour 100 g de poids total. La dénomination crème légère est réservée au lait contenant entre 12g inclus et 30g non inclus de matière grasse provenant exclusivement du lait pour 100 g de poids total.

- **Crème crue**

C'est une crème qui n'a subi aucun traitement de pasteurisation ou de stérilisation. Fruit direct de l'écrémage, elle est refroidie et stockée à +6°C. De texture liquide, pendant les premiers jours, et de saveur douce, sa teneur en matière grasse est généralement supérieure à celle des autres crèmes. La mention « crue » est obligatoire sur l'étiquetage.

- **Crème pasteurisée :**

La crème fraîche désigne une crème n'ayant subi que le traitement de pasteurisation et conditionnée sur le lieu de production dans un délai de 24 heures après celle-ci Il existe la crème fraîche pasteurisée épaisse et la crème fraiche pasteurisée fluide, dite fleurette.

- **Crème stérilisée et crème UHT :**

• La crème stérilisée fluide :

Une fois conditionnée, la crème crue est stérilisée à 115°C durant 15 à 20 minutes, puis refroidie. Commentaire : Ce procédé développant un goût de cuit ou de caramel, on lui préfère de plus en plus la crème UHT.

• La crème UHT :

La crème UHT est stérilisée par un traitement thermique à 140 - 150°C durant quelques secondes, puis rapidement refroidie et scellée en conditionnement aseptique (brique, bouteille, etc.) étanche et stable jusqu'à la date limite de consommation.

- **Crèmes à fouetter, crème fouettée, crème Chantilly et crème sous pression :**

Les crèmes fouettées ou à fouetter, légères ou non, contiennent au minimum 75% de crème ou de crème légère, qui peuvent être additionnées de saccharose (15% maximum), de ferments lactiques, de matières aromatiques naturelles, de stabilisateurs ou de protéines du lait.

Pour les crèmes fouettées, légères ou non, le taux de foisonnement4 ne doit pas être supérieur à 3,5.

La crème Chantilly est une crème fouettée contenant au moins 30 g de matière grasse pour 100 g et n'ayant fait l'objet d'aucune autre addition que de saccharose (sucre mi-blanc, sucre blanc ou sucre blanc raffiné) et éventuellement de matières aromatisantes naturelles.

La crème sous pression peut être foisonnée avec un taux de foisonnement de 3,5 maximum. En s'échappant, un gaz neutre injecté dans le conditionnement provoque le foisonnement de la crème. L'addition de stabilisants est limitée à 0,1%. La dénomination de vente doit comporter la mention « sous pression ». La crème sous pression et la crème légère sous pression doivent être, préalablement à leur mise en vente, soumises à un traitement de pasteurisation ou de stérilisation.

2.2.3. Desserts lactés :

La catégorie des desserts lactés n'est pas définie réglementairement. Selon les usages, et le code déontologie de la profession, les desserts lactés sont fabriqués à partir de matières premières laitières qui entrent dans leur composition pour au moins 50%, auxquelles on a ajouté d'autres ingrédients (riz, semoule, sucre, fruits, caramel, café, chocolat, etc.) et des additifs (tels que agents de texture épaississants ou gélifiants, arômes, colorants, antifongiques pour éviter la contamination par des levures ou des moisissures, etc.).

Ils subissent un traitement thermique de cuisson, pasteurisation ou stérilisation.

2.2.4. Fromages :

La dénomination « fromage » est réservée au produit fermenté ou non, affiné ou non, obtenu à partir des matières d'origine exclusivement laitière suivantes : lait, lait partiellement ou totalement écrémé, crème, matière grasse (MG), babeurre, utilisées seules ou en mélange et coagulées en tout ou en partie avant égouttage ou après élimination partielle de la partie aqueuse. La teneur minimale en matière sèche (MS) du produit ainsi défini doit être de 23 g pour 100 g de fromage. La description et les caractéristiques techniques des fromages et des spécialités fromagères figurent dans le texte et l'annexe (qui présente les dénominations définies telles que « Camembert », « Brie », « Raclette », « Emmental », « Saint-Paulin », etc.) du décret n°2007-628 du 27 avril 2007.

- **Rôles des BL dans la fabrication fromagère :**

Les BL sont introduits dans le lait sous forme de " levains" lactiques, encore appelés "ferments". Leur action dans la fabrication fromagère est liée principalement à deux aspects de leur métabolisme:

- la production d'acide lactique. Cet acide est un sous produits de la fermentation, voie de dégradation des sucres en conditions anaérobies (absence d'O2) .

- L'activité protéolytique (fractionnement des protéines). Les Bacteries Lactiques ne peuvent absorber et utiliser que des acides aminés libres. Peu abondants dans le lait, ou des peptides court(composés seulement de quelques acides aminés). Leur nutritions azotée exige donc l'hydrolyse des grandes protéines du lait, et notamment les caséines, par des enzymes (les protéases) situées dans la paroi extérieure de la cellule **(Michel Desmareaud,1998).**

Chapitre II :

Les bactéries lactiques

1.Généralité sur les bactéries lactiques :

1.1.Historique de bactéries lactique :

L'utilisation de la fermentation par l'Homme remonte a des temps très anciens. Les premiers produits fermentés ont certainement été obtenus par acidification spontanée des jus vegetaux (vins, bieres…) ou par contamination naturelle du lait (yaourts, fromages…). Les premieres preuves de l'existence des produits laitiers fermentes remontent a 8000 ans avant JC dans le croissant fertile au Moyen Orient (plaines du Nil, du Jourdain, de l'Euphrate et du Tigre), époque où les végétaux et les animaux sont domestiqués (**Fox, 1993).**

La fermentation des végétaux (vins, bières) et la production de levain apparaissent entre 4000 et 2000 avant JC chez les Egyptiens. La fermentation est réalisée a partir de différents types d'aliments : des végétaux (concombres, betteraves, dattes, jus de fruits, soja, *etc*.), des produits animaux (viande, lait) ou du poisson. Elle permet de conserver les aliments mais aussi de leur donner une saveur différente du produit original. Il faudra attendre Pasteur et ses travaux sur la fermentation en 1857 pour établir un lien entre la fermentation lactique et les bactéries.

La premiere culture bacterienne pure sera d'ailleurs une culture de *Lactococcuslactis*obtenue et décrite par Joseph Lister en 1873 cité par **Penaud,(2006**). **Metchnikoff isole en 1904** le « *bacille bulgare* » (*Lactobacillus delbrueckis*sp.*bulgaricus*) présent dans le yaourt. Il étudie les proprietes acidifiantes des bacteries du yaourt et il developpera l'idee que les bacteries contenues dans les laits fermentés ont un effet bénéfique sur la santé (**Metchnikoff, 1907**). Il plaidera en faveur de l'introduction de produits laitiers fermentes dans le regime alimentaire et en 1905, les premieres entreprises fabricant du yaourt a partir des souches de l'Institut Pasteur voient le jour **(Bibel, 1988).**

1.2.Habitat :

Les bactéries lactiques sont présentes à l'état libre dans l'environnement ou vivent en association avec un hôte, tel que l'Homme ou l'animal, dans un écosystème bactérien comme le tractus gastro-intestinal ou génital des mammifères **(Klein *et al.*, 1988).**

1.3.Définition :

Les bactéries lactiques sont des êtres vivants procaryotes qui partagent un certain nombre de caractères permettant de les classifier. Elles sont hétérotrophes, chimio organotrophes, généralement immobiles, non-sporulantes, à Gram positif, munies d'oxydase, dépourvus de

cytochromes, de catalase et de nitrate réductase. Elles sont aéro–anaérobies facultatives, ne liquéfient pas la gélatine et ne produisent ni d'indole, ni d'hydrogène sulfureux (H2S) **(Luquet, 1990**).

Ces bactéries, généralement, non pathogènes et qui peuvent être sous forme de coque ou bacille, ne croient que sur des milieux riches. Ce qui explique leurs exigences nutritionnelles notamment en acides aminés, acides gras, peptides, vitamines, sels et sucres fermentescibles. Elles sont classées selon la voie métabolique empruntée pour la production de métabolites en deux grandes catégories **(Frey et Hubert, 1993).**

- **Homofermentaires ou homolactiques**, produisant exclusivement de l'acide lactique.
- **Hétérofermentaires**, pour celles qui produisent en plus de l'acide lactique, de l'acide acétique (hétérolactiques facultatives) ou encore de l'éthanol et du CO2 (hétérolactiques strict).

1.4.Innocuité des bacteries lactiques :

Les bacteries lactiques sont depuis des siècles associées à l'alimentation humain et animale. Ces micro-organisme sont tolérés par l'homme et les animaux **(Strome et al,2005)** ce qui a conduit à la reconnaissance de leur statut GRAS (Generally Recognized As safe)**(Klaenhammer et al,2005)** .Les bactéries lactiques peuvent donc être considérées comme des micro-organismes dépourvu de toute toxicité pour le consommateur et sont particulièrement appropriées pour être utilisée comme des agents de biopréservation.

2.Classification des bactéries lactiques :

La première classification des bactéries lactiques a été établie en 1919 par **Orla-jensen**. Elle est basée sur divers critères morphologiques et physiologiques (catalse,nitrite reductase,type de fermentation…..).Bien que ces critères restant très importants pour l'identification des bactéries , en 1977,la taxonomie de bactérie lactique a été révolutionnée par **(Woese et Fox,1977)**qui ont introduit la phylogénie moléculaire basée sur la séquence des ARN ribosomiques qui a conduit à une reclassification majeure de certaines espèces et sous espèces. (Figure 2)

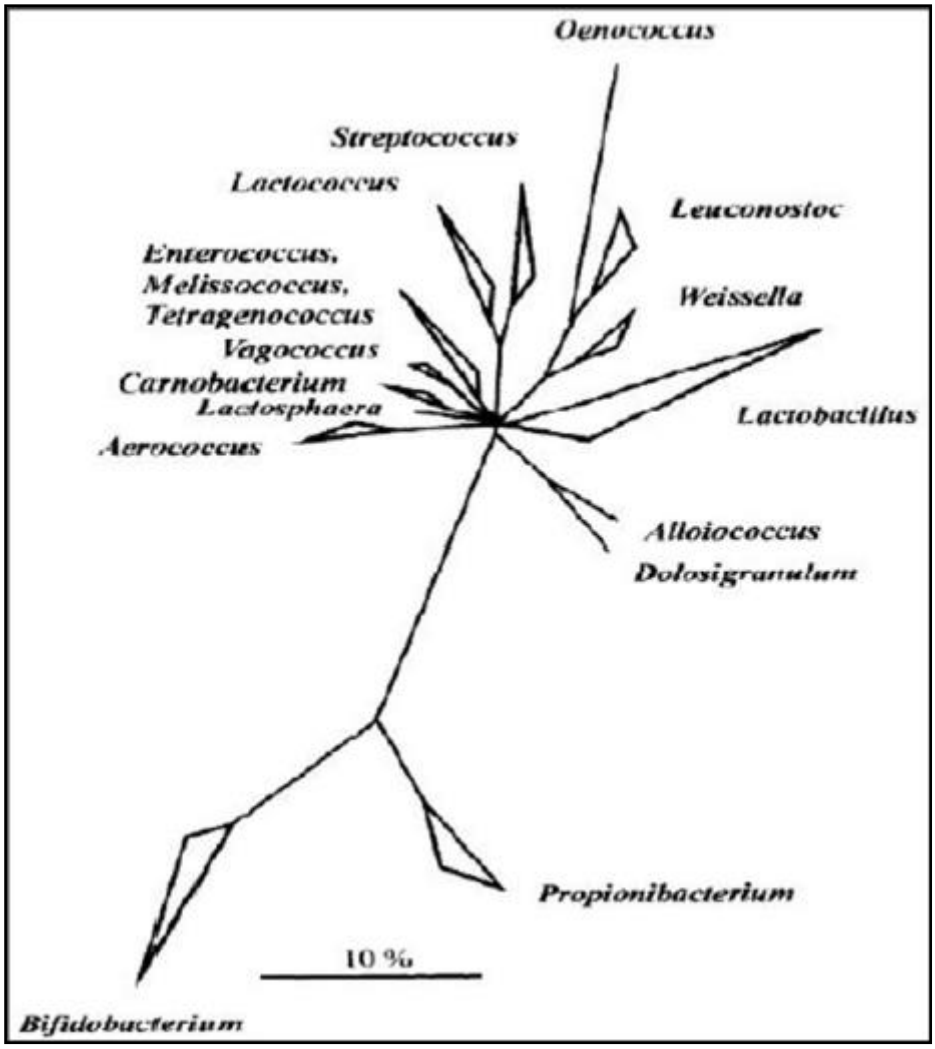


Figure 2: Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres associés, obtenu par analyse des ARNr 16S **(STILES et HOLZAPFEL, 1997)**

D'autre méthodes génotypiques ,basées sur les acides nucléiques sont aussi utilisées en classification comme le pourcentage en GC ou hybridation ADN-ADN **(Salimen et Von Wright,2004).**

Le Tableau 01 présente les principaux genres de bactéries lactiques et les caractéristiques physiologiques qui forment la base de la classification et de l'identification

Tableau 1 : Principaux genres de bactéries lactiques **(MATAMOROS, 2008)**

Genre	Forme de la cellule	Type de fermentation	Configuration de lacide lactique	Espèce type
Aeroccoccus	Coques	Homofermentaires		Ac.viridans
Carnobacterium	Bacilles	Hétérofermentaires	L(+)	Cb.divergens
Enterococcus	Coques	Homofermentaires	L(+)	Ec.faecalis
Lactobacillus	Bacilles	Homo ou hétero-fermentaires	D(-),L(+) ou D/L	Lb.debrueckii
Lactococcus	Coques	Homofermentaires	L(+)	Lc.lactis
Leuconostoc	Coques	Hétérofermentaires	D(-)	Ln.mesenteroides
Oenococcus	Coques	Hétérofermentaires	D(-)	Oe.oeni
Pediococcus	Coques	Homofermentaires	D/L ou L(+)	Pc.damnosus
Streptococcus	Coques	Homofermentaires	L(+)	Sc.salivarius
Tetrgenococcus	Coques	Homofermentaires	L(+)	Tc.halophilus
Vagococcus	Coques ovoïdes	Homofermentaires	L(+)	Vc.fluviais
weissella	Petits bacilles	Hétérofermentaires	D/L ou D(-)	We.viridescens

3. Caractéristiques des genres liés aux produits laitiers :

Six genres de bactéries lactiques sont associés au lait et aux produits laitiers; il s'agit de Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus et Enterococcus **(Bulut, 2003).**

3.1. Lactobacillus :

C'est l'un des plus importants genres de bactéries lactiques. Il appartient à la famille des Lactobacillaceae contenant aussi les genres Paralactobacillus et Pediococcus. Il comprend 96 espèces et 16 sub-espèces qui sont adaptées à des endroits spécifiques et ne sont pas trouvées généralement en dehors de leurs habitats **(De Vos et al., 2009).**

Elles exigent toutes de nombreux facteurs nutritionnels pour leur croissance. Pour cela, tous les milieux de culture utilisés pour l'isolement sélectif ou semi sélectif des lactobacilli (MRS, le milieu APT et le milieu SL…) doivent contenir des facteurs de croissance adéquats,

une source de vitamines représentée généralement par l'extrait de levure, les peptones, le manganèse, l'acétate et le tween 80. Leurs colonies sont souvent petites (2-5mm), convexes, brillantes, généralement opaques et parfois pigmentées **(De Vos et al., 2009).**

Toutes les espèces de Lactobacillus ont une morphologie caractéristique en bâtonnet. Leurs cellules peuvent être longues et minces, courtes, courbées, coccobacilli ou coryneformes. Elles sont arrangées, généralement, en chaines. Elles sont immobiles à l'exception de certaines souches qui sont motiles grâce aux flagelles péritriches. Elles ne peuvent pas dégrader les caséines ni liquéfier la gélatine. La réduction des nitrates est rare, elle peut avoir lieu quand le pH terminal égal à 6 ou lorsque l'hème est ajouté au milieu de croissance. Elles ne peuvent pas produire l'indole ni l'H2S **(De Vos et al., 2009).**

Les lactobacilli sont des bactéries acidophiles qui croissent généralement à un pH égal à 5 ou moins avec un optimum compris entre 5.5 et 6.2 (De Vos et al., 2009). La plupart des espèces croissent mieux à des températures mésophiles jusqu'à 40°C, celles thermophiles ne peuvent pas se développer à une température inférieure à 15°C avec une limite maximale de 55°C.

En se basant sur le caractère fermentaire, Kandler et Weiss ont proposé une classification des lactobacilli en trois groupes:

- Les lactobacilli homofermentaires stricts: ils fermentent les hexoses en acide lactique exclusivement par la voie homofermentaire d'Embden Meyerhof, mais ils ne peuvent pas fermenter les pentoses et le gluconate.

- Les lactobacilli hétérofermentaires facultatifs: ils métabolisent les hexoses presque exclusivement en acide lactique par la voie homofermentaire d'Embden-Meyerhof. Lors d'une limitation en glucose certaines espèces sont capables de le fermenter via la voie des acides mixtes. Ils peuvent transformer les pentoses en acides lactique et acétique par une phosphocétolase inductible.

- Les lactobacilli hétérofermentaires stricts: ils fermentent les hexoses en acide lactique, en acide acétique ou en éthanol et CO2, via la voie hétérofermentaire de la 6-phosphogluconate/phosphocétolase comme ils peuvent dégrader les pentoses (voie des pentoses phosphate) en acides acétique et lactique **(De Vos et al., 2009).**(Figure 03)

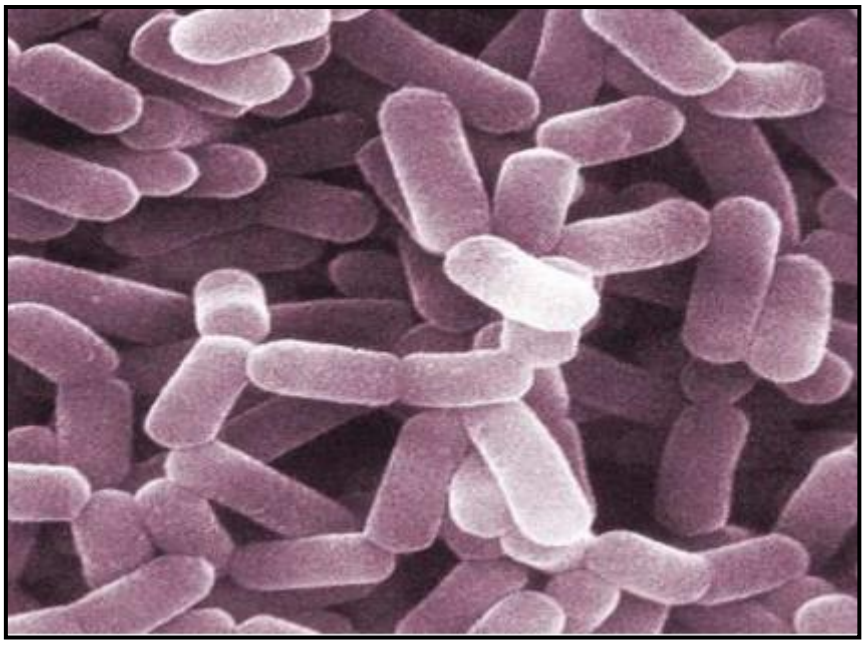


Figure 3 : Lactobacillus casei

3.2.Lactococcus :

Le genre Lactococcus fait partie de la famille des Streptococcaceae comprenant aussi Streptococcus et Lactovum. Il rassemble cinq espèces dont les exigences nutritionnelles sont complexes et variables: Lc. gravieae, Lc. lactis, Lc. raffinolactis, Lc. piscium et Lc. plantarum. Elles sont des habitantes typiques des plantes, des animaux et des produits dérivés de ces organismes (De Vos et al., 2009). Pour leur isolement, une variété des milieux complexes est utilisée (gélose au sang, le milieu Elliker, M17…). Après une incubation qui dure de 1 à 2 jours, des colonies petites, translucides à blanchâtres, lisses et circulaires sont formées **(De Vos et al., 2009).**

Les cellules de Lactococcus sont sphériques ou ovoïdes, isolées, en paires ou en chaines. Elles sont non hémolytiques, aéro anaérobies facultatives à microaérophiles. Elles sont toutes mésophiles, la température optimale de croissance varie de (10 à 40°C), certaines peuvent croître à une température inférieure à 7°C après une incubation de 10 à 14 jours.

Elles se développent, généralement, à 4% d'NaCl à l'exception de Lc. lactis subsp. cremoris qui tolère seulement 2% de sel **(De Vos et al., 2009).**

Les lactococci sont des bactéries homofermentaires qui produisent de l'acide lactique L(+) à partir de glucose. Ils croissent bien à des valeurs proches de la neutralité dans les milieux

tamponnés, mais ils s'arrêtent de croître lorsque le pH atteint 4.5 **(De Vos et al., 2009).**(Figure 04)

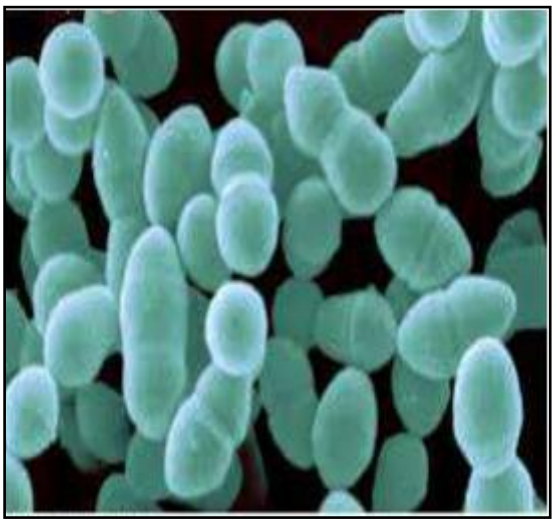


Figure 4 : Lactococcus lactis

3.3. Leuconostoc :

Le terme leuconostoc dérive du mot grec « leucus » qui veut dire claire et du mot générique latin d'une algue « nostoc ».

Leuconostoc fait partie de la famille des Leuconostocaceae qui rassemble deux autres genres (Weissella et Oenococcus). Il a été isolé pour la première fois en 1878 par Cienkowski (cité aussi Tsenkovskii) suite à l'apparition d'accidents dans des sucreries **(Thunell, 1995).**

Il comprend dix espèces fastidieuses dans leurs exigences nutritionnelles. Elles sont isolées à partir des habitats riches en nutriments (lait, vin, plantes et des végétaux fermentés) **(Thunell, 1995).** Plusieurs d'entre elles sont associées à une variété de produits carnés (viandes fraiches ou emballées sous vide, volailles, viandes traitées ou fermentées), d'autres sont employées comme levains dans la production du kefir.

Plusieurs milieux de culture sont utilisés pour l'enrichissement et l'isolement des leuconostocs tels que: MRS, Rogosa SL, glucose-extrait de levure, gélose à l'acétate, le milieu HP, etc. Le choix de tel milieu dépend de l'habitat à partir duquel leurs espèces sont isolées. Après une culture de 3 à 5 jours sur un milieu spécifique, des colonies lisses, blanches grisâtres avec un diamètre inférieur à 1mm sont formées. Leurs cellules sont sphériques, souvent allongées, en paires ou en chaines. Toutes les espèces de Leuconostoc ne peuvent pas

hydrolyser l'arginine, non hémolytiques, non protéolytiques et sont généralement incapables d'acidifier et de coaguler le lait **(De Vos et al., 2009).**

Elles ne sont pas des bactéries acidophiles, le pH optimum de croissance est compris entre (6 et 7), certaines peuvent croître à pH de 4.5. La température optimale de croissance se situe entre 20°C et 30°C mais certaines sont capables de croître à 5°C.

Les leuconostocs sont des hétérofermentaires obligatoires qui produisent le D(-)-acide lactique, le CO2, l'éthanol ou l'acide acétique après la fermentation de glucose.

Sur un milieu concentré en saccharose, certaines espèces peuvent produire les dextranes comme (Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides) **(De Vos et al., 2009).**

3.4. Pediococcus :

Ce genre appartient à la famille des Lactobacillaceae. Il partage son habitat ainsi que plusieurs propriétés physiologiques avec les genres suivants: Lactobacillus, Leuconostoc et Weissella (le groupe LLPW).

Il renferme neuf espèces: P. acidilactici, P. claussenii, P. cellicola, P. damnosus, P. dextrinicus, P. inopinatus, P. parvulus, P. pentosaceus et P. stilesii. Elles peuvent être isolées à partir des plantes, des fruits et des végétaux fermentés. Certaines souches sont utilisées dans la fermentation des viandes, dans la brasserie et d'autres causent des infections chez l'homme. Plusieurs milieux de culture sont développés pour l'isolement des pediococci mais ils ne sont pas complètement sélectifs citant par exemple: la gélose MRS, le milieu SL et la gélose à l'acétate **(Dworkin et al., 2006; De Vos et al., 2009).**

Les cellules de Pediococcus sont sphériques, parfois ovoïdes, isolées ou en paires (durant le milieu de la phase exponentielle); après leur division dans deux directions perpendiculaires elles forment les tétrades mais jamais les chaines **(De Vos et al., 2009).**

Certaines souches de l'espèce P. pentosaceus produisent la catalase ou une pseudocatalase. A l'exception de P. acidilactici et P. pentosaceus, toutes les espèces ne peuvent pas hydrolyser l'arginine. Elles sont non halophiles mais acidophiles, elles croissent à pH: 5 et non à pH: 9, sauf: P. stilesii. La température optimale de croissance varie de 25°C à 35°C. Pour les pediococci typiques, il apparait que le CO2 n'est pas produit à partir de gluconate. Toutes les

espèces sont des homofermentaires, elles produisent le DL- acide lactique à partir de glucose à l'exception de: P. claussenii.

Deux espèces sont considérées comme pediococci atypiques, il s'agit de: P. halophilus renommées Tetragenococcus halophilus, elle forme actuellement un genre séparé appelé: Tetragenococcus; et P. dextrinicus qui produit le L(+)-acide lactique à partir de glucose, le CO2 à partir de gluconate comme elle peut hydrolyser l'amidon, cette espèce peut représenter un nouveau genre **(De Vos et al., 2009).**

3.5. Streptococcus :

Ce genre est associé à de nombreuses maladies humaines et animales et la seule espèce qui est adaptée à l'environnement laitier est Streptococcus thermophilus **(Chandan et al., 2008).** Cette espèce rassemble des cellules ovoïdes ou sphériques, d'un diamètre variant de 0.7 à 1µm, arrangées en paires à longues chaines, aéro anérobie facultatives. Elles croissent à 45°C mais non à 15°C et la plupart des souches survivent après un chauffage à 65°C pendant 30 minutes. Elles ne peuvent pas résister à une concentration de 0.1% de bleu de méthylène ni à un pH de 9.6. Leur croissance est variable à 2% d'NaCl mais aucune souche ne peut se développer à 3% **(De Vos et al., 2009).**

Toutes les souches de S. thermophilus exigent les vitamines de groupe B et quelques acides aminés pour leur développement. Elles sont incapables d'hydrolyser l'esculine, les caséines, la gélatine, l'hippurate et l'arginine. Certaines souches peuvent hydrolyser l'amidon. Elles produisent de l'acétoïne (réaction de Voges-Proskauer), la β. galactosidase et la leucine arylamidase. Mais elles ne peuvent pas synthétiser plusieurs enzymes comme l'uréase, DNase, α. galactosidase, etc. **(De Vos et al., 2009).** (Figure 05)



Figure 5 : Streptococcus thermophilus

3.6. Enterococcus :

Il appartient à la famille des Enterococcaceae qui renferme trois autres genres (Melissococcus, Tetragenococcus et Vagococcus). Enterococcus est séparé du genre Streptococcus sur la base des résultats d'hybridation (ADN-ADN et ADN-ADNr) qui sont confirmés par les analyses phylogénétiques de l'ARN 16S **(De Vos et al., 2009)**. Plusieurs espèces font partie de la flore intestinale des mammifères et des oiseaux; d'autres sont isolées à partir des plantes, des eaux et des denrées alimentaires (lait, viande…). Il s'avère que leur présence dans l'eau résulte d'une contamination fécale.

Les enterococci croissent dans une variété de milieux de culture riches (Todd-Hweitt, trypticase soja, BHI…). Néanmoins, il apparait que l'MRS défavorise la croissance de quelques espèces.

Leurs colonies sont toujours circulaires, régulières et lisses ayant un diamètre qui peut atteindre 5mm. Certaines espèces produisent un pigment caroténoïde jaune sur un milieu solide.

Les cellules des enterococci sont ovoïdes, isolées, en paires ou en courtes chaines. La présence des flagelles rudimentaires rendent certaines espèces mobiles **(De Vos et al., 2009).**

Elles sont toutes dépourvues de la catalase, mais certaines espèces révèlent une pseudocatalase lorsqu'elles sont cultivées sur les milieux de culture contenant l'hème. La température optimale de croissance de la plupart des espèces varie de 35°C à 37°C, plusieurs sont capables de croître à 42°C et même à 45°C mais lentement à 10°C. De plus, les enterococci sont très résistantes au séchage.

Toutes les espèces sont des homofermentaires, elles fermentent le glucose en L(+) Ac lactique via la voie d'Embden-Meyrehof. En présence d'oxygène, le glucose est métabolisé en acide acétique, acétoïne et CO2. En cas de déficience en nutriments, le pyruvate est converti en éthanol et en acide acétique. Elles peuvent avoir de l'énergie en dégradant les acides aminés (arginine, tyrosine, serine, agmatine, phénylalanine et canavine).

Il est à noter que certaines caractéristiques traditionnellement considérées d'être typiques pour le genre, tels que: la résistance à 6.5% d'NaCl, à pH: 9.6, la croissance à 10°C et à 45°C, ne peuvent pas être appliquées pour plusieurs espèces décrites récemment qui ne possèdent pas une ou plus de ces caractéristiques **(De Vos et al., 2009; Salminen et al., 2004)**.(Figure 06)



Figure 6 : Enterococcus faecalis

4. l'utilisation des bactéries lactiques au niveau des produits laitiers :

Les bactéries lactiques sont à la base de la fabrication des fromages, des yaourts, des laits fermentés et du kéfir.

Selon les types de fromages considérés, la coagulation du lait est obtenue par les actions conjuguées des enzymes coagulantes et des bactéries lactiques (iactocoques essentiellement et/ou leuconostocs pour les fromages à pâte molle ou à pâte pressée; streptocoques thermophiles et lactobacilles thermophiles pour les fromages à pâte pressée cuite). Le rôle principal de ces bactéries est l'abaissement du pH du lait ou des caillés, selon des cinétiques spécifiques à chaque fabrication. La production d'acide lactique, responsable de la chute du pH, se fait aux dépens du lactose du lait et du cailté.

Il existe dans le monde une très grande variété de types de yaourts et de laits fermentés obtenus à partir de lait de vache, de brebis, de chèvre, de jument, de bufflesse, d'ânesse ou de chamelle.

On utilisera selon les cas, les streptocoques thermophiles, les lactobacilles thermophiles, les lactocoques, les leuconostocs et les lactobacilles mésophiles, bactéries lactiques associées à des levures (dans le cas du kéfir) ou il des bifidobactéries.

Le yaourt constitue un bon exemple de produit de grande consommation qui a connu un essor industriel sans precédent au cours des trois dernières décennies dans le monde. La fermentation lactique est due essentiellement à la culture associée de deux espèces Streptococcus thermophilus et Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus. La maîtrise de la croissance et des métabolismes de cette culture mixte qu'est le yaourt a une conséquence dans la régularité des qualités finales.

Cette maîtrise dépend des interactions (stimulation ou inhibition) entre les espèces qui perturbent la stabilité des équilibres bactériens. La dégradation du lactose, sucre du lait, est le fait marquant de la transformation du lait en yaourt.

L'activité de S. thermophilus conduit il de l'acide lactique de forme L(+) tandis que Lb. bulgaricus conduit àl'acide lactique D(-). Comme ces bactéries métabolisent plutôt la moitié du glucose du lactose, le galactose est rejeté hors de la cellule et s'accumule dans le yaourt.

Le pH atteint variant entre 4,35 et 4,50, le complexe calcium-caséinesphosphate est déstabilisé car les caséines sont proches de leur point iso-électrique (pH= 4,6).

Ceci entraîne la prise en masse du produit et la formation d'un coagulum assez fragile.

On attribue classiquement un rôle de premier plan à l'acétaldéhyde dans la perception de l'arôme du yaourt, encore qu'un certain nombre d'autres produits aromatiques figurent parmi les nombreux composés volatils que révèlent les techniques d'analyse fine. Un rapport acétaldéhyde/acétone voisin de 2,8 est par exemple considéré comme optimum. La voie importante de production d'acétaldéhyde par les bactéries thermophiles du yaourt ne provient pas du métabolisme du lactose mais passe par la dégradation de la thréonine par une thréoninealdolase; les produits de la réaction étant l'acétaldéhyde et la glycine Selon les conditions de culture, on attribue une activité thréonine-aldolase plus importante aux lactobacilles qu'aux streptocoques **(Daly et Davis, 1998 ; Caplice et Fitzgerald, 1999).**

Pour la fabrication des yaourts brassés, on constate que l'onctuosité du produit pourrait être améliorée en utilisant des souches particulières produisant un épaississement du lait supérieur à celui obtenu par la simple prise en gel du lait sous l'effet de l'acidification. Ces souches épaississantes sont intéressantes car elles améliorent la texture du yaourt. Elles évitent ainsi au cours des différentes étapes de fabrication du yaourt brassé et de son stockage, une séparation du lacto sérum et des caséines coagulées. Comme elles augmentent l'onctuosité du produit, elles diminuent les quantités de poudre de lait additionnée, ce qui permet de réaliser des économies appréciables au niveau industriel et de structurer les produits par une méthode naturelle car dans la plupart des pays, l'utilisation d'agents texturants exogènes est interdite dans les yaourts. Actuellement il est démontré que des polysaccharides interviennent dans la création de la viscosité. Chez Lb. bulgaricus, les filaments de polysaccharides lient les cellules les unes aux autres structurant la micro~colonie. Ils connectent aussi les cellules bactériennes qui les produisent à la matrice du yaourt constituée des caséines précipitées par l'acidification.

Le kéfir lacté fabriqué avec des «grains» stabilisés contient une microflore variée car les bactéries lactiques mésophiles et thermophiles sont associées dans la masse de polysaccharide du grain avec des bactéries acétiques et des levures. Ce sont les lactobacilles hétérofermentaires (Lh. brevis et Lb. kefir) qui sont les plus représentés mais les kéfirs contiennent aussi des lactobacilles homofermentaires thermophiles (Lb. acidophilus, Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus) ou mésophiles (Lb. plantarum, Lb. casei) et des leuconostocs.

5.Importance des Bactéries Lactiques

3.1 Importance en alimentation

La fermentation traditionnelle est un processus alimentaire dans lequel les bactéries utilisent les sources de carbone comme substrat pour se propager. Ce type de fermentation est connu depuis bien longtemps, notamment dans les pays de l'Afrique où beaucoup d'aliments traditionnels ne se conservaient que de cette manière. Dans le nord-africain comme dans le sud, une importante consommation de produits laitiers fermentés (jben, lben, smen, raib, zabadi, sethemi, Kule, naoto, Susac, Amasi…), de végétaux et céréales (olives de table, citron, figues, concombre, hrissa, amahewu, ancwancwa, togwa …), ou encore de viande et de poisson (gueddid, khlii, lanhouin…) est enregistrée **(Chelule *et al.*, 2010 ; Benkerroum, 2013)**. L'importance des bactéries lactiques connaît une croissance industrielle, notamment

pour le genre *Lactobacillus* qui est largement utilisé dans les fermentations alimentaires (laiteries, fromagerie…).

Les bactéries lactiques sont aussi impliquée dans la biopreservation de nombreux produit alimentaires fermentés réservées à l'alimentation humaine qu'à l'alimentation animale (vins, café, cacao, levains, ensilage …..) **(Matamoros,2008)**

3.2Importance sur la Santé

Présentes dans de nombreux produits alimentaires, les bactéries lactiques colonisent l'intestin de la plupart des animaux, jouant un effet sur leur système immunitaire, souvent, en tant que probiotique pour améliorer certaines fonctions biologiques de leur hôte **(Perdigon *et al.*, 2001).** Les bactéries lactiques interviennent dans le contrôle des infections intestinales comme la prévention des diarrhées par l'introduction d'une nouvelle flore intestinale qui agit sur les entérobactéries responsables de ces désordres intestinaux **(Herich et Levkut, 2002).**

Elles sont aussi connues pour la production des agents antimicrobiens évitant ainsi l'usage des antibiotiques **(Nicolas *et al.*, 2007).** Certaines études ont aussi démontré l'implication de bactéries lactiques dans l'amélioration de la digestion du lactose **(Robin et Rouchy, 2001)**, la régulation du taux de cholestérol dans le sang ainsi que le contrôle de quelques types de cancer en agissant comme anti tumoral **(Gilliland, 1990 ; Perdigon *et al.*, 2001 ; Chelule *et al.*,2010).**

Chapitre III :

L'activité enzymatique

1. Les enzymes de lait :

Le lait à l'état natif présente un trés grand nombre d'enzymes, plus de 60 ont été isolées ou identifiées et l'activité de nombreux compossant a été détecté .

Parmi les systemes presents, deux sont particuliérement important à considéré, la lipase et la plasmine ,bien que l'intervenant d'autre enzymes puisse être totalement exclue**(André et al, 1997).**

1.1 la plasmine:

De nombreux études ont démontrés la présence d'une activité protéolytique native dans le lait, elle est une pour l'essentiel à une protéase alcaline, la plasmine(E,C,3,4,21,7).

Une enzyme present sans le sérum sanguin, responsable de l'hydrolyse des caillots de fibrine. Décrit les propreité et le role de cette protéase dans le lait et les produits laitiers.

Le lait contiendrait un réalité l'ensemble du „systeme plasmine" c-à-d la plasmine et son précurseur, le plasminogéne mais aussi les inhibiteurs de la plasmine, des activateurs du plasminogene et des inhibiteur des activateur du plasminogéne**(andré et al,1997) .**

1.2 la lipoprotéine lipase:

le principal lipase de lait est une lipoprotéine lipase(LPL)(E,C,3,1,1,34) de masse moleculaire 55000 Da, qui est secrété par les elles mammmaires en grand quantété; elle parmet de prélevement des lipides sanguins pour la synthese d'une partie des triglycérides du lait, son pH optimale d'action est de 8-9 à 37°c ; à pH6 , son acto est nulle dans le lait , En tant que LPL elle n'agit que faiblement sur les triglycéride à lang chaine en absence de cofacteurs protéiques et elle est inhibée par des concentration de NaCl 0,5-1M .

C'est un enzyme thermolabiles dont le temps de réduction décimale est de 165 à 70°c , elle est détruite en 105 à 85°c ,mais un chouffage de 105 à 78°c suffit à stoper son action dans le lait .

Elle est inactivée en quelques heures à 37°c et en quelques jours à 5-15°c le refroidissement du lait prolonge donc son action **(André et al, 1997).**

1.3 Autres enzymes de lait :

- la phosphatalase acide
- la phosphatalase alcalin
- la protéase acide**(andré et al,1997).**

2. L'Activité protéolytique :

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

Le système protéolytique des bactéries lactiques est composée de protéases associées à la paroi cellulaire, qui catalysent l'hydrolyse de protéines en peptides contenant de 7 à 16 résidus aminés, ces peptides sont ensuite dégradés par des endopeptidases ou excopeptidases en unités transportables d'acides aminés et de petits peptides **(LAW et HAANDRIKMAN,1997).**

Des études comparatives effectuées sur la protéolyse de cheddar fait avec ou sans ferments lactiques ont démontré l'importance de ces bactéries pour la libération de petites peptides et d'acides aminés libres durant la maturation fromagère **(LYNCH et al,2007 ;LANE et Fox ,1996 ;FARKYE et al 1995).**

Les lactobacillus présentent généralement une activité protéolytique plus prononcée que les lactocoque **(DONKOR et al ,2007 ;Mommet et al,2007 ROUDJ et al,2009).**

2.1. Intérêt technologique de la protéolyse :

Durant la fabrication de fromage, la protéolyse de la caséine joue un rôle central, Les acides aminés résultants sont les principaux précurseurs d'arôme comme les alcools, aldéhydes, acides, esters et les composés soufrés **(Smit et al., 2005)**. L'accumulation de peptides hydrophobes comme ceux riche en résidus proline, est un sérieux problème pour l'industrie fromagère car ce sont les principales causes de l'amertume du produit **(Smukowski et al., 2003)**.

2.2. Processus de l'autolyse :

Chez les bactéries lactiques, le phénomène d'autolyse présente un intérêt particulier quant à son utilisation potentielle dans la fabrication du fromage.

La lyse peut être mise en œuvre soit par une autolyse codée par le matériel génétique, soit par une infection par des bactériophages **(Huard et al.,2003)**. Les deux processus ont en commun, le fait qu'ils requièrent les enzymes hydrolytiques (amidases et muramidases) qui

atteignent la paroi de peptidoglycane soit par excrétion directe, soit par la création de pores via la holine de phage **(Buist et al.,1995; Huard et al., 2003).**

2.2.1.Les facteurs qui influencent l'autolyse :

L'autolyse peut se déclencher sous l'influence de plusieurs facteurs qui agissent principalement sur l'activité des enzymes autolytiques.

- **La température** :

C'est l'un des facteurs les plus étudiés, en effet plusieurs auteurs s'accordent sur le fait que, plus la température est élevée plus l'autolyse est importante et cela concorde avec les lois de la cinétique enzymatique. Généralement la température optimale pour l'autolyse se situe autour de la température optimale de croissance des bactéries **(Dako et al., 1995)**

- **Le pH**

L'optimum de pH pour l'activité autolytique varie d'une espèce à l'autre et se situe entre 5.5 et 8 **(Kang, 1998).**

- **La concentration en sel**

Une augmentation du taux d'autolyse a été démontrée lors de l'exposition des cellules à des milieux fortement hyperosmotiques ou hypoosmotiques. La force ionique du milieu agit sur la conformation spatiale de la paroi en provoquant une contraction ou une dilatation **(Kang, 1998)**

Chapitre IV :

L'activité antimicrobienne

1.Le pouvoir antibactérien :

Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques peuvent être associées à de nombreux éléments. Elles résultent de l'effet combine de différents facteurs biologiques provenant de leurs activités métaboliques **(Hadj Abderrahman, 2015)**

Parmi ces substances qui ont un effet antibactérien :

- Les acides organiques : (acide lactique, acétique et propionique) exercent par leur nature la diminution du pH qui a un important effet antimicrobien. En effet, l'acide acétique possède une forte activité antibactérienne et un large spectre d'inhibition vis-à-vis des bactéries, des levures et des moisissures.
- Le dioxyde de carbone : joue aussi un double rôle antimicrobien : par sa propre activité antibactérienne et par la création de conditions d'anaerobiose.
- Le peroxyde d'hydrogène (H2O2) : provoque parfois une auto inhibition des bactéries qui le produisent mais aussi inhibe la croissance d'autres microorganismes qui se trouve dans le milieu.
- Les bactériocines : sont des substances de nature protéique produites par certaines bactéries lactiques, exercent une action antibactérienne contre des souches distinctes des souches productrices et contre certains pathogènes, jouant ainsi un rôle primordial dans la bioconservation des aliments **(Ammar et Irid, 2009).**

2. Phénomène d'antagonisme :

Le phénomène d'antagonisme est considère comme des interactions néfastes entre les microorganismes, on parlera alors de phénomène d'inhibitions **(Djidel, 2007 ; Tabak et Bensoltane, 2012).**

L'effet antagoniste des bactéries lactiques est principalement lié à la compétition pour les sources nutritionnelles, cet effet se traduit par la production de différentes substances de bas poids moléculaire tel que le diacétyle, dioxyde de Carbonne, le peroxyde d'hydrogène, des bacteriocines, etc.…; et les différents acides organiques qui limitent la croissance de certains germes pathogènes **(Kermanshahi et Qamsari, 2015).**

3. Production de métabolites inhibiteurs :

Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques peuvent être associées à de nombreux éléments, elles résultent de l'effet combine de différents facteurs biologiques provenant de leurs activités métaboliques **(Smaoui, 2010).**

3.1. Production de peroxyde d'hydrogène (H2O2) :

Le peroxyde d'hydrogène est reconnu depuis longtemps comme un agent majeur de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques en particulier celles des lactobacilles. La production de H2O2 peut avoir lieu selon plusieurs modes, mettant en jeu des oxydases et probablement une super oxyde-dismutase (**Maizaini, 2001).**

Il est prouvé que le H2O2 peut s'accumuler et devenir inhibiteur pour quelques microorganismes. Cette accumulation résulte d'un déséquilibre entre les moyens de synthèse et de dégradation. Le peroxyde d'hydrogene peut aussi activer le système lactoperoxydase avec la formation de l'hypothiocyanate et d'autres antimicrobien. L'ion hypothiocyanate est un très puissant antimicrobien qui agit aussi bien sur les bactéries Gram positive que sur les bactéries Gram négative **(Maghnia, 2011).**

3.2. Dioxyde de carbone (CO2) :

Le CO2 est principalement formé pendant la fermentation des hexoses suivant la voie hétérofermentaire. Le mécanisme précis de son action antimicrobienne est toujours inconnu.
Cependant, le CO2 peut jouer un rôle en créant une atmosphère anaérobique qui empêche les décarboxylations enzymatiques et l'accumulation du CO2 dans la bicouche lipidique de la membrane peut causer un disfonctionnement dans la perméabilité **(Ouradi et arouche, 2007; Leonard, 2013)**

3.3. Diacétyle

Le diacétyle est un produit du métabolisme du citrate, c'est un inhibiteur actif contre de nombreux microorganismes, bactéries ou moisissures. Son action inhibitrice est accrue en milieux acides. Il est synthétisé par différents genres de bactéries lactiques, les concentrations necessaires a l'obtention d'une inhibition sont de l'ordre de 100 ppm.
Le diacétyle inhibe la croissance bactérienne en interférant probablement avec les mecanismes gouvernant l'utilisation de l'arginine **(Baliarda, 2003** ; **Dortu, 2008 ; Belarbi, 2011).**

3.4. Bactériocine :

Les bactéries lactiques produisent des bactériocines avec des spectres d'inhibition plutôt larges **(Gálvez *et al.*, 2007).**

Les bactériocines produites par ces bactéries sont communément appelées peptides antimicrobiens qui présentent habituellement un degré élevé de spécificité sur la cible **(Woraprayote *et al*., 2016*).*** Ce sont des peptides synthétisés par voie ribosomiale ou des protéines de faible poids moléculaire, ayant une activité inhibitrice dirigée contre les bactéries proches de la souche productrice. Dans tous les cas, la cellule productrice est immunisée visà-vis de l'action de sa propre bacteriocine **(Dortu et Thonart, 2009).** L'activite antimicrobienne des bactériocines a un effet soit bactéricide, provoquant la mort de la bactérie cible, soit bactériostatique inhibant la croissance bactérienne sur d'autres espèces et genres.

Mais l'activité est généralement limitée aux autres Gram-positifs; les bactériocines les plus étudiées sont celles produites par les bactéries lactiques connues pour leur rôle dans la bonne conservation des aliments**.**

La biosynthèse des bactériocines implique le plus souvent des groupes de gènes ou clusters comportant une ou plusieurs unités de transcription. Il existe une appellation génotypique spécifique pour chaque bactériocine, par exemple *nis* pour le cluster de gènes impliqué dans la biosynthèse de la nisine et *mrs* pour celui impliqué dans la biosynthèse de la mersacidine **(Corr, 2007 ; Makhloufi, 2011).**

3.5.Classification des bactériocines :

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont réparties en quatre classes sur la base de leur poids moléculaire, thermostabilité, sensibilité enzymatique, présence d'acides aminés post-traductionnellement modifiés et mode d'action. Cela est proposé par Classe I : Les lantibiotiques Klaenhammer (1993) **(Madi, 2010).**

- **Classe I : Les lantibiotiques :**

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

- **Classe II : Les peptides non modifié :**

Se sont des Peptides de taille inférieure à 10 kDa, thermostable, ne contenant pas d'acides aminés modifiés.

- **Classe III : Les protéines de haut poids moléculaire :**

Protéines de taille supérieure à 30 kDa et thermolabiles. La structure et le mode d'action de ces bactériocines diffère complètement des autres bactériocines produites par les bactéries lactiques. Cette classe ne contient que quatre bactériocines : l'helveticine J produite par Lactobacillus helveticus A, l'enterolysine A produite par Enterococcus faecium, la zoocine A produite par Streptococcus milleri.

- **Classe IV : Les peptides cycliques :**

Les bactériocines de cette classe sont des peptides cycliques synthétisés par voie ribosomale. Cette appellation est lié au fait que ces peptides sont modifié postetraductionnellement. Actuellement, peu de bactériocines ont été identifiées dans cette classe. L'une des plus étudiées est l'entérocine AS-48 produite par Enterococcus faecalis. Cette dernière est une bactériocine qui a une stabilité plutôt élevée due à sa forme cyclique. **(O'Sullivan et al., 2002; Dortu et Thonart, 2009; Dib, 2015)**

3.6 Mécanisme d'action des bactériocines :

Le mode d'action le plus connu et le plus répandu chez les bactériocines des bactéries lactiques implique une action visant de barrière de la membrane **(Izquierdo, 2009).**

Les bactériocines sont cationiques interagissent avec les molécules anioniques de la surface de la cellule cible **(Bastos et al., 2015)**, ils vont s'adsorber sur la membrane cytoplasmique et la perméabiliser par formation des pores conduisant à la mort de cellule cible ainsi la perméabilité membranaire provoquant un déséquilibre ionique et une fuite de phosphate inorganique et d'autre part une perte de force proton motrice qui implique la dissipation totale de potentiel transmembranaire et de gradient de pH. Cette force proton motrice joue un rôle centrale dans la synthèse ATP, le transport actif et la mobilité bactérienne **(Hammi, 2016).** Ces bactériocines montrent une forte activité spécifique contre les bactéries à Gram-positif dans les plages de concentrations nanomolaires **(Yoneyama et al., 2009).**

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont généralement actives à faible concentration contre des bactéries phylogénétiquement proches.

Les études portant sur des bactériocines sont toujours en cours afin de mieux comprendre leur structure et leurs modes d'actions pour élargir leurs applications **(makhloufi, 2011).**

3.7. Les applications des bactériocines en agroalimentaire :

La bioconservation des aliments fait l'objet depuis 40 ans de nombreuses études. Elle consiste en une augmentation de la durée de vie et une amélioration de la sécurité sanitaire des produits alimentaires, en utilisant des microorganismes et/ ou leurs métabolites **(Ross et al., 2002, Stiles, 1996).**

L'HACCP (Hazard Analysis et Critical Control Points), 'analyse des dangers et des points critiques pour leur maîtrise', est un système de gestion qui identifie, évalue et maîtrise les dangers significatifs au regard de la sécurité des aliments. Malgré la mise en œuvre de technologies modernes et de concepts de sécurité sanitaires, l'HACCP n'est toujours pas arrivée à contrôler l'émergence de nouveaux pathogènes colonisant les denrées. Dans ce contexte, les bactéries lactiques et/ ou leurs métabolites utilisées depuis des millénaires d'une façon empirique par de nombreuses populations, peuvent contribuer à la conservation des aliments **(Ross et al., 2002)** (Tableau 2.). C'est grâce aux propriétés antimicrobiennes de métabolites qu'ils synthétisent, tels que l'éthanol, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyle **(Atrih et Foster, 2001a)**, les composés antifongiques **(Corsetti et al., 1998)**, les acides phényl-lactiques **(Lavermicocca et al., 2000)**, les antibiotiques comme la reutéricycline **(Höltzel et al., 2000)** et les bactériocines, que les bactéries lactiques sont reconnues comme de bons agents de conservation des produits alimentaires **(Abee et al., 1995, Klaenhammer, 1988).** Afin de diminuer l'utilisation des additifs chimiques dans l'alimentation et d'obtenir des aliments prêts à la consommation et respectant les règles de la sécurité sanitaire, l'industrie agroalimentaire en Europe s'intéresse à l'utilisation des bactériocines comme bio-conservateurs **(Robertson et al., 2004).**

L'absence de toxicité pour les cellules eucaryotes et la perte d'activité en présence des protéases présentes dans le tube digestif présentent des pripriétés qui pourraient placer les bactériocines parmi les substances sans danger pour l'Homme. Elles doivent cependant, pour le moment, être considérées comme un moyen de conservation complémentaire à ceux déjà existants **(Deegan et al., 2006).** Pour améliorer leur conservation, les aliments sont soit supplémentés en bactéries productrices, la bactériocine étant produite in situ, soit en bactériocine ex situ.

Tableau 2 : Exemples d'applications des bactériocines comme conservateurs alimentaires **(Gálvez et al., 2011)**

Applications	Bactériocines		Classe	Effets	Références
Dans les produits laitiers	Nisine		I	Prévenir la prolifération d'endospores par Cl. botulinum et la contamination par Li. monocytogenes dans le fromage	(Wirjantoro et al., 2001)
	Lacticine 3147		I	Inhibition de Li. monocytogenes dans les yaourts naturels et le fromage écrémé	(Morgan et al., 2001)
	Pédiocine PA-1/ AcH		IIa	Inhibition de Li. monocytogenes dans les fromages blancs, crèmes et sauces à base de fromage	(Rodríguez et al., 2002)
	Entérocine AS-48		IIc	Inhibition rapide de Li. monocytogenes et inhibition lente de Sta. aureus dans le lait écrémé	(Ananou et al., 2010)
Dans les viandes et les volailles	Nisine	En combinaison avec des acides organiques, lysozyme, chélateurs	I	Décontamination des surfaces de préparations de viandes crues	(Thomas et al., 2000)
		Sous forme de film, activée par de l'EDTA	I	Inhibition des entérobactéries et des espèces appartenant à Carnobacterium dans les tranches de bœuf pendant la réfrigération	(Ercolini et al., 2010)
		En combinaison avec HPH	I	Inhibition d'E. coli et des Staphylococcus sp. dans le jambon cuit	(Garriga et al., 2002)
	Pédiocines		IIa	Inhibition de Li. monocytogenes dans les viandes crues	(Rodríguez et al., 2002)
Dans les poissons	Nisine	Traitée à la chaleur (65°C)	I	Inhibition totale de Li. innocua dans le caviar d'esturgeon ou de saumon (ikura)	(Al-Holy et al., 2004)
		Immobilisée à des films plastiques	I	Inhibition de Li. monocytogenes dans le saumon fumé pendant la réfrigération	(Neetoo et al., 2008)

- **Applications :**

La nisine **(Rogers, 1928)** est aujourd'hui la seule bactériocine légalement approuvée comme additif alimentaire (additif numéro E234) dans 80 pays. Elle a été évaluée comme sans danger pour l'Homme par l'organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (ONUAA) et l'Organisation Mondiale pour la Santé publique (OMS) en 1969 ainsi que par les autorités sanitaires Européennes en 1983. La nisine est commercialisée sous une forme semi-purifiée à l'état lyophilisé sous le nom de Nisaplin^{TM} (Danisco, France) (Figure 3) et de Chrisin^{TM} (Christen Hansen, Danemark)



Figure 7 : e I. 43. Nisaplin^{TM}

La nisine est souvent utilisée pour le contrôle de la prolifération de pathogènes tels que Clostridium botulinum (Cl. botulinum), Cl. tyrobutyricum et Li. monocytogenes dans les produits laitiers **(Davies et Delves-Broughton, 1999)**. Elle est également utilisée dans d'autres produits alimentaires pasteurisés comme les crèmes glacées, les desserts sucrés à base de lait, les laits aromatisés et de jaune d'oeufs **(Thomas et al., 2000).** De plus, l'effet antimicrobien de la nisine se trouve décuplé lorsqu'elle est associée à d'autres agents antimicrobiens comme le monolaurine, le système de lactoperoxidase (SLP), le lysozyme ou la reutérine **(Gálvez et al., 2007)** ou à des hautes pressions hydrostatiques (HPH) **(Black et al., 2005)**.

D'autres bactériocines ont, depuis, été commercialisés sous la forme d'un concentré obtenu après fermentation par la souche productrice et atomisation d'un substrat alimentaire tel que le lait, par exemple. Considéré comme un ingrédient fermenté, ce type de préparation contiendra d'autres métabolites microbiens tels que l'acide lactique **(Dortu et Thonart, 2009).** Parmi ces produits, figure la pédiocine PA-1/ AcH, une bactériocine de classe IIa

commercialisée sous le nom d'AltaTM 2341 (Kerry Bioscience, Carrigaline, Co. Cork, Ireland) **(Deegan et al., 2006).** Elle est utilisée pour prévenir la contamination des fromages blancs, les crèmes fromagères et les produits carnés par Li. monocytogenes **(Rodríguez et al., 2002).** Des tests réalisés in vitro sur la lacticine 3147, un lantibiotique, ont montré qu'elle présentait un effet antimicrobien contre Li. monocytogenes et Sta. aureus dans les laits pour enfants et dans les fromages blancs **(Deegan et al., 2006, Morency et al., 2001, O'Sullivan et al., 2002, Ross et al., 1999).** Une autre préparation commerciale, Microgard^{TM} (Danisco,France) renferme des propiocines produites par Propionibacterium freudenreichii spp. shermanii **(Weber et Broich, 1986).** Elle est préparée à partir de lait écremé (Microgard^{TM} 100) ou de dextrose (Microgard^{TM} 200) fermentés et souvent utilisée comme additif alimentaire dans les fromages blancs et yaourts. Récemment, l'entérocine AS-48, une bactériocine de classe IIc, a montré des résultats prometteurs quant à l'inhibition de Salmonella enterica dans le lait écrémé **(Martinez Viedma et al., 2008)**. De plus, l'addition d'entérocine AS-48 sous forme lyophilisée à du lait écrémé inhibe la prolifération de Li. monocyotgenes et réduit progressivement le nombre des souches de Sta. aureus vivantes **(Ananou et al., 2010).** D'autres bactériocines produites par des bactéries autres que les bactéries lactiques sont également utilisées comme additif alimentaires. En effet, la variacine produite par Kocuria varians inhibe la prolifération de Bacillus cereus dans des desserts au chocolat et à la vanille **(O'Mahony et al., 2001).**

Chapitre V :

L'activité probiotique

1.Les probiotiques :

1.1.Historique et définition :

Il y a un siècle, Elie Metchnikoff (microbiologiste russe, élève de Louis Pasteur et lauréat du prix Nobel) émit l'hypothèse que la bonne santé et la longévité de certaines populations de l'Europe de l'est seraient due à leur consommation quotidienne de laits fermentés **(Sanders., 2000).** Par la suite, plusieurs travaux se sont développés selon le concept que l'ingestion de microorganismes peut améliorer la santé de l'hôte, et ce fut Parker qui proposa pour la première fois **en 1974** le terme « probiotique » pour désigner les microorganismes et les substances qui contribuent au maintien de l'équilibre de la microflore intestinale **(Vasiljevic et Shah, 2008).**

Plus tard, **Fuller (1991)** a redéfini les probiotiques de la façon suivante : « préparations microbiennes vivantes, utilisées comme additif alimentaire, ayant une action bénéfique sur hôte en améliorant la digestion et l'hygiène intestinale» et depuis, plusieurs définitions des probiotiques ont succédé sur la base des nouvelles connaissances de leurs modes d'actions et de leurs effets bénéfiques sur la santé de l'hôte **(Millette et *al*, 2008).** Actuellement, la définition la plus utilisée a était validée par l'Organisation des Nations Unies pour l'Agriculture et l'Alimentation (FAO) et par l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS) et qui ont défini les probiotiques comme étant « des microorganismes vivants qui, administrés en quantités adéquates, sont bénéfiques pour la santé de l'hôte» **(Salminen *et al.*, 1998; FAO/OMS, 2001).**

1.2.Les principaux micro-organismes probiotiques :

Un probiotique appartient à la flore commensale transitoire, il ne doit pas être pathogène ou carcinogène, il doit survivre dans l'aliment et le tractus intestinal. Parmi les microorganismes utilisés comme probiotiques chez l'Homme, les bactéries lactiques, hôtes naturels de la microflore intestinale de l'Homme (microbiote), sont souvent retrouvés. Les probiotiques les plus étudiés appartiennent aux genres : *Bifidobacterium, Lactobacillus et Saccharomyces.* **(Millette et *al*, 2008).**

Tableau 3 : Principales espèces utilisées comme probiotiques **(Robinson, 2002).**

Lactobacilli	Bifidobacteria	Enterococci	Autres
Lb. acidophilus	*B. bifidum*	*E. faecium*	*Saccharomyces*
Lb. plantarum	*B. infantis*	*E. faecalis*	*boulardii*
Lb. casei	*B. adolescentis*		*Lactococcus lactis*
Lb. rhamnosus	*B. longum*		subsp. *cremoris*
Lb. delbrueckii	*B. breve*		*Lactococcus lactis*
subsp. *bulgaricus*	*B. lactis*		subsp. *lactis*
Lb. fermentum			*Leuconostoc*
Lb. johnsonii			*mesenteroides*
Lb. gasseri			*Propionibacterium*
Lb. salivarius			*freudenreichii*
Lb. reuteri			*Pediococcus*
			acidilactis
			Streptococcus
			salivarius subsp.
			thermophilus
			Escherichia coli

1.3. Rôle des Probiotiques

Désignés pour la plupart, par les bactéries lactiques, les probiotiques ont prouvé durant ces dernières décennies, leur efficacité sur la santé humaine et animale. Plusieurs chercheurs en mis en évidence l'amélioration de la qualité de vie de malades souffrant de diverses pathologies bénignes ou même malignes **(Quinto *et al.*, 2014).**

1.3.1. Sur la santé humaine

Par leur pouvoir acidifiant, la production de peroxyde d'hydrogène en milieu humide, la sécrétion de bactériocines, ou par la capacité de certains d'entre eux à déconjuguer les sels biliaires ; les probiotiques empêchent ou inhibent le développement de nombreux pathogènes tels que :

- les rotavirus : impliqués dans les diarrhées aigües,
- le virus de la fièvre aphteuse ;
- certains virus de la poliomyélite ;
- certains champignons comme le *Candida Albicans* ;

• ou encore certaines bactéries comme *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Helicobacter pylor*i, *Clostridium perfringens, Clostridium butyricum,Pseudomonas spp., Salmonella*, causant diverses infections.

L'adhérence des probiotiques aux villosités de l'épithélium, ou tout simplement leur consommation des nutriments nécessaire au développement des souches pathogènes, peut aussi s'avérer un bon mécanisme d'inhibition, concurrençant et empêchant la fixation de certains entéropathogènes **(Robin et Rouchy, 2001 ; Quinto *et al.*, 2014).**

Les probiotiques peuvent aussi agir en tant qu'antitoxique, en réduisant l'absorption des substances toxiques (ammoniac, amines et indoles) et en diminuant les biotransformations des sels biliaires et des acides gras en produits toxiques. Ils auraient également la capacité de produire des métabolites susceptibles de neutraliser *in situ* certaines toxines bactériennes **(Robin et Rouchy, 2001).** La lactase produite par certaines probiotiques, réglerait les troubles liés à digestion du lactose chez les patients souffrant d'intolérance à ce glucide. Les probiotiques facilitent aussi la digestion des glucides complexes en stimulant l'activité enzymatique des microorganismes endogènes, permettant ainsi une meilleure assimilation des aliments. De même, ils pourraientt stimuler l'activité invertase et maltase des cellules épithéliales du tractus digestif **(Robin et Rouchy, 2001).** De plus, les bactéries lactiques probiotiques seraient impliquées dans la biodisponibilité de certains minéraux (calcium, fer, zinc, manganèse, cuivre et phosphore), dans la synthèse des vitamines B (thiamine (B1), riboflavine (B2), niacine (B3), l'acide pantothénique (B5), pyridoxine (B6), l'acide folique (B9) et la cyanocobalamine (B12)…) et de nombreux acides aminés (l'alanine, la valine, la thréonine et l'acide aspartique…etc).

Des chercheurs ont aussi mis en évidence l'influence des probiotiques sur le système immunitaire, ils agissent sur la barrière immunitaire aux niveaux muqueux et systémique, en augmentant la capacité des lymphocytes à sécréter diverses cytokines **(Herich et Levkut, 2002; Wells, 2011).** En outre, ces microorganismes aux bienfaits incroyables peuvent agir sur certaines tumeurs malignes : par apoptose ou par la diminution de l'activité d'enzymes, de mutagènes ou des acides biliaires secondaires dans les selles (facteurs impliqués dans la cancérogenèse colique) **(Thirabunyanon *et al.*, 2009 ; Uccello *et al.*, 2012).** Les probiotiques peuvent aussi intervenir sur les cirrhoses en modifiant la circulation sanguine au niveau du système porte hépatique **(Robin et Rouchy, 2001).**

Certains auteurs reportent qu'une biothérapie par certaines bactéries probiotiques (*Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus sakei* NR28A, *Lactobacillus rhamnosus* PL60 et

Lactobacillus plantarum PL62, *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242…), pourrait régler les problèmes cardiovasculaires en jouant sur les facteurs liés à cette pathologie comme : l'obésité, la diminution du taux de cholestérol, l'hypertension ; ou alors peuvent agir comme cardioprotrices en prévenant les blessures ischémiques et les infarctus **(Ettinger *et al.*, 2014).**

Tableau 4 : Effets positifs des probiotiques sur la santé humaine (effets probables ou suspectés) **(Izquierdo Alegre, 2009).**

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

1.3.2 Sur la santé animale

L'introduction des probiotiques dans l'alimentation animale a prouvé une efficacité commune chez de nombreux animaux, dans le maintien et le rééquilibrage de la flore intestinale. Elle a permis, en premier lieu, de pallier les conséquences des traitements

antibiotiques et d'agir sur les diverses infections. Et en deuxième lieu, intervenir sur la performance et la productivité (amélioration de la croissance, augmentation de la production d'oeufs, de viande…).

D'autre part, les probiotiques ont enregistré :

- Chez les porcs : un effet sur l'intégration de l'épithélium intestinal, la hauteur des villosités,l'augmentation de la prolifération des cellules épithéliales ;
- Chez la volaille, une stimulation de la réponse immunitaire ;
- Chez les bovins, une influence positive du métabolisme nutritif, une action sur l'acidose ruminale **(Lettat, 2011),** une stimulation de l'activité des microorganismes (impliqués dans le maintien de la bonne santé) et une stimulation du développement et de l'activité des bactéries cellulolytiques par *Sacharomyces cerevisiae* 'CNMC strain 1-1077' **(Corcionivoschi *et al.*, 2010).**

Résultats de quelques études antécédentes :

- **En Algerie**

Le lait constitue une ressource alimentaire inestimable pour les populations de notre pays qui le consomme à l'état frais ou fermenté. C'est un produit relativement riche en éléments nutritifs de base. Il dispose d'un système protecteur et auto-épuratif naturel qui lui permet de se conserver relativement **(GOUTTAYA *et al.*, 2013).**

La fermentation de nombreux aliments par les bactéries lactiques constitue l'une des techniques de conservation pratiquée par l'homme depuis l'antiquité. Elles agissent par l'intermédiaire de certains de leurs produits de métabolisme, capables d'inhiber le développement de flores bactériennes d'altération et/ou pathogènes **(Meziani Abd 2011).**

En Algérie, comme dans les différents autre pays du monde on retrouve des produits laitiersindigènes dont le mode de fabrication découle de l'héritage culturel de la population.
Ces produits sont issue da la transformation de lait dans le but de prolonger sa durée de conservation.
D'apres les resultats obtenus dans l'etude faite par Messad Nawel nous ont poussé à suggérer que nos produis laitiers traditionnels constituent une source intéressante de nouvelles souches de bactéries lactiques à valoriser et à exploiter. **(MESSAD Nawel 2017).**

Il apparait aussi que la microflore lactique du lait de chamelle du sud-est algerien est constituée de quatre genres :lactococcus,leuconostoc,lactobacillus et enterococcus,toutes les bacteries lactiques ont montré une activité inibitrice à l'encontre des bacteries pouvant alterer le lait et infecter le consommateur **.(BOUGUERA Asmaa 2012).**

Au vus des resultats obtenus ,les trois genres :lactobacillus ,lactococcus,et bifidobactérium présentent un grand intérêt pour lindustrie laitiére **(BENZEHIOURA Hdjer,ZEMAMOUCHE Fadila ,BENSAYOUD Sarah 2009)**

Caractérisation des activités protéolytiques et autolytiques de souches de *Lactococcus lactis* ssp.*cremoris* pour l'élaboration d'un ferment à haute aptitude technologique permet d'évaluer une methode simple et rapide qui pourrait etre utilisée par l'industrie fromagère **(NACIRA Tahiri 2017).**

D'aprés les resultats obtenus par **(BOULOUF amel 2016)** dans sa mémoire déduient que les souches lactobacilles avaient de bonne fonctionnalités technologiques et l'etude invitro des proprietés probiotiques des souches possédant des bonnes aptitudes.

Ainsi que l'objectif réalisée dans le travail fait par **(MERMOURI Lamia 2018)** sur l'étude de l'éffet des souches probiotiques de bacteries lactiques(lactobacillus SPP) isolées de produits fermentés sur la valeur nutritive de forrages conservés par ensilage ,c'est une recherche d'un ferment lactique assurant la préservation de la santé animale pa éffet probiotique .

Dans la region de la wilaya de TIZI-OUZO,une etude interssente faite pour isoler et rechercher de souches de bacteries lactiques productirice de bacteriocine ,les resultats montrent que nos produits fermentés traditionnels constituent une source naturelle pour la recherche et l'isolomentde nouvelles souches de bacteries lactiques seauvage productrices de bacteriocines presentant une activité inhibitrice significative contre les souches microbiennes pathogènes **(Bariz Karim 2011).**

- **Au autres payes :**

✓ Au Maroc la mise en evidence d'une nouvelle bactériocine (maltaricin) isolée est identifiée chez carnobactérium maltaromaticum bactérie isolée à paratir de produits marocaines et de défirentes varietés de fromages francais **(Ikram Hammi 2016)**.

✓ Dans le but d'identifier la flore lactique des fromages caprins fabriqués de façon traditionnelle et de rechercher un effet probiotique une analyse chimique et microbiologique de septs produits collectés de déffirentes régions libanaises a été realisée.

Le Jebneh Darfieh par la présence de leuconostoc misenteroides, montre les caractéristiques les plus interéssantes pour ca tolérence au stress d'acidité et son activité antimicrobienne maximale contre la salmonelle : est pouvait etre utilisée en tant que brobiotique naturelle **(H.Did et al 2010).**

✓ En France certains cherchers disposent de données suffisentes qui confortent l'interet d'utiliser des bacteries lactiques notamment des souches des lactobacilles ,et lactocoques pour le developpement de nouvelles stratégies de vaccination mucosale.**(Luis G.Bermudez-Humaran et Philippe Langella 2009).**

La connaissance de nouvelles souches de bactéries lactiques utilisées dans l'industrie agroalimentaire offre une nouvelle voie dans le domaine de la recherche scientifique en microbiologie appliquée dont le but de produire a l'avenir de nouveau produits alimentaires concurrentiels sur le plan national et international .

Partie Experimentale

Materiels et Methodes

1.Materiels :

Selon des travaux antécedantes le materiel biologique est constitué des echantillons de lait et produits laitiers variès et traditionels,des souches de bacteries lactiques ont été utilisées dans le but de selectionner celles qui ont une activité antiacterienne et pour eventuel utilisation comme probiotique.

2.Methodes :

2.1. Isolement et purification des bactéries lactiques

L'isolement des LAB a été fait après la réalisation d'une série de dilution décimale par le transfert d'un volume de 1ml du lait, directement ou après enrichissement par incubation des échantillons du lait à 30°C et à 37°C jusqu'à sa coagulation, à 9ml de solution d'eau physiologique stérile (0.85% m/v) pour l'obtention d'une dilution initiale de 10-1; elle est utilisée par la suite pour réaliser une série de dilution jusqu'à 10-7 **(Khedid et *al.*, 2009).** 100µl de chaque dilution a été étalé sur des boites contenant un milieu MRS solide et d'autres contenant un milieu M17 solide. Elles sont incubées en anaérobie dans des jarres d'anaérobiose à 30°C et d'autres à 37°C pendant 48 à 72h.

Après incubation, les colonies individuelles sont prélevées et transférées à des tubes contenant 5ml de bouillon MRS stérile **(Lore et *al.*, 2005).** La purification a été faite par des repiquages répétés sur le milieu gélosé approprié jusqu'à l'obtention des isolats homogènes. La pureté des bactéries isolées est confirmée par examen microscopique **(Thapa et *al.*, 2006).**

2.2. Conservation des isolats

Les souches présumées comme LAB (Gram positif et catalase négative) sont conservées à court terme sur la gélose MRS ou M17 inclinée; après ensemencement et croissance à la température optimale, les cultures sont maintenues à 4°C et le renouvellement des souches se fait par repiquage toutes les quatre semaines sur bouillon MRS. Les bactéries sont conservées à long terme dans un bouillon MRS contenant 20% (v/v) de glycérol et sont maintenues à -20°C **(Guessas et Kihal, 2004).**

2.3. Identification phénotypique des souches isolées

Afin d'identifier les LAB, les méthodes phénotypiques comprenant une examination morphologique, des tests physiologiques et biochimiques ont été réalisées.

Tous les tests ont été réalisés sur le milieu de culture ajusté à pH: 6.2, stérilisé et ensemencé par une culture jeune (développée dans le bouillon MRS pendant 16h); ils sont répétés deux fois. Le résultat de chaque test est comparé à un témoin (non inoculé par la bactérie) incubé à la même température.

2.3.1 Identification morphologique

- **Observation macroscopique**

Afin de déterminer leurs caractères culturaux (taille, forme et couleur), les colonies obtenues sont observées à la loupe binoculaire **(Joffin et Leyral, 2006).**

- **Observation microscopique**

Selon la nature de la paroi, les bactéries sont distinguées en: Gram positif, dont les bactéries lactiques en font partie et en Gram négatif. La coloration de Gram a été réalisée selon le protocole décrit par Joffin et Leyral (2006).

Coloration de Gram

- Réaliser un frottis bactérien et le fixer;
- colorer au violet de gentiane phénolé durant environ 1 min;
- laver à l'eau distillée (ou du robinet);
- faire agir la solution de lugol durant environ 30 secondes;
- laver à l'eau distillée (ou du robinet);
- faire agir l'éthanol à 0.95 durant 10 secondes ou faire couler l'éthanol sur la lame jusqu'à la décoloration ;
- laver à l'eau distillée (ou du robinet);
- colorer à la fuchsine phénolée de quelques secondes à 1 min selon sa concentration ;
- laver à l'eau distillée (ou du robinet);
- observer après séchage à l'immersion (objectif x100) et à pleine lumière.

Les bactéries à Gram+ absorbent la couleur du cristal violet et demeurent bleues violettes en apparence, contrairement celles à Gram- qui apparaissent distinctement rosâtres.

2.4 Identification biochimique et physiologique

2.4.1 Test de catalase

La catalase est une enzyme catalysant la décomposition de peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène selon la réaction suivante:

$$2H_2O_2 \longrightarrow O_2 + 2H_2O$$

Cette enzyme est produite par plusieurs microorganismes et utilisée pour l'identification des bactéries. Une colonie isolée est prélevée de la gélose et déposée dans une goutte d'eau oxygénée sur une lame de verre propre. L'apparition de bulles d'air indique une réponse positive. Les bactéries retenues sont celles dépourvues de catalase **(Boubekri et Ohta, 1996).**

2.4.2 Production de CO_2 à partir de glucose

Le caractère homo ou hétérofermentaire est mis en évidence sur bouillon MRS sans citrate **(Dworkin et *al.*, 2006)**. Le milieu est réparti dans des tubes à essai dans lesquels des cloches de Durham inversées et remplies entièrement de bouillon sont placées. Après autoclavage, les tubes sont inoculés par une culture bactérienne jeune puis incubés pendant 1 à 5 jours à 30°C. Les souches hétérofermentaires croissent et produisent le CO_2 qui s'accumule dans la cloche, alors que, les homofermentaires croissent sans produire le CO_2 **(Milliere et *al.*, 1989).**

2.4.3. Hydrolyse de l'arginine

L'arginine est dégradée en ammoniac et en ornithine par l'arginine dihydrolase selon la réaction suivante:

$$\text{Arginine} + 2H_2O + H_3PO_4 + \text{ADP} \longrightarrow \text{Ornithine} + \text{ATP} + 2NH_3 + CO_2$$

Elle est mise en évidence sur le bouillon de Reddy Des tubes contenant 5ml de milieu sont inoculés et incubés à 30°C pendant 5 jours. Les bactéries utilisant l'arginine libèrent l'ammoniac ce qui alcalinise le milieu et entraine un changement de couleur vers le pourpre **(Meyer et *al.*, 2004; Bulut, 2003).**

2.4.4. Croissances à différentes températures

Toutes les souches ont été cultivées sur 5 ml de bouillon MRS et incubées à 10°C pendant une semaine et à 45°C pendant 48h **(Badis et *al.*, 2005).**

2.4.5. Croissance à différentes concentrations d'NaCl

La tolérance des bactéries au sel a été testée sur bouillon MRS additionné avec 40g/l et 65g/l d'NaCl. Après inoculation et incubation à 30°C pendant 5 jours, le développement des souches est apprécié par comparaison avec un tube non ensemencé incubé à la même température **(Guessas et Kihal, 2004).**

2.4.6. Croissance à différentes valeurs de pH

Le bouillon MRS ajusté à des pH différents avec une solution de NaOH ou de l'HCl, stérilisé puis inoculé avec toutes les souches pour les pH: 4.5 et 9.6. Les cocci hétérofermentaires sont cultivés aussi sur pH: 4.8 et les cocci homofermentaires sur pH: 9.2. La croissance des bactéries a été suivie pendant 24 à 48 h à 30°C **(Badis et *al.*, 2005).**

2.4.7. Croissance à 0.1% de bleu de méthylène

Un volume de 5 ml du lait écrémé additionné de 1g/l de bleu de méthylène a été versé dans chaque tube à essais. Les tubes sont stérilisés à 110°C pendant 10 min, ensemencés puis incubés à 30°C pendant (16-72h).

Si le lait reste entièrement bleu, la bactérie ne peut pas se développer et elle est donc **sensible au bleu de méthylène**.

Le virage de couleur du lait vers le blanc est traduit par une réduction de bleu de méthylène, résultat des fermentations bactériennes. Un anneau bleu, dû à l'action de l'oxygène présent dans le tube, se forme à la surface. Dans ce cas la bactérie est **résistante au bleu de méthylène (Joffin et Leyral, 2006; Mami et *al.*, 2008).**

2.4.8. Thermorésistance

Des tubes à essai contenant 5 ml de bouillon MRS stérile sont inoculés et placés dans le bain marie à une température de 60°C pendant 30min. L'apparition d'un trouble après une incubation d'une semaine à 30°C détermine la résistance des bactéries **(Joffin et Leyral, 2006).**

2.4.9. Résistance à l'éthanol

L'alcool éthylique est ajouté aux tubes contenant le bouillon MRS stérile à une concentration finale de 100 ml/l puis ensemencé par les cocci hétérofermentaires. La croissance a été suivie après incubation à 30°C pendant trois jours **(Boubekri et Ohta, 1996).**

2.4.10. Production de dextranes

Les dextranes sont des homopolysaccaharides synthétisés par certaines espèces des genres *Streptococcus* et *Leuconostoc* cultivées sur un milieu hypersaccharosé (Devoyod et Poullain, 1988).

La production des dextranes a été mise en évidence dans le milieu MRS solide modifié par l'addition de 10% (m/v) de saccharose. Elle se traduit par la formation de colonies larges et gluantes sur les boites de Pétri après une incubation d'une semaine **(Milliere et *al.*, 1989).**

2.5.Mesure de l'activité enzymatique :

2.5.1. Mesure de l'autolyse

L'autolyse se fait par la mesure de l'activité d'une enzyme intracellulaire, l'enzyme lactate déshydrogénase, LDH, est libérée dans le cas de lyse cellulaire.

La méthode consiste à récupérer les cellules du tube stérile dans le tampon MES et de les incuber à 30°C pendant 24 h **(Ouzari *et al.*,2002).** Durant cette période, les cellules des souches autolytiques vont se lyser et libérer le lactate déshydrogénase (LDH). Les cellules non lysées sont éliminées de la solution par centrifugation **(Wittenberger &Angelo, 1970).**

La LDH est une enzyme intracellulaire qui permet la formation de l'acide lactique à partir du pyruvate durant la glycolyse. Son dosage nécessite un substrat qui est la β-NADH (ε β-NADH, = 6220 M-1.cm-1) à 0,2 mM dans du tampon KH2PO4, 100 mM, pH 6,2 additionné de fructose 1,6 biphosphate 1mM et de pyruvate de sodium 5mM, pour un volume finale de 200µL/puits. La baisse de l'absorbance à 340 nm et à 30°C est enregistrée durant 5 minutes toutes les 5 secondes. Elle témoigne de l'oxydation du NADH par la LDH. Le NADH est un coenzyme d'oxydation nécessaire à la LDH pour synthétiser l'acide lactique quant au fructose 1,6 biphosphate, c'est un cofacteur essentiel à la réaction. Un blanc exempt d'enzyme est aussi réalisé. L'activité de la LDH est exprimée en mU/mL, où une Unité (U) est la quantité d'enzyme catalysant la transformation d'une µmole de substrat par minute.

2.5.2 Mesure de l'activité protéolytique

La préparation des échantillons aux dosages des aminopeptidases (PepN et PepX) et des protéases membranaires (CEP I et CEP III), commence par la récupération des cellules à partir des flacons non stériles, qui doivent être lavés (3 centrifugations à 14 000 x *g* à 4°C pendant 10 minutes) avec du tampon Tris 50 mM, CaCl2 20 mM, pH 6,8. Comme précédemment, le culot est récupéré et le surnageant est éliminé. On lyse les cellules en ajoutant environ 2,5 mL de billes de zirconium (0,1 mm de diamètre) à 1 mL de cette suspension. La suspension est ensuite agitée avec l'appareil «beatbeater» pendant une minute, puis placé dans de la glace pendant 2 minutes. La procédure est répétée trois fois.

Le lysat est centrifugé à 14 000 x *g*pendant 20 minutes à 4°C. Ainsi le surnagent va servir pour le dosage des aminopeptidases et le culot est suspendu dans le tampon Tris/CaCl2 pour le dosage des protéases membranaires.

2.6.Recherche de pouvoir antibactérien

2.6.1 Mise en évidence de l'effet antagoniste

La recherche d'éventuelle production de substances inhibitrices par les bactéries isolées à l'égard des souches pathogènes est réalisée par un test d'antagonisme direct qui est le test de spots de **Schillinger et Lucke (1989)**.

- **Préparation de la culture de 18 h des souches lactiques**

A partir d'une culture jeune sur des boites de gélose MRS, nous avons prélevé quelques colonies avec la pipette Pasteur que nous avons suspendues dans un tube à essai contenant 05 ml de bouillon MRS (pH 6.5), puis incubé à 37°C pendant 18 heures.

- **Préparation de la culture de 18h des souches pathogènes**

A partir des boites de gélose nutritive contenant des colonies de souches pathogènes jeunes (souches de référence), on prend deux colonies par boites avec la pipette Pasteur et on la met dans un tube à essai contenant 05 ml de bouillon nutritif (pH 7) (chaque souche pathogène pour un tube de boillon nutritif en total 5 tubes plus un tube témoin), puis on incube ces tubes à 37°C pendant 18 heures.

- **Réalisation du test de spot**

Ce test d'antagonisme est réalisé dans le but de révéler la production ou non de produits antibactériennes par les souches de bactéries lactiques; par contre pour connaitre la nature exacte de la substance un autre test peut être réalisé qui est le test des puits.

A partir des pré-cultures de souches lactiques sélectionnées obtenues après 18 heures d'incubation à 37°C, 5 µl ont été ensemencées sous forme de spots sur gélose MRS sécher devant bec bensun à moitié ouverte de façon à obtenir trois spots par boite de même taille et identiques. Ces boites sont laissées séchées prés de bec bensun pendant 30minute.

L'incubation se fait en anaérobiose à 37°C durant 24 heures.

Après incubation, les boites ont été ensuite recouvertes par 10 ml de gélose nutritive molle (0.75% d'agar) inoculée par 1 ml d'une pré-culture de 18 h de chaque souche pathogène (*E.coli, Salmonella, S.aureus, E.fecalis, Enterobacter*).

Après 24 h d'incubation à 37°C des souches inhibitrices (souches lactiques) et indicatrices (souches pathogènes), les boites ont été examinées en vue de détecter les zones d'inhibition autour des spots et le diamètre de zone d'inhibition est mesuré.

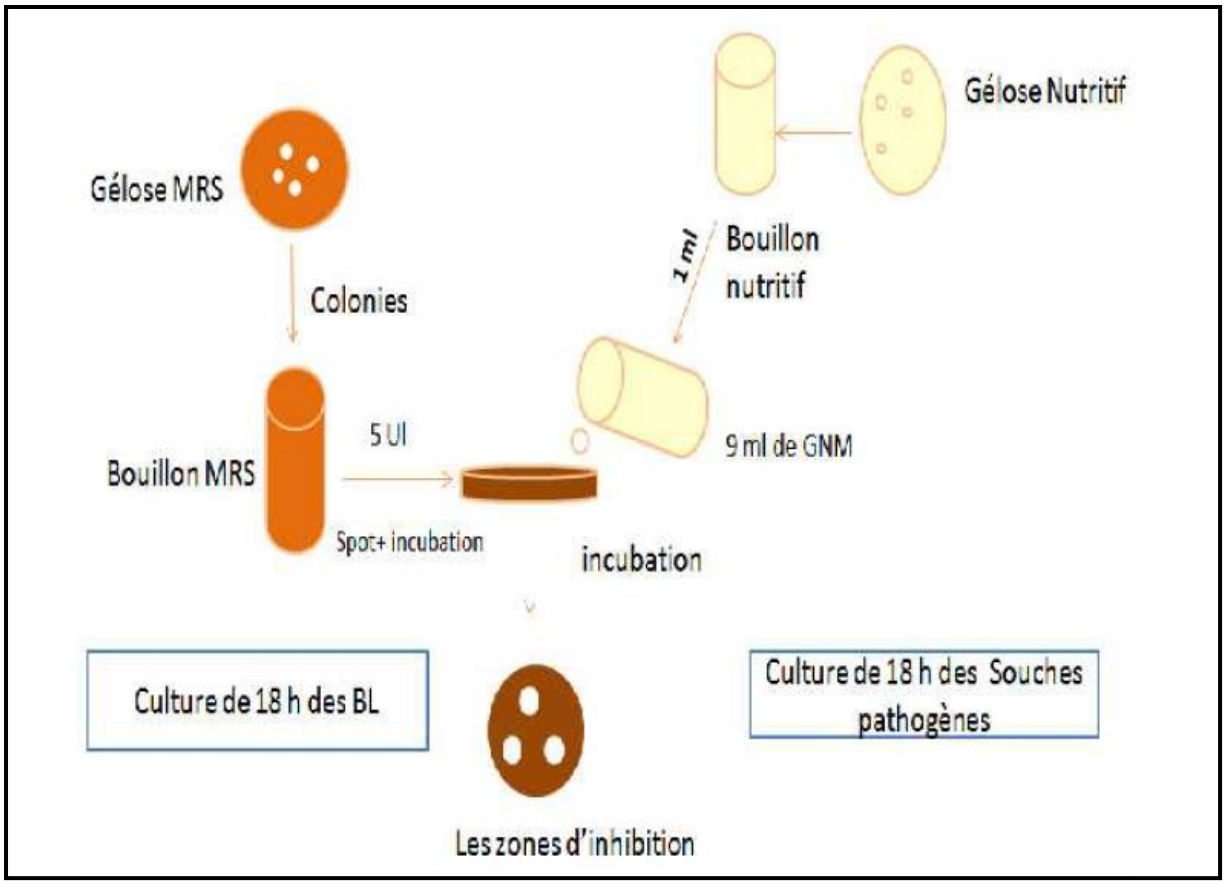


Figure 8 : Mise en évidence du pouvoir antibactérienne par la méthode directe.

2.7. Caractérisation probiotique et technologique

Plusieurs tests ont été faits pour mettre en évidences les caractères probiotiques et technologiques des souches sélectionnées.

2.7.1 Antibiogramme

Le comportement des souches vis-à-vis de 19 antibiotiques différents a été testé sur gélose MUELLER-HINTON (MH), utilisant des disques commerciaux imprégnés d'antibiotiques. Des pré-cultures (18 h d'incubation) ont été ensemencées en masse dans le milieu MH (maintenu à 45 °C), après solidification de ce dernier à température ambiante, six disques d'antibiotiques ont été déposés stérilement à la surface de chaque gélose. Après 24 h d'incubation à 30 °C, des halos clairs apparaissent autour des antibiotiques inhibiteurs de croissance.

2.7.2. Tolérances à l'acidité et aux conditions gastriques

Pour ce test les souches ont été testées par rapport à leur pouvoir de croissance dans un milieu simulant les conditions gastriques (NaCl 125 mmol/L, KCl 7 mmol/L, NaHCO3 45

mmol/L, pepsine 3 g/L) à pH 2 et 3. Après 2 h et 18 h d'incubation en milieu gastrique. La viabilité des bactéries a été vérifiée sur gélose MRS (pH 5.8). La figure 8 illustre les détails de la manipulation.

2.7.3 Tolérance aux sels biliaires

Deux tests ont été utilisés pour déterminer la capacité de tolérance des souches à la bile.

En premier lieu les souches ont été mises en culture dans un milieu MRS (pH 4) supplémenté de 0.3 % de bile bovine naturelle. Après 4 h d'incubation dans ce milieu, les cultures ont été ensemencées sur une gélose MRS, à pH 5.8 pendant 72 h, afin d'observer leur pouvoir de croissance après un passage par la bile.

Dans un même but, les souches ont été cultivées sur bouillon MRS contenant des sels biliaires : Des cultures de 18 h, ont été alors ensemencées dans 10 mL de bouillon MRS additionné de 0.3 % de sels biliaires (pH 4) puis incubées à 37 °C pendant 3 et 24 h. La densité optique (600 nm) a été ensuite mesurée et comparée aux cultures contrôles (ensemencées dans du bouillon MRS dépourvu de sels biliaires).

Conclusion

Conclusion :

Il existe une grande diversité de produits laitiers dans le monde des bactéries lactiques sélectionnées et utiliser pour la fabrication de ces denrées alimentaires a large consommation.

Les bactéries isolées de produits laitiers mises en jeu lors des fermentations lactiques, acidifient les aliments par la production d'acide organique.

Cette production d'acides ,et plus particulièrement d'acide lactique, est accompagnée de la production d'autre composés antimicrobiens (dioxyde de carbone, peroxyde d'hydrogène et de bactériocine , ets).

Les micro-organismes impliqués dans la fermentation des produits laitiers sont des lors considérés comme favorables pour la santé de l'homme et de l'animal et ont reçu le nom de probiotiques.

L'intérêt technologique des bactéries isolées de produits laitiers par différentes activités (enzymatique, antimicrobienne et probiotique) reste important pour la santé de l'homme.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

ABDERRAHMAN, H. (2015). Recherche des substances à activité antimicrobiennes produites par des souches bactériennes isolées à partir du lait bovin. Biologie, kasdi Merbah Ouargla.Master: 64.

Abee, T., Krockel, L., and Hill, C. (1995) Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int J Food Microbiol*.***28***: 169-185.

Ananou, S., Munoz, A., Martinez-Bueno, M., Gonzalez-Tello, P., Galvez, A., Maqueda, M., and Valdivia, E. (2010) Evaluation of an enterocin AS-48 enriched bioactive powder obtained by spray drying. *Food Microbiol*.***27***: 58-63.

Atrih, A., and Foster, S. J. (2001a) Analysis of the role of bacterial endospore cortex structure in resistance properties and demonstration of its conservation amongst species. *J Appl Microbiol*.***91***: 364-372.

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". *Sciences et Technologie*, **23:** 30-37.

BALIARDA, A. (2003). Évaluation de la réponse au stress chez les bactéries lactiques appartenant aux genres *pediococcus* et *tetragenococcus* approches physiologiques et génétiques, Bordeaux. Doctorat: 394.

BARIZ Karim (2011),etude de la microflor du lait fermenté traditionnel (ighi),recherche de suche de bacteries lactiques productrices de bacteriocines ,tizi ouzou ,magister .

BELARABi, F. (2011). Isolement et sélection des souches de bactéries lactique productrice des métabolites antibactériennes Oran. Magister: 129.

BENGHANEM.N,NAILI.A,BOUDJELLAL.S,SAADAOUI.S (2011). Etude bibliographique sur les bactéries lactiques dans l'industrie laitière, (DES).

Bibel, D. J. (1988). Elie Metchnikoff's bacillus of long life. *ASM News* ,54: 661-665.

Black, E. P., Koziol-Dube, K., Guan, D., Wei, J., Setlow, B., Cortezzo, D. E., Hoover, D. G., and Setlow, P. (2005) Factors influencing germination of *Bacillus subtilis* spores via activation of nutrient receptors by high pressure. *Appl Environ Microbiol*.***71***: 5879- 5887.

Boubekri, K., Ohta, Y. (1996). Identification of lactic acid bacteria from Algerian traditional cheese, el-klila. *Journal of Science and Food Agriculture*, **70:** 501-505.

BOUGUERRA Asmaa (2012),Caractérisation des bacteries lactiques du lait de chamelle,Setif ,Magister.

BOULOUF Amel (2016).Isolement et caractérisation de bactériocines produits par des souches de bactéries lactiques isolées à partir de produits fermentés marocains et de défferente varietés de fromage francais,Constantine,Magister.

Bourgeois, C. M., Larpent, J.P. (1996). Aliments fermentés et fermentation alimentaire, Microbiologie alimentaires. Tome 2. Ed © Technique Documentation Lavoisier, Paris.

Buist, G., Kok,J., Leenhout s,K. J., Dabrowsk a,M., Venema, G. & Haandrikman,A. J. (1995). Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the major peptidoglycan hydrolase of *Lactococcus lactis*,a muramidase needed for cell separation. *Journal of Bacteriology*.177:1554–15 63.

Buist,G,Venema ,G,Kok,J1998,autolysis of lactoccoccus lactic influenced by proteolysis,Journal of biotechnology. N°22.5974-5953.

Bulut, Ç. (2003). *Isolation and molecular characterization of lactic Acid bacteria from cheese*. Master of science. Izmir, Turkey.

C

Caplice E. and Fitzgerald G.F., 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. fnt. J FoodMicrobiol., 50, 131-149.

Chandan, R. C., Kilara, A., Shah, N. P. (2008). Dairy processing and quality assurance. John Wiley & Sons, Inc., USA.

Chelule P., Mokoena M. et Gqaleni N. (2010). Advantages of Traditional Lactic Acid Bacteria Fermentation of Food in Africa. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. 2: 1160-1167.

Cherl-HG-Lee 1997:lactic and fermental foods and theirs benefits in asia food control,8,259-269.

Corcionivoschi N., Drinceanu D., Pop I. M., Stack D., Ştef L., Julean C. et Bourke B. (2010). The Effect of Probiotics on Animal Health. Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies. 43(1): 35-41.

CORR, S. C., Li, Y., Riedel, C. U., O'Toole, P. W., Hill, C., Gahan, C. G. (2007). Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118.Proc Natl Acad Sci U S A, 104(18), 7617-7621.

Corsetti, A., Gobbetti, M., Rossi, J., and Damiani, P. (1998) Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. *Appl Microbiol Biotechnol*.***50***: 253-256.

Coulon, J.B., Pradel, P. and Verdier, I. (1995). Effect of forage type on milk yield, chemical composition and clotting properties of milk. *Lait*, 75: 513–521 Guiraud, J.P. (1998). Microbiologie des principaux produits alimentaires,Microbiologie alimentaire. Ed ©Dunod, Paris.

D

Daly Cand davis R,1998 .the biotechnologycol lactic and bacteria unith emphasis application in food safety and humain health Agri,food sa funland 7. 251-264.

Davies, E. A., and Delves-Broughton, J. (1999) Nisin. In: Robinson, R., Batt, C., and Patel, P. (Eds). *Encyclopedia of Food Microbiology*. Acad, Press. London, UK. pp 191-198.

De Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K. H., Whitman, W. B. (2009). Bergey's manual of Systematic Bacteriology Second Edition Volume Three: The Firmicutes. Springer Dordrecht Heidelberg, USA.

Deegan, L. H., Cotter, P. D., and Hill, C. (2006) Bacteriocins: biological tolls for biopreservation and shelf-life extension. *Int Dairy J*.***16***: 1058-1071.

Desmazeaud, M. (1996).les bactéries lactiques dans l'alimentation humain :utilisation innocuité, cahier agriculture,5,331-343.

DIB, H. E. H., Mrad, S., Ayoub, S., Choueiry, R. J., Moussa, L., Bitar, G. (2012). Identification et évaluation de l'effet probiotique des bactéries lactiques isolées dans des fromages caprins traditionnels. Lebanese Science Journal, 13, 43-58.

DJIDEL, A. (2007). Production d'acide lactique par *Lactobacillus casei subsp*. *Rhamnosus* sur jus de datte : Cinétique et optimisation en cultures discontinues, semi-continues et continues, Institut National Polytechnique de lorraine. Doctorat: 246.

DONKOR O.N., HENRIKSSON A., VASILJEVIC T. and SHAHA N.P., 2007. Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and in vitro angiotensin converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. *INRA, EDP Sciences*. 86: 21-38.

DORTU, C. (2008). Isolement d'une bactérie lactique produisant de la sakacin G et utilisation sur des matrices alimentairesWallonie-Europe. Doctorat: 155.

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

DRIBINE Asma & KHELLAL Yasmina 2018 , Evaluation de l'activité antibactérienne de quelques souches de bactéries lactiques,bouira,master.

Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H., Stackebrandt, E. (2006). *The prokaryotes "third edition": A handbook on the Biology of bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*. Springer, Singapore.

E

Ettinger G., MacDonald K., Reid G. et Burton J. P. (2014). The Influence of the Human Microbiome and Probiotics on Cardiovascular Health. Gut microbes. 5(6): 719-728.

F

FAO/OMS (2001). Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization (Organisation Mondiale pour la Santé OMS) .Working Group Report. Cordoba, Argentina.

FARKYE N.Y., MADKOR S.A. and ATKINS H.G., 1995. Proteolytic abilities of some lactic acid bacteria in a model cheese system. *Int Dairy J* 5: 715-725.

Fox, (1993). Cheese: an overview. *In* Cheese: chemistry, physics and microbiology, pp.1-36.*Edited by P. F. Fox. London*: Chapman and all.

Frey L. et Hubert J. (1993). Lactobacilles, Oxygène, Métabolisme Et Antagonisme. Le lait. 73(2): 133-144.

G

GALVEZ, A., Abriouel, H., Lopez, R. L., Ben Omar, N. (2007). Bacteriocin-based strategies sfor food biopreservation. [Review]. Int J Food Microbiol, 120(1-2), 51-70.

Gálvez, A., Gimenez-Gallego, G., Maqueda, M., and Valdivia, E. (1989) Purification and amino acid composition of peptide antibiotic AS-48 produced by *Streptococcus* (*Enterococcus*) *faecalis* subsp. *liquefaciens* S-48. *Antimicrob Agents Chemother*.***33***:437-441.

Gilliland S. E. (1990). Health and Nutritional Benefits from Lactic Acid Bacteria. FEMS Microbiology Reviews. 7(1-2): 175-188.

GUEDDA Zohra,BEN KHELIFA Basma(2017), L'activité antimicrobienne des bactéries lactiques isolées à partir de différents types de lait,Eloued,Master.

Guessas, B., Kihal M. (2004). Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goats' milk. *African Journal of Biotechnology*, **3:** 339-342.

Guinane, C. M., Cotter, P. D., Hill, C., and Ross, R. P. (2005) Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. *J Appl Microbiol*.***98***: 1316-1325.

H

HAMMI, I. (2016). Isolement et caractérisation de bactériocines produites par des souches de bactéries lactique isolées à partir de produits fermenté marocains et de différentes variétés de fromages français. Strasbourg et Sidi Mohamed Ben Abdallah. Doctorat: 149.

Herich R. et Levkut M. (2002). Lactic Acid Bacteria, Probiotics and Immune System. Veterinarni Medicina - Czech. 47(6): 169-180.

Herich R. et Levkut M. (2002). Lactic Acid Bacteria, Probiotics and Immune System. Veterinarni Medicina - Czech. 47(6): 169-180.

Höltzel, A., . , Gänzle, M. G., Nicholson, G. J., Hammes, W. P., and Jung, G. (2000) The First Low Molecular Weight Antibiotic from Lactic Acid Bacteria: Reutericyclin, a New Tetramic Acid. *Angew Chem Int Ed Engl*.***39***: 2766-2768.

I

IKRAM Hammi(2016), Isolement et caractérisation de bactériocines produits par des souches de bactéries lactiques isolées à partir de produits fermentés marocains et de défferente varietés de fromage francais,Université Strasrbourge.

Izquierdo Alegre, E. (2009). *Les protéines bactériennes en tant que biomarqueurs de l'activité probiotique*. Thèse de doctorat. Institut pluridisciplinaire Hubert Curieu, Strasbourg.

J

Joffin, J. N., Leyral, G. (2006). *Microbiologie technique « Tome 1 »: Dictionnaire des techniques*. CRDP Aquitaine, Bordeaux.

K

Khedid, K., Faid, M., Mokhtari, A., Soulaymani, A., Zinedine, A. (2009). Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. *Microbiological Research*, **164:** 81-91.

Klaenhammer, T.R. (1988), bacteriocins of lactic acid bacteria biochimie.70.337-349.

Kleanhammer TR,Barrangou R,Buck BL ,Azcarate peri M.A et Alterman E 2005.Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioproccesing and Raelth.FEMS Microbiologie reviens 29,393-409.

Kleanhammer,TR,Alternan,E,Pleiler,E,Buck,BL.,Goh,Y.J.,Oflaherty.S,et/al 2008.Fonctional genomics of probiotic lactobacilli,J clin Gastroenterol.42:160-162.

L

LANE C.N. and FOX P.F., 1996. Contribution of starter and adjunct lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *International Dairy Journal*.6, 7, 715-728.

LARPENT J.P, (1997). Mémento technique de microbiologie 3ème Ed. *Technique et documentaire lavoisier*, Paris, P: 910.

Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A., and Gobbetti, M. (2000) Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Appl Environ Microbiol*.***66***: 4084-4090.

LAW J. and HAANDRIKMAN A., 1997. Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. *Int. Dairy J*. 7: 1-11.

LEONARD, L.(2013), Évaluation du potentiel bioprotecteur de bactéries lactiques confinées dans une matrice polymérique in Procédés Alimentaires et Microbiologiques, Bourgogne UMR. Doctorat :318.

Lettat A. (2011). Efficacité Et Mode D'action Des Bactéries Propioniques Et/Ou Lactiques Pour Prévenir L'acidose Latente Chez Le Ruminant. Thèse de doctorat. Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II.

Lhsaoui, S. (2009). Etude de procédé de fabrication d'un fromage traditionnel (klila). Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention de diplôme d'Ingénieur Université El Hadj Lakhdar Batna, Département d'Agronomie.

Lore, T.A., Mbugua, S. K., Wangoh, J. (2005). Enumeration and identification of microflora in suusac, a Kenyan traditional fermented camel milk product. *Lebensm.-Wissenschaft und-Technology*, **38:** 125-130.

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

M

MADI, N. (2010). Criblage de souches de bactéries lactiques douées d'activité antibactérienne envers *Staphylococcus aureus* multirésistant, A/ MIRA de Bejaia. Magister: 147.

MAGHNIA, D. (2011). Étude de potentiel technologique des bactéries lactique isolé des aliments fermentes traditionnels algériens, Oran. Magister: 126.

MAIZAINI, A. (2011). Essai de mise en évidence rôle de certaines bactéries lactique dans le contrôle des infections, école nationale supérieure agronomique El-Harrach Alger. Doctorat: 72.

Makarova K., Slesarev A., Wolf Y., Sorokin A., Mirkin B., Koonin E., Pavlov A., Pavlova N., Karamychev V. and Polouchine N. (2006). Comparative Genomics of the Lactic Acid Bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences. 103(42): 15611-15616.

MAKHLOUFI K.M., 2011. Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza , Pierre et Marie Curie-Paris doctora : 229.

Mami, A., Henni, J. E., Kihal, M. (2008). Antimicrobial activity of *Lactobacillus* species isolated from Algerian raw goat's milk against *Staphylococcus aureus. World Journal of Dairy and Food Sciences*, **3:** 39-49.

Marmouri Lamia (2018),Etude de l'effet de souches probiotiques de bactérie lactiques (lactobacillus SPP),isolées de produits fermentés sur la valeurs nutritive de fourrages conservés par ensilage ,Oran,Doctora.

Martinez Viedma, P., Sobrino Lopez, A., Ben Omar, N., Abriouel, H., Lucas Lopez, R., Valdivia, E., Martin Belloso, O., and Galvez, A. (2008) Enhanced bactericidal effect of enterocin AS-48 in combination with high-intensity pulsed-electric field treatment against *Salmonella enterica* in apple juice. *Int J Food Microbiol*.***128***: 244-249.

Matamoros S. (2008). Caractérisation De Bactéries Lactiques Psychrotrophes En Vue De Leur Utilisation Dans La Biopréservation Des Aliments: Étude Physiologique Et Moléculaire Des Mécanismes D'adaptation Au Froid. Thèse de doctorat. Nantes.

MESSAD Nawel (2017),Caracterisation technologique des souches de bacteries lactiques isoles de produits laitiers traditionneles algeriens,Telemcen,Magister.

Metchnikoff E., (1907). The prolongation of life. In *Optimistic Studies* (Heinemann W., Ed.), pp. 1-100. G. P. Putnam and Sons, London, UK.

Meyer, A., Deiana, J., Bernard, A. (2004). *Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés*. Doin, France.

Michel DESMAZEAUD laboratoire de recherche laitiere INRA-Jouyen-Josas,1998.

Millette.M et al. (2008). Characterization of probiotic properties of Lctobacillus strains. Dairy Sci. Technol. 88: 695-705.

Milliere, J.B., Mathot, A. G., Schmitt, P., Divie, C. (1989). Phenotypic characterization of *Leuconostoc* species. *Journal of Applied Bacteriology*, **67:** 529-542.

Morency, H., Mota-Meira, M., LaPointe, G., Lacroix, C., and Lavoie, M. C. (2001) Comparison of the activity spectra against pathogens of bacterial strains producing a mutacin or a lantibiotic. *Can J Microbiol*.***47***: 322-331.

N

NACIRA Tahiri 2017,Maitrise en science et technologie des aliments,Quebec,Canada.

Nicolas J. L., Gatesoupe J., Frouel S., Bachere E. et Gueguen Y. (2007). Quelles Stratégies Alternatives Aux Antibiotiques En Aquaculture? INRA Production Animale. 20(3): 253-258.

O

O'SULLIVAN, L. A. b., R.P. Ross a, C. Hill b,c. (2002). Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie, 84*, 593–604.

O'Mahony, T., Rekhif, N., Cavadini, C., and Fitzgerald, G. F. (2001) The application of a fermented food ingredient containing variacin, a novel antimicrobial produced by *Kocuria varians*, to control the growth of *Bacillus cereus* in chilled dairy products. *J Appl Microbiol*.***90***: 106-114

ORLA-JENSEN S., 1919. The lactic acid bacteria. Copenhagen,Komission.

Ouzari H., Cherif A. & Mora D. (2002). Autolytic phenotype of Lactococcus lactis strains isolated from traditional Tunisian dairy products. *Journal of Applied Microbiology* 92, 812-820.

P

Penaud, S. (2006). Analyse de la séquence génomique et Etude de l'adaptation à l'acidité.

Perdigon G., Fuller R. et Raya R. (2001). Lactic Acid Bacteria and Their Effect on the Immune System. Current Issues in Intestinal Microbiology. 2(1): 27-42.

Pointillart A. et Guéguen L. (2006). Le Lait Est-Il Indispensable Pour Couvrir Les Anc En Calcium? Sciences des Aliments. 26(6): 509-515.

Q

Queiehend A.C,1998 Antimicrobial components from lactic acid bacteria ,In:salmin S, Von Wright A.lactic Aad bacteria.Microbilogy and functional aspects , 2rd edition 139-159 Marcel Dekker Inc.New York.

Quinto E. J., Jiménez P., Caro I., Tejero J., Mateo J. et Girbés T. (2014). Probiotic Lactic Acid Bacteria: A Review. Food and Nutrition Sciences. 5(18): 1765.

R

Rahali, V. and Menard, J.L. (1991). Influence des variants génétiques de la Blactoglobuline et de la k-caséine sur la composition du lait et son aptitude fromagère. *Lait*, 71: 275–297.

Robertson, A., Tirado, C., Lobstein, T., Jermini, M., Knai, C., Jensen, J. H., Ferro-Luzzi, A., and James, W. P. (2004) Food and health in Europe: a new basis for action. *WHO Reg Publ Eur Ser*: i-xvi, 1-385, back cover.

Robin J. M. et Rouchy A. (2001). Les Probiotiques. Nutritherapie Info, Centre d'Etude et de Dévelopement de la Nutrithérapie. 6: 1-4.

Robinson, R. K. (2002). *Dairy Microbiology handbook: the Microbiology of milk and milk products*. John Wiley and Sons, Inc., New York.

Rodríguez, J. M., Martínez, M., and IKok, J. (2002) Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Crit Rev Food Sci Nutr*.***42***: 91-121.

Rogers, L. A. (1928) The Inhibiting Effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. *J Bacteriol*.***16***: 321-325.

Roissard H et Laquet FM,1990 Bacteries lactiques 2 volumes ,lorica uriage,600 p ,par volume.

Ross, R. P., Morgan, S., and Hill, C. (2002) Preservation and fermentation: past, present and future. *Int J Food Microbiol*.***79***: 3-16.

ROUDJ S., BELKHEIR K., ZADI-KARAM H. et KARAM N.E., 2009. Protéolyse et autolyse chez deux lactobacilles isolés de lait camelin du Sud Ouest Algérien. *European. J. Sci. Res*. 34 (2): 218-227.

S

SALMINEN S,et WRIGHT A.V., 2004. Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects. *CRC Press.789,usa.*

Salminen.S et al.Demonstration of safety of probiotics – a review, Int. J.Food Microbiol. 44 (1998) 93-106.

Sanders.ME. (2000). Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. J. Nutr. 130(Suppl): 384-390.

Schillinger U., Geisen R. et Holzapfel W. (1996). Potential of Antagonistic Microorganisms and Bacteriocins for the Biological Preservation of Foods. Trends in Food Science & Technology. 7(5): 158-164.

SMAOUI, S. (2010). Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés, Toulouse. Doctorat: 251.

Smit, G., Smit, B.A. &Engels, W.J. (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews* 29, 591–610.

Smukowski, M., Y. Ping, W. L. Wendorff, & R. D. Rao. (2003). Cheese defects in U.S. graded cheeses. *Dairy Pipeline* 15(3): 1-7

Soryal, K.A., Zeng, S.S., Min, B.R. and Hart, S.P. (2004). Effect of feeding treatments and lactation stages on composition and organoleptic quality of goat milk domiati cheese. *Small Ruminant Re,*.52: 109–116.

Stiles ,M.E.et Holzapfel W.H., 1997.Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy .Int .J. Food Microbiol .36:1-29.

Stiles, M. E. (1996) Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*.***70***: 331-345.

Strom K,Schnurer J et Melin P,2005 ce cultivation of antifungal lactobacillus plantarum Milab 393 ant aspergillus ridulans ,evaluation of effects of fungal grouth and protein expression FEMS Microbiolog letters 246,119-124.

T

TABAK S, B. A. (2011). L'activité antagoniste des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus, Bifidobacterium bifidum* et *Lactobacillus bulgaricus*) vis-àvis de la souche *Helicobacter pylori* responsable des maladies gastroduodénales. Nature & Technologie, 71 78.

Thapa, N., Pal, J., Tamang, J. P. (2006). Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally processed fish products of the Eastern Himalayas. *International Journal of Food Microbiology*, **107:** 33-38.

Thirabunyanon M., Boonprasom P. et Niamsup P. (2009). Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Dairy Milks on Antiproliferation of Colon Cancer Cells. Biotechnology Letters. 31(4): 571-576.

Thomas, L. V., Clarkson, M. R., and Delves-Broughton, J. (2000) Nisin. In: Naidu, A. S. (Eds). *Natural Food Antimicrobial Systems*. CRC-Press. F. L. pp 463-524.

Thunell, R. K. (1995). Symposium: The dairy Leuconostocs. Journal of Dairy Science, 78: 2514- 2522.

Tolle, A. (1980). The microflora of the udder. *Bull. Int. Dairy Fed*, 120: 4–10.

V

Vasiljevic.T et Shah.NP. (2008).Probiotics—From Metchnikoff to bioactives. Int. Dairy. J.18: 714–728.

W

Weber, G. H., and Broich, W. A. (1986) Shelf-extension of cultured dairy foods. *C. Dairy Prod. J.*: 19-21.

Wells J. M. (2011). Immunomodulatory Mechanisms of *Lactobacilli.* Microbial Cell Factories. 10(1): 1.

Wittenberger, CL. & Angelo, N, (1970). Purification and properties of fructose 1-6 diphosphate-activated lactate dehydrogenase from Streptococcus faecalis. *Journal of Bacteriology* 101, 717-724.

Woese;C.R et Fox,G.E 1977,phylogenetic structure of the prokaryotic domain :the primary kingdoms,proceeding of the National Academy of Sciences 74,5088-5090.

WORAPRAYOTE, W., Malila, Y., Sorapukdee, S., Swetwiwathana, A., Benjakul, S., Visessanguan, W. (2016). Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. Meat Sci, 120, 118-132.

Y

YONEYAMA, F., Imura, Y., Ohno, K., Zendo, T., Nakayama, J., Matsuzaki, K., Sonomoto, K. (2009). Peptide-lipid huge toroidal pore, a new antimicrobial mechanism mediated by a lactococcal bacteriocin, lacticin Q. *Antimicrob Agents Chemother, 53*(8), 3211 3217.

Annexes

Annexes

Annexes 1 :

Composition des milieux de culture d'isolement

Gélose MRS (Fluka) (Quantité en g)	
Peptone	10
Extrait de viande	8.0
Extrait de levure	4.0
D(+)-Glucose	20
Dipotassium hydrogen phosphate	2.0
Acétate de sodium trihydraté	5.0
Citrate triammonique	2.0
Sulfate de magnesium heptahydraté	0.2
Sulfate de manganèse tetrahydraté	0.05
Agar	15
Tween 80	1 ml
Eau distillée qsp	1L
pH 6.5 +/- 0.2 à 37°C. Autoclavage à 121°C pendant 15min	

Gélose M17 (Pronadisa) (Quantité en g)	
Glycérophosphate sodique	19
Peptone de soja	5.0
Extrait de viande	5.0
Lactose	5.0
Peptone de viande	2.5
Peptone de caséine	2.5
Extrait de levure	2.5
Acide ascorbique	0.5
Sulfate de magnésium	0.2
Agar bactériologique	12.75
Eau distillée qsp	1L
pH final: 6.9 ± 0.2 à 25°C. Autoclavage à 121°C pendant 15min	

Annexes 2 :

composition des milieux de culture :

Bouillon nutritive 20 g/l

Ingrédients	masse
Peptone	**10 g**
Extrait de viande	**5 g**
Chlorure de sodium	**5 g**
L'eau distillé	**1 l**

PH=7.2, Autoclavage 1 heure à 121°C, à pression 200 kpa.

Gélose nutritive molle

Ingrédients	masse
Peptone	**10 g**
Extrait de viande **Chlorure de sodium**	**5 g** **5 g**
Agar	**7.5 g**
L'eaudistillée	**1 l**

Autoclavage 1 heure à 121°C, et à pression 200 kpa.

Gélose nutritive

Ingrédients	masse
Peptone	**10 g**
Extrait de viande	**5 g**
Chlorure de sodium	**5 g**
Agar	**15 g**
L'eau distillée	**1 l**

PH=7.5±0.2, Autoclavage 1 heure à 121°C.