

UNIVERSITE KASDI MERBAH, OUARGLA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES



Mémoire de Fin d'Etudes

En vue de l'obtention du diplôme de

Master

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Biologie

Spécialité : Microbiologie appliquée

Thème

Pouvoir antimicrobien des souches
***Leuconostoc.sp* vis-à-vis des bactéries pathogènes**

Présenté par :

BENCHEIKH Khadidja

LOUAZENE Hafsa

Devant le jury:

Mme BEN AISSA Atika

M.C.A. Présédente

UKM OUARGLA

Mr BOURICHA M'hamed

M.A.A Encadreure

UKMOUARGLA

Mr MOSBAH Said

M.C.B

Examineur

UKM OUARGLA

Ouargla Année universitaire 2018-2019



Remerciements

Nous souhaitons avant tous remercier notre directeur de mémoire, monsieur **M'HAMED BOURICHA**, pour le temps qu'il a consacré à nous apporter les outils méthodologiques indispensables à la conduite de cette recherche .son exigence nous a grandement stimuler.

Un grand merci en particulier à madame la présidente **BENAISSA ATIKA** et monsieur l'examineur **MOSBAH SAID** d'avoir la patience d'assister notre soutenance

Nous adressons nous sincères remerciements à tous les professeurs du département des sciences biologique de l'université Kasdi Merbah.

Nous voudrions bien remercier nos très chères parents qui ont toujours été là pour nous .nous remercions nos sœurs et frères pour leurs encouragements.

Nous remercions toutes les personnes qui par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques ont guidé nos réflexions et ont accepté à nos rencontrer et répondre à nos questions durant notre recherches.

À tous ces intervenants, nous présentons nos remerciements ,notre respecte ,et notre gratitude.

A decorative border of roses and leaves surrounds the text. The roses are in shades of red and yellow, with green leaves and stems. The border is composed of several vertical and horizontal stems, creating a frame around the central text.

DEDICACE

Je dédie ce memoir

À ma chère mère et mon cher père (que dieu me les garde)

À mes frères et mes soeurs.

À mes camarades et mes amies.

À mon chère marie.

*Sans oublier tous les professeurs que se soit du
primaire , du moyen , du secondaire ou de
l'enseignement superieur*



DEDICACE

Je dédie ce travail aux

les plus chers à mon cœur dans ce monde,

Mes parents, leur encouragement qui a crée ce que je suis
maintenant.

A mon marie **BADIS** et mes belles sœurs **FATMA, FAIROUZ,**

SOURIA et **NERMINE, MERIEMET** mon frère

ABDELSALAM qui a été toujours présent pour l'aide,

A ma deuxième famille qui me donne l'espoir pour avancer

Je dédie ce travail à mon âme pour mon patience, pour tous les

moments qui j'étais fatiguée, je dédie mon travail à moi

..KHADIDJA

Liste des figures

Figure 01 : Arbre phylogénique des bactéries lactiques et et comparaison avec les genres <i>Aerococcus</i> <i>Bacillus</i> et <i>Listeria</i>	06
Figure 02 : séquence et structure de lantibiotique de type NISINE.....	15
Figure 03 : Schéma explicatif de protocole expérimental.....	32
Figure 04 : Schéma explicatif des étapes de dilution Isolement et purification des souches <i>Leuconostoc</i>	34

Liste des tableaux

Tableau I: Comparaison entre les compositions du lait d'origine animale.	03
Tableau II : la source, la quantité et les conditions des échantillons prélevés	22
Tableau III : bactéries pathogènes (BMR) utilisés comme souches indicatrices	22
Tableau IV: résultats de test des sucres	41
Tableau V: les résultats des tests biochimiques et les tests physiologiques	45
Tableau VI: répartition de différents souches isolés.....	46
Tableau VII : résultats de test d'interaction direct.....	47

Liste des photos

Photo 01 : aspect des colonies après 24h d'incubation à 30°C Ensemencement en profondeur	36
Photo 02 : aspect des colonies <i>Leuconostoc pure</i> après 24h d'incubation.....	37
Photo 03 : aspect des colonies <i>Leuconostoc</i> après 18h d'incubation sur bouillon MRS....	37
Photo 04 : test Catalase sur lame	38
Photo 05 : observation des <i>Leuconostocs</i> sous microscope	38
Photo 06 : type fermentaire sur milieu MRS liquide avec cloche de Durham	39
Photo 07 : test des sucres	40
Photo 08 : test de dégradation de l'Arginine.....	42
Photo 09 : production de dextrane par <i>Leuconostoc</i>	43
Photo 10 : hydrolyse de citrate après 24 h	44
Photo 11 : méthode direct de double couche après 18h d'incubation.....	47
Photo 12 : méthode indirect après 18h d'incubation.....	49



TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

Remerciements	
Dédicace	
Liste de figure	
Liste des tableaux	
Liste des photos	
Table des matieres	
Introduction	01
Synthèse bibliographique	
Chapitre I	
Produits laitiers	03
Définition du lait.....	03
Différents types du fromage.....	03
S'men.....	03
Fromage traditionnelle	04
Microflore du lait et des produits laitiers	04
Définition des bactéries lactiques	05
Chapitre II	
Définition du <i>Leuconostoc</i>	09
Caractéristiques du <i>Leuconostoc</i>	09
Origines du <i>Leuconostoc</i>	09
Taxonomie du <i>Leuconostoc</i>	10
Chapitre III	
Substances antimicrobiennes produites par du <i>Leuconostoc</i>	13
Acides organiques.....	13
Peroxyde d'hydrogène	13
Dioxyde de carbone	13
Acides gras.....	14
Bactériocines.....	14
Définition des bactériocines.....	14
Classification des bactériocines.....	14
Bactériocines produites par des souches <i>Leuconostoc</i>	16
Production et le conditionnement des bactériocines.....	18

Partie expérimentale	
Matériels et méthodes	
Lieu de stage.....	23
Isolement et purification des souches <i>Leuconostoc</i>	24
Pré-identification.....	25
Conservation des souches.....	25
Identification	26
Test phénotypique	26
Examen macroscopique.....	26
Examen microscopique	26
Test physiologique	26
Croissance dans les conditions hostiles.....	26
Test biochimique.....	27
Production de dextrane	27
Recherche de ADH Arginine Di Hydrolase	27
Test de citrate	27
Test de type fermentaire	28
Etude de profil fermentaire	28
Test biotechnologique.....	29
Test d'interactions bactériennes	29
Méthode directe	29
Méthode indirecte.....	29
Résultats et discussion	
Isolement des souches <i>Leuconostoc</i>	32
Caractérisation morphologique.....	33
Caractérisation physiologique et biochimique	34
Test physiologique.....	34
Test biochimique	36
Test de type fermentaire.....	36
Recherche de ADH Arginine Di Hydrolase	37
Production de dextrane	37
Test de citrate.....	38
Etude de profil fermentaire	39
Test biotechnologique.....	42

Test d'interactions bactériennes.....	42
Méthode Direct	42
Méthode indirect.....	43
Conclusion.....	46
Références bibliographiques	



Introduction

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes de groupe hétérogène, ont un rôle essentiel dans la fermentation des matières premières animales et végétales. Ils ont la capacité de dégrader les hydrates de carbone, les lipides, et les protéines en synthétisant une large gamme de composés: acides organiques, les peptides, les composés antimicrobiens et aromatiques et les exopolysaccharides.(**Mozzi et al.,2010**)

Parmi les bactéries lactiques ; les *Leuconostocs* sont des Gram positive, catalase négative, ces microorganismes sont importants dans la technologie laitière. Elles ont la capacité de produire l'hydrate de carbone et sur le plan aromatique ils sont un levain d'arôme qui produit les substances aromatiques (le di-acétyle et l'acide acétique) à partir le citrate de lait. Plus que le pouvoir fermentaire de *Leuconostoc*, elles peuvent combattre les bactéries indésirables qui contaminent les produits alimentaires, cette activité antimicrobienne se traduit par la synthèse des composés actifs par les *Leuconostocs* ces derniers sont soit des acides organiques, peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone ou d'autre protéines lytiques.

Cette activité contre les bactéries pathogènes rend les *Leuconostocs* très importants dans la sécurité alimentaire surtout contre *Listeria monosytogenes* qui menaçant notre santé et cause des maladies sévères. Les substances produites sont considérées comme des agents antimicrobiens inhibent l'action des multiples bactéries pathogènes ce qui rend les *Leuconostocs* importants dans la bioconservation alimentaire (**Komorowski, 2011**).

Notre étude est basée sur l'étude des effet antimicrobiennes entre les souches de *Leuconostoc* qui ont été isolées de différents produits laitiers tels que le lait de chèvre, lait de vache, et aussi le fromage traditionnel et autres bactéries pathogènes. Tout commence par l'isolement et l'identification des souches isolés pour confirmer que ces souches sont des *Leuconostocs*. L'objectif de ce travail consiste à étudier l'activité antibactérienne de certaines souches de bactéries lactiques isolées à partir d'un produit laitier traditionnel à l'égard de quelques bactéries pathogènes.



Chapitre I
Produits laitiers

I. Produits laitiers

I.1. Définition du lait et des produits laitiers

En 1909, le congrès international de la répression des fraudes a défini le lait comme un produit intégral de la traite totale interrompue d'une femelle laitière bien portante bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum (J.P. LARPENT, 1997).

Les laits sécrétés par les différentes espèces de mammifères présentent des caractéristiques communes et contiennent les mêmes critères de composants: eau, protéines, lactose, matière grasse et matières minérales. Malgré cela les proportions spécifiques de ces composants se varient largement d'une espèce à l'autre (A.H. SEYD, 2014).

Tableau 01: Comparaison entre les compositions du lait (TOUHAMI *et al*, 2010)

Compositions g/100ml	Vache	Brebis	Chamelle	Chèvre
Extrait sec total	12.8	18.3	13.6	13.4
Protéines	3.5	5.7	3.5	3.3
Caséine	2.8	4.5	2.8	2.6
Lactose	4.5	4.6	5	4.8
Sodium	0.5	0.42	0.39	0.37
Calcium	13	20	11.6	14
Lipide	3.7	7.1	4.5	4.1

a- S'men: Le S'men est une graisse traditionnelle utilisée couramment dans la cuisine arabe et maghrébine pour la cuisson, il est généralement fabriqué à partir de lait de brebis, de vache ou de chèvre. Le s'men est parfois incorrectement qualifié par les Européens de beurre rance (BOUFODJI, 2017).

b- Fromage traditionnelle : Il est défini comme étant réservé au produit fermenté ou non, affiné ou non, obtenu à partir de matière d'origine exclusivement laitière par coagulation du lait lui-même, de la crème, ou de leur mélange, suivi d'égouttage (FROK, 1992)

I.2. Microflore du lait et des produits laitiers

I.2.1. Champignons

Les Champignons microscopiques sont organismes unicellulaires comme Les levures qui sont capables de fermenter le lactose. Certaines sont utilisées dans la production de laits fermentés, Elles ont des enzymes protéolytiques et lipolytiques, elles jouent un rôle dans la formation de l'arôme par exemple *Debaryomyce shansenii*. (J.J. DEVOYOD et al, 1970)

Ainsi elles peuvent être pluricellulaires appelés des moisissures, généralement elles n'existent pas dans le lait liquide, mais elles intéressent aux autres produits laitiers. Elles se développent en surface ou dans les parties internes aérées. Elles sont productrices de lipases et de protéases. (D. LUBIN, 1995)

Ces microorganismes peuvent être indésirables dans certains cas si leur développement est excessif ou elles produisent des toxines, le degré de danger est en fonction de l'espèce et la charge de ces microorganismes. (C. LAITHIER, 2011)

I.2.2. Protozoaires

Le lait et les produits laitiers peuvent être contaminé par les parasites protozoaires qui sont des microorganismes eucaryotes n'appartiennent pas à la flore banale du lait mais son origine est l'environnement, les animaux voisins transmettent par l'ingestion des kystes dans la matière fécale... (C. LAITHIER, 2011)

la pathogénicité de ces microorganismes est en fonction de l'espèce. Par exemple *Cryptosporidium*, *Eimeria*, *Giardia* qui provoque des diarrhées néo-natales graves. (F. DAROUIN, 2011)

I.2.3 Bactéries

I.2.3.a Bactéries d'altération:

Le niveau de contamination est étroitement dépendant des conditions d'hygiène (l'état de propreté des mamelles de l'animal, du milieu environnant, du trayon, du matériel de récolte du lait, et enfin, du matériel de conservation et de transport du lait. A noter qu'il est généralement moins élevé dans le cas de la traite manuelle que dans la traite mécanique, car cette dernière met en œuvre un équipement plus important et plus difficile à nettoyer. (Leyral et Vierling, 2007). Les coliformes et les entérobactéries pathogènes (*Salmonella*, *Yersinia*) leur source de contamination sont les fèces et les téguments de l'animal. ils sont

Presque toujours présents dans le lait cru, elles élaborent diverses substances conférant aux produits des goûts et des odeurs très désagréables. (D. LUBIN, 1995). *Staphylococcus* non pathogènes : cause une contamination par le manipulateur ou bien la mal désinfection des mamelles (marie.C ,2003) .les ensilages mal conserves constituent la principale source primaire de contamination de lait cru de vache par *Listeria monocytogenes*. Les vecteurs sont les bouses et la contamination à lieu lors de la traite. (Larpen J-P., 1997) .Une contamination par divers microorganismes peuvent provenir de l'environnement : entérobactéries, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, Corynébactéries, *Bacillus*, etc., par l'intermédiaire du matériel de traite et de stockage du lait, par le sol, l'herbe ou la litière. (lamontagneet al.,2002).D'autres microorganismes peuvent se trouver dans le lait, lorsqu'il est issu d'un animal malade. Il peut s'agir d'agents de mammites, c'est-à-dire d'infections du pis *Streptococcus pyogènes*, *Corynebactérium pyogènes*, staphylocoques, etc. (Leyral et Vierling, 2007).

I.2.3.b Bactéries indigènes « les bactéries lactiques »

- **Définition des bactéries lactiques**

Les bactéries lactiques représentent un groupe hétérogène de microorganismes, elles sont Gram positif, catalase négative, immobiles et asporulées, elles sont aérotolérantes mais elles poussent dans des conditions d'anaérobiose. (Guiraud, 2004)

Les bactéries lactiques ont le pouvoir de produire de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme. Elles colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, les végétaux et les céréales, elles font partie de la flore intestinale et vaginale humaine et animale. (P. GARRY, 1999)

Ces bactéries ont toujours occupées une place importante parmi les auxiliaires de fabrication alimentaire, elles permettent de développer certaines caractéristiques organoleptiques et d'augmenter la durée de conservation. En effet, les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes telles que les acides organiques, le dioxyde de carbone et le di-acétyle. Elles jouent un important rôle hygiénique en abaissant le pH et en sécrétant une variété de composés inhibiteurs qui empêchent le développement de bactéries indésirables. (KIHAL, et al, 2012)

- **Taxonomie des bactéries lactiques**

L'analyse comparative des séquences d'ARNr 16s a entraîné des changements importants dans la taxonomie des bactéries lactiques (**Samelis J., 2004**)

Selon la dernière édition de Bergey's manual of systematic bacteriology (2009), les bactéries lactiques sont classées dans le phylum des firmicutes, la classe des bacilli, et l'ordre des lactobacilles renferme 35 genres répartis sur six familles (figure 1.3). Parmi ces genres, seulement douze sont utilisés dans la biotechnologie alimentaire. Il s'agit de *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus*, *Weissella*. (**DRIDER et PRIVOST, 2009**)

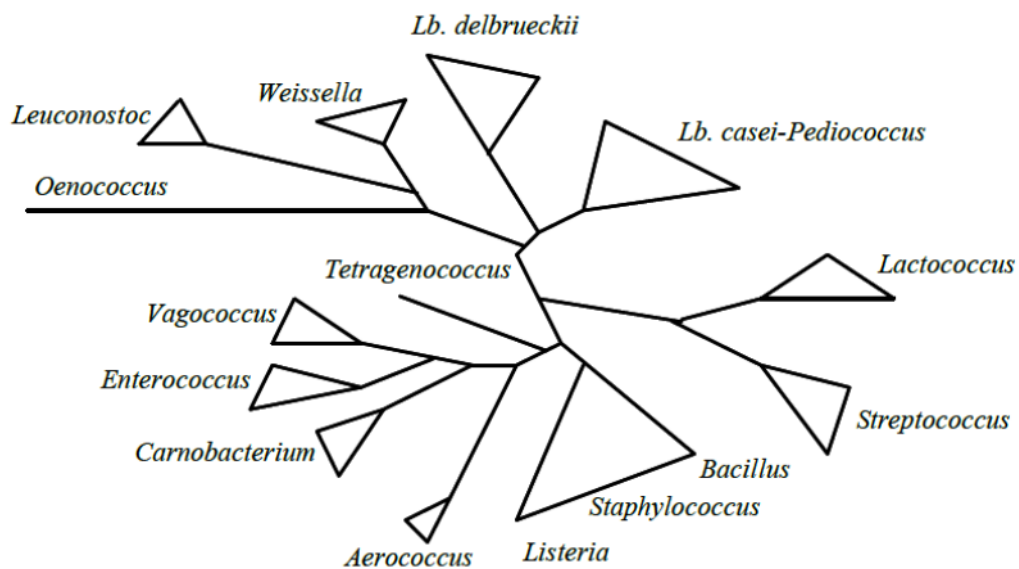


Figure 01 : Arbre phylogénique des bactéries lactiques et comparaison avec les genres *Aerococcus*, *Bacillus* et *Listeria*

Chapitre II

Genre *Leuconostoc*

I. Genre *Leuconostoc*

I.1. Histoire *Leuconostoc*

En 1878, VAN THIEGHEM a défini le genre *Leuconostoc* ce terme vient du mot Nostoc qui est une algue bleue mucilagineuse et de leuco qui veut dire blanc. Les *Leuconostocs* sont apparus sous forme de chaînes, d'aspect mucilagineux, non pigmentés. Les premières souches ont été isolées à partir d'accidents apparus dans des sucreries. Les *Leuconostocs* responsables de ces accidents produisent des dextrans et en milieu saccharosé, les chaînes de cocci sont entourées d'une gaine bien distincte à l'examen microscopique: gaine qui rappelle celle des Nostocs. (J.J. DEVOYOD et al, 1988)

En 1912, BEIJERINCK isola du beurre et d'autres produits laitiers des microorganismes identiques aux *Leuconostocs* antérieurement décrits, ces microorganismes produisaient de la gomme à partir du saccharose: il les appela *Lactococcus dextranicus*. (J.J. DEVOYOD et al, 1988)

En 1919, ORLA-JENSEN, dans son étude sur les bactéries lactiques sépara le genre *Betacoccus* du genre *Streptococcus*. Il choisit de donner le nom de LEUCONOSTOCS EN TECHNOLOGIE LAITIÈRE *Betacoccus* à ces bactéries produisant de l'acide lactique parce que ces bactéries se trouvaient sur les betteraves (*Beta communis*) et autres produits végétaux. Les résultats d'ORLA-JENSEN montraient pour la première fois qu'il existait une relation possible entre les *Leuconostocs* produisant des dextrans (*Betacoccus*) et certains streptocoques producteurs d'acide lactique, streptocoques trouvés dans les produits laitiers et les végétaux fermentés. ORLA-JENSEN divisait le genre *Betacoccus* en deux espèces *B. arabinosaceus* et *B. bovis* d'après leur capacité de fermenter l'arabinose. (J.J. DEVOYOD et al, 1988)

En 1920, HAMMER, étudiant les streptocoques des levains, isola deux espèces qu'il dénomma *Streptococcus citrovorus* et *S. paracitrovorus*, reconnues comme responsables de l'arôme du beurre. Ces microorganismes furent, quelques années plus tard, assimilés au genre *Betacoccus* et *S. citrovorus* devint *B. cremoris*. En ce qui concerne le caractère hétérofermentaire des *Leuconostocs*, c'est-à-dire leur capacité de produire du CO₂ à partir du glucose, mis en évidence en 1918 par EVANS, il fut confirmé par HUCKER en 1928. Les *Leuconostocs* ont pris peu à peu un intérêt économique potentiel et des tentatives de classification sont apparues dès les années 30. (J.J. DEVOYOD et al, 1988)

I.2. Définition du *Leuconostoc*

Les leuconostocs ont été défini par Van Thieghem en 1878 comme des bactéries lactiques Gram-positives, catalase négatives, non-pathogènes, tolérant les milieux acides. Ce sont des coques, de forme lenticulaire sur gélose, si bien qu'ils peuvent morphologiquement ressembler plus à des lactobacilles qu'à des streptocoques. Ils se groupent par paires ou par chaînes. Sont des anaérobies facultatifs et exigeantes au point de vue nutritionnel, sont des mésophytes leur température de croissance entre 25 et 40 °C, leur fermentation Hétéro lactique (le métabolisme du lactose produit des quantités équimolaires d'acide lactique, d'éthanol et de CO₂). Intrinsèquement résistants à la vancomycine. Ils n'ont pas la capacité à hydrolyser l'arginine. (Joseph et al, 2004)

I.3. Caractéristiques du *Leuconostoc*

Les leuconostocs vivent en divers environnements dans des conditions physicochimiques variables, elles peuvent croître à pH proche au pH du lait mais elles ne tolèrent pas l'acidité, généralement leur croissance s'arrête si le pH interne de la cellule est entre 5.4 et 5.7 alors que le pH externe reste en fonction aux acides organiques produites par les souches leuconostocs au fur à mesure la croissance sera lente et inhibée si le pH atteint à 4.6. (M. FEDERIGHI, 2005)

En plus, les leuconostocs sont des mésophiles leur température optimale de croissance est entre 25 et 30°C, et anaérobies facultatifs. Comme toutes les bactéries lactiques leuconostocs sont exigeant, elles nécessitent des acides aminés pour croître, aussi elles peuvent fermenter les glucides avec production du gaz (hétérofermentaires) mais elles ne peuvent pas dégrader l'arginine. Autre caractère peut être spécifique au *Leuconostoc* est le pouvoir de résister la vancomycine. (M. FEDERIGHI, 2005)

I.4. Origines du *Leuconostoc*

Les leuconostocs ont des exigences nutritionnelles complexes. En général, sont nécessaires l'acide nicotinique, la thiamine, la biotine et l'acide pantothénique, avec des variations d'une espèce à l'autre ; ce que les fait rencontrés dans se rencontrent dans la nature et font partie de la microflore de la plupart des champs cultivés. On les retrouve souvent sur les plantes (Devoyod et Poullain, 1988), et dans divers aliments comme le lait et les produits laitiers fermentés (fromages, kéfir) (Cibik et al, 2000), les végétaux

fermentés (vin, cidre, olives, choucroute), la viande réfrigérée et le sang humain. Ils sont très abondants dans les fromages à pâte molle fabriqués avec du lait cru.

I.5. Taxonomie du *Leuconostoc*

En 1931, HUCKER et PEDERSON ont établi la première classification du genre *Leuconostoc* après l'étude de 80 souches d'origines très diverses. Ils ont classé le genre *Leuconostoc* en trois groupes selon la fermentation du saccharose et la production de dextrane : - Le groupe I ne fermentant pas le saccharose: *Leuconostoc citrovorus*. - Le groupe II fermentant le saccharose et les pentoses: *Leuconostoc mesenteroides*. - Le groupe III fermentant le saccharose mais non les pentoses : *Leuconostoc dextranicus*. (J.J. DEVOYOD et al, 1988)

En 1948, Abd-el-Malek et Gibson aient isolé *Leuconostoc mesenteroides* qui sont saccharose positifs et arabinose positifs, La production de dextrans à partir de saccharose dans le genre *Leuconostoc* est un caractère qui peut prêter à confusion. (J.J. DEVOYOD et al, 1988)

En 1955, PEDERSON et ALBURY ont montré que par repiquages successifs, principalement en milieu acide additionné soit de jus de tomate, soit de jus d'orange, beaucoup de souches atypiques redevenaient typiques. C'est ainsi que des souches non productrices de dextrans retrouvaient la possibilité d'en produire et simultanément se trouvaient capables d'utiliser certains sucres qu'elles ne fermentaient pas auparavant. Par contre après plusieurs repiquages dans des milieux à teneur croissante en sel, de nombreuses souches de *Leuconostoc* perdaient leur capacité de produire des dextrans. La production de dextrane dépend également des températures de croissance. (J.J. DEVOYOD et al, 1988)

En 1967 GARVIE isole du vin une nouvelle espèce de *Leuconostoc* qu'elle dénomme *L. oenos*. Cet auteur fut chargé de rédiger le chapitre relatif aux *Leuconostocs* pour la 8^e édition du *Bergey's Manual* (1974) ; elle a classé les *Leuconostocs* en 6 espèces: *L. mesenteroides*, *L. dextranicum*, *L. paramesenteroides*, *L. lactis*, *L. cremoris* et *L. oenos* selon des critères voisins de ceux utilisés pour la différenciation des lactobacilles (fermentation des sucres, besoins nutritifs, action sur le lait tournesolé, croissance dans différentes conditions, etc.). *L. mesenteroides* et *L. dextranicum* se trouvent souvent dans les mêmes habitats que le lactobacille hétérofermentaire *Lactobacillus brevis*. Comme ils

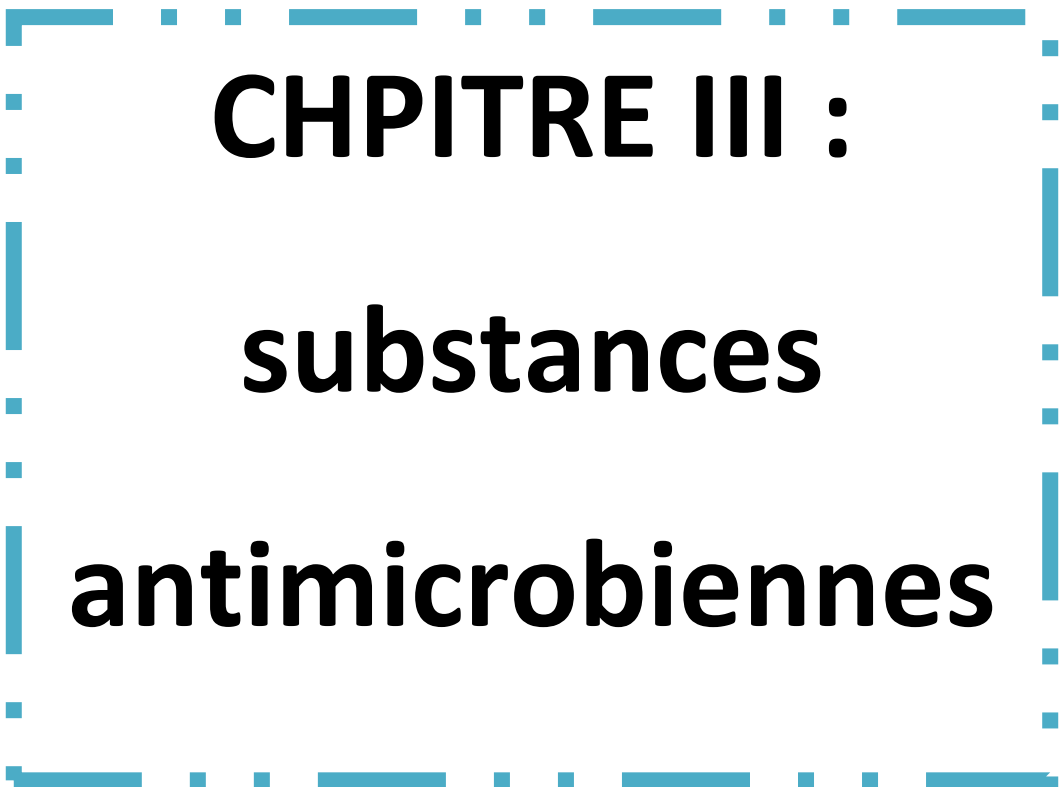
se développent tous sur les mêmes milieux sélectifs, donc il est difficile de les isoler les uns des autres d'autant que morphologiquement ils peuvent se présenter sous la forme de coccobacilles. (J.J. DEVOYOD *et al*, 1988)

Toutefois les *Leuconostocs* à l'inverse de *Lb. brevis* fermentent le tréhalose et ne produisent pas d'ammoniaque à partir de l'arginine ; de plus ils forment de l'acide lactique D(-) tandis que *Lb. brevis* produit de l'acide lactique racémique. (J.J. DEVOYOD *et al*, 1988)

Les données récentes a permet la séparation du genre *Leuconostoc* en six espèces distinctes n'était guère satisfaisante. Si *L. oenos* se distinguait bien des autres espèces de *Leuconostoc*, la proposition de nouvelles souches types pour les espèces *L. mesenteroides*, *L. dextranicum* et *L. cremoris* ne résolut pas le problème et elles étaient reconnus comme étant des sous-espèces de *L. mesenteroides*(GARVIE, 1983).

Depuis la première classification du genre *Leuconostoc*, la taxonomie n'a pas cessé d'évoluer. Au fur et à mesure que les connaissances progressent, leur classification change pour s'adapter aux nouvelles connaissances scientifiques. Le genre *Leuconostoc* renferme 14 species (*mesenteroides*, *lactis*, *pseudomesenteroides*, *carosum*, *gelidum*, *fallax*, *citreum*, *gasicomitatum*, *kimchi*, *garlicum*, *inaha*, *holzapfelii*, *palmae* et *miyukkimchii*). (Hui et Evranuz, 2016).

L'espèce *L. mesenteroides* est la plus employée en industrie agro-alimentaire, cet espece renferme quatre sous-espèces (*subsp. mesenteroides*, *subsp. dextranicum*, *subsp. cremoris* et *subsp.* (Gu et al, 2012).



CHPITRE III :
substances
antimicrobiennes

I. Substances antimicrobiennes produites par du *Leuconostoc*

I.1. Acides organiques

La production des acides organiques comme l'acide lactique, l'acide acétique, ou l'acide propionique permet une acidification du milieu qui peut limiter la croissance de certaines bactéries entre autre les bactéries indésirables et pathogènes. (Djé et al., 2008).

Ainsi les acides organiques ont différentes actions telles qu'un excellent pouvoir bactéricide ou un effet bactériostatique contre les microorganismes pathogènes se trouvant dans le tube digestif, sont un des agents classiques de préservation des aliments et sont reconnus comme des additifs. (Brul et coote, 1999)

I.2. Peroxyde d'hydrogène

En général, les bactéries lactiques sont capables de transformer l'oxygène moléculaire (O_2) en super oxyde excité (O^{2-}), en peroxyde (H_2O_2) ou en eau (H_2O). Ces réactions sont catalysées par des enzymes spécifiques généralement en présence d'un substrat à oxyder. Ces enzymes ont été trouvées chez des souches de *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* (CONDON, 1987).

L'effet antimicrobien de H_2O_2 peut résulter de l'oxydation des groupes sulfhydryliques causant la dénaturation d'un certain nombre d'enzymes, et de la peroxydation des lipides de membrane; de ce fait provoque l'augmentation de la perméabilité de la membrane (KONG et DAVISON, 1980).

Le peroxyde d'hydrogène peut également agir comme précurseur pour la production de radicaux libres bactéricides tels que le super oxyde (O^{2-}) et radicaux d'hydroxyle (OH^{\cdot}) qui peuvent endommager l'ADN (BYCZKOWSKI et GESSNER, 1988).

I.3. Dioxyde de carbone

Les *Leuconostocs* sont des hétérofermentaires synthétisent de dioxyde de carbone (CO_2) comme métabolite secondaire. Sont accumulation dans le milieu extérieur crée une anaérobiose qui peut être toxique pour les microorganismes aérobie existant dans l'aliment .toutefois le dioxyde de carbone peut aussi, à faible concentration, stimule la croissance de certain bactéries. (Lindgren et Dobrogosz, 1990).

I.4. Acides gras

L'activité antimicrobienne des acides gras a été identifiée pendant plusieurs années. Les acides gras insaturés produits par des souches *Leuconostoc* présentent une activité contre les bactéries à Gram+, et l'activité antifongique des acides gras dépend de la composition, de la concentration, et du pH du milieu (GOULD, 1991).

I.5. Bactériocines

I.5.1. Définition des bactériocines

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont des peptides antimicrobiens de faible poids moléculaire. Elles ont une activité inhibitrice dirigée contre les bactéries proches de la souche productrice. Leur spectre d'action est généralement étroit. Cependant, la plupart ont une activité contre des pathogènes alimentaires tels que *Listeria monocytogenes*. L'application des bactériocines ou des souches productrices dans les aliments pour y éviter le développement de bactéries pathogènes ou altérantes a donc été envisagée. Carine Dortu & Philippe Thonart, «Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires».

I.5.2. Classification des bactériocines

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

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

Classe Ia qui comprend des peptides cationiques hydrophobes allongés contenant jusqu'à 34 acides aminés.

Classe Ib qui comprend les peptides globulaires chargés négativement ou sans charge nette et contenant jusqu'à 19 acides aminés (McAuliffe et al., 2001 ; Twomey et al., 2002).

Certains antibiotique sont par ailleurs constitués de deux peptides agissant ensemble pour avoir une activité comme la lacticine 3147. Les séquences et structures d'un antibiotique de chaque type se trouvent à la figure 1. (C. Dortu et P. Thonart, 2009)

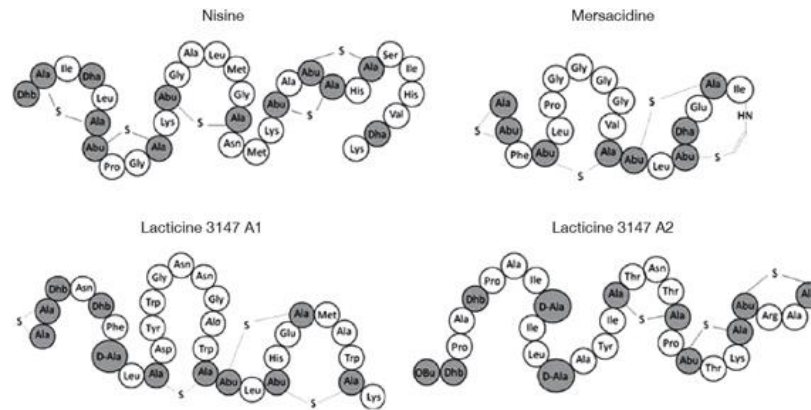


Figure 02: séquence et structure de antibiotique de type NISINE

Classe II : Peptides de taille inférieure à 10 kDa, stables à la chaleur, ne contenant pas d'acides aminés modifiés. Leur point isolélectrique varie entre 8 et 10. Cette classe est divisée en trois sous-classes :

Sous-classe IIa contiennent entre 27 et 48 acides aminés et ont toutes une partie N-terminale hydrophobe contenant la séquence consensus YGNGV ainsi qu'un pont disulfure et une partie C-terminale moins conservée, hydrophobe ou amphiphile qui détermine la spécificité d'action. Elles ont toutes une activité contre *Listeria monocytogenes*. Certaines bactériocines de cette sous-classe contiennent également un deuxième pont disulfure dans leur domaine C-terminale qui semble être important dans la stabilisation de la structure tertiaire. Il semble par ailleurs qu'il leur conférerait une meilleure activité antimicrobienne, une meilleure résistance à l'exposition à des hautes températures et un spectre d'action plus large (Richard et al., 2006).

Sous-classe IIb comprend les bactériocines ayant besoin de deux peptides pour avoir une activité. Deux types de bactériocines de classe IIb peuvent être distingués : le type E (*Enhancing*) où la fonction d'un des deux peptides est d'augmenter l'activité de l'autre et le type S (*Synergy*) où les deux peptides sont complémentaires. (C. Dortu et P. Thonart, 2009)

Sous-classe IIc contient les bactériocines ne pouvant pas être classées dans les autres sous-classes. (C. Dortu et P. Thonart, 2009)

Classe III : Protéines de taille supérieure à 30 kDa et sensibles à la chaleur. La structure et le mode d'action de ces bactériocines diffèrent complètement des autres bactériocines produites par les bactéries lactiques. Cette classe ne contient que quatre bactériocines :

l'helveticin J produite par *Lactobacillus helveticus* A, l'enterolysin A produite par *Enterococcus faecium*, la zoocin A produite par *Streptococcus zooepidemicus* et la millericin B produite par *Streptococcus milleri* (Nigutova et al., 2007).

Classe IV : Peptides requérant une partie carbohydratée ou lipidique pour avoir une activité. Aucune bactériocine de cette classe n'a été décrite. (C. Dortu et P. Thonart, 2009)

I.5.3. Bactériocines produites par des souches *Leuconostoc*

Sont des bactériocines appartiennent à la Classe deux des antibiotique. Ces derniers sont des peptides thermostables de taille inférieure à 10kDa contenant un (pédiocine PA1) ou deux peptides (lactacine F). Certains ont une structure cyclique (entérocin AS 48), quatre sous-classes sont citées : a, b, c et d (Dortu et Thonart, 2009).

I.5.4. Mécanismes d'action des bactériocines

Le siège d'activité des bactériocines est la membrane cellulaire, raison pour laquelle les bactériocines n'ont pas d'activité contre les bactéries Gram⁻. Cependant, les mécanismes d'action des bactériocines sur la membrane sont variés.

I.5.4.a Antibiotique

Les antibiotique interagissent avec la membrane cellulaire par des interactions électrostatiques ou par liaison à des récepteurs spécifiques tels que le lipide II (undecaprenyl-pyrophosphoryl-MurNAc-pentapeptides-GlcNAc), un précurseur de peptidoglycanes. Suite à cette liaison, les antibiotique peuvent former des pores larges et non spécifiques dans la membrane cytoplasmique, ce qui va causer l'efflux rapide des petits composés cytoplasmiques tels que les ions, les acides aminés, l'ATP, etc. Cette augmentation de la perméabilité membranaire va conduire à la dissipation des deux composantes de la force proton motrice, à la cessation rapide des activités cellulaires et à la mort de la cellule. L'interaction avec le lipide II permet d'augmenter la stabilité des pores formés et de réduire la concentration du lantibiotique nécessaire à la formation des pores, mais peut également conduire à l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire (McAuliffe et al., 2001)

Les antibiotique de type A dissipent la force proton-motrice par formation de pores et interfèrent avec la synthèse des peptidoglycanes alors que la plupart des antibiotique de type B agissent par inhibition de la synthèse des peptidoglycanes. Néanmoins, certains forment également des pores dans la membrane des cellules cibles (**Bauer et al., 2005**).

La nisine, un antibiotique de type A, interagit avec le lipide II au niveau du MurNAc tandis que la mersacidine, un antibiotique de type B, interagit avec le GlcNAc du lipide II (**Willey et al., 2007**).

Les antibiotique composés de deux peptides comme la lacticine 3147 agissent également par formation de pores dans la membrane des cellules cibles (McAuliffe et al., 2001). La lacticine 3147 (**Figure 1**) a un spectre d'action large. Le peptide A1 a une activité qui est plus élevée en présence du peptide A2. Il a été récemment proposé que la lacticine 3147 A1 agit en se liant au lipide II, inhibant la synthèse des peptidoglycanes et permettant à la lacticine 3147 A2 de former un pore dans la membrane de la cellule cible (**Wiedemann et al., 2006**).

I.5.4.b Bactériocines de classe II

Le mécanisme d'action supposé des bactériocines de classe IIa est l'interaction de la bactériocine avec la membrane ou un récepteur spécifique, la « mannose perméase », pour ensuite former un pore dans la membrane de la cellule, ce qui induit la perméabilisation de la membrane, la dissipation des deux composantes de la force proton motrice et la mort de la cellule (**Bauer et al., 2005**).

Le mécanisme de formation des pores n'est pas connu, même si l'hypothèse la plus courante est l'association de différentes molécules de la bactériocine (**Diep et al., 2007**).

Les bactériocines de classe IIb ont en général un spectre d'action inhibant une large gamme de bactéries Gram⁺. Elles forment des pores et rendent la membrane perméable à différentes petites molécules, des cations monovalents ou des anions, ce qui dissipe une ou les deux composantes de la force proton motrice. Les ions transportés sont spécifiques de la bactériocine (**Oppegard et al., 2007**).

Le ratio optimal d'activité entre les deux sous-unités est en général de 1:1 mais il est de 4:1 pour la lactocine 705 (**Oppegard et al., 2007**).

Néanmoins, les mécanismes d'interaction des deux bactériocines entre elles et avec la membrane cellulaire ne sont que très peu connus. Il a été montré qu'il n'y avait pas de liaison au même récepteur que pour les bactériocines de classe IIa (la « mannose perméase ») (Diep et al., 2007).

Les études ont récemment montré que les deux peptides composant la lactocine 705 ont des activités bien spécifiques. La lactocine 705 α interagit avec la surface de la membrane cellulaire et la déshydrate, ce qui permet à la lactocine 705 β de former des pores. (C. Dortu et P. Thonart, 2009)

I.5.4.c. Bactériocines de classe III

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

II Production et le conditionnement des bactériocines

II.1. production des bactériocines

Les bactériocines sont généralement produites à la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire de croissance. Elles peuvent ensuite être dégradées par les protéases produites par la bactérie lactique productrice ou être adsorbées à sa surface, ce qui mène à la baisse de la concentration de bactériocines dans la culture. Les facteurs influençant la production de bactériocines sont principalement la souche productrice, la température, le pH, la composition du milieu et la technologie de fermentation employée. (C. Dortu et P. Thonart, 2009)

Pour la production de sakacin P par *L. sakei*, une même bactériocine peut être produite par des souches ou espèces différentes dont la capacité de production peut être variable. Lors d'une optimisation de production, si différentes souches sont disponibles, le choix de la souche pourra être déterminant. (C. Dortu et P. Thonart, 2009)

Les conditions de culture influencent fortement la production de bactériocines. En effet, l'optimisation de la croissance ne résulte pas nécessairement en l'optimisation de la production de bactériocines (Parente et al., 1999).

Il a même été suggéré que des conditions de croissance défavorables permettent de stimuler leur production (Verluyten et al., 2004).

Les températures et pH optimaux de production sont souvent inférieurs à ceux optimaux pour la croissance. C'est par exemple le cas pour la production de bactériocine par *Leuconostoc mesenteroides* L124 et *L. curvatus* L442 (Mataragas et al., 2003)

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

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

L'ajout de ces nutriments lors d'une culture *fed-batch* permet souvent d'augmenter la production comparativement à une culture en *batch* (Pèrez Guerra et al., 2005).

L'utilisation de la technique des cellules immobilisées peut permettre d'augmenter la durée et la stabilité de la production de bactériocines. Les cellules peuvent être immobilisées dans des biofilms ou des billes d'alginate de calcium. Cette technique a déjà été utilisée avec succès pour la lacticine 3147 et la nisine (Pongtharangkul et al., 2006).

II.2. Conditionnement des bactériocines

Il est très difficile de conditionner les bactériocines sous une forme purifiée. La purification des bactériocines est une procédure longue et coûteuse qui nécessite la mise en œuvre de nombreuses techniques, à savoir une précipitation des protéines au sulfate d'ammonium, différentes combinaisons de chromatographies sur colonne telles que des échanges d'ions ou des interactions hydrophobes et une étape finale de chromatographie liquide à haute performance en phase inverse. Ces traitements ne sont pas applicables à l'échelle industrielle. La stratégie souvent mise en œuvre consiste dès lors en l'adsorption de la bactériocine sur la cellule productrice suivie d'une centrifugation ou d'une ultrafiltration de la culture et de la désorption de la bactériocine par abaissement du pH à 2

et augmentation de la concentration en chlorure de sodium. Les bactériocines semi-purifiées peuvent alors être conditionnées sous forme sèche par atomisation ou lyophilisation par exemple La nisine, la seule bactériocine légalement approuvée comme additif alimentaire, est commercialisée sous une forme semi-purifiée. (**C. Dortu et P. Thonart, 2009**)



Materiel et methodes

Ce travail a été réalisé au niveau des laboratoires de microbiologie et biochimie de la faculté des sciences de la nature et de la vie Université KASDI Merbah Ouargla, depuis 10 février 2019 jusqu' au Mai 2019, à fin d'étudier le pouvoir antimicrobien des souches de *Leuconostoc* isolées à partir de différents biotopes; du lait de différentes origines et du fromage traditionnel.

1. Echantillonnage:

Tableau 2 : la source, la quantité (des échantillons prélevés Avec la prise en compte des conditions d'hygiène)

Echantillon	Origine	Quantité
Lait de chèvre	OUARGLA (EL BOUR), TOUGOURT	500 ml
Lait de vache	OUARGLA (acheté)	1 l
Le fromage traditionnelle	OUARGLA (acheté)	50 g

Tableau 3 : bacteries pathogènes (BMR) utilisés comme souches indicatrices

Les souches	référence
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC43300
<i>Esherichia coli</i>	ATCC25992
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC6633
<i>Pseudomonas aeroginosa</i>	ATCC9027
<i>Salmonella typhi</i>	ATCC14028
<i>Enterococcus faecalis</i>	WDCH0009
<i>Streptococcus Sp421</i>	Isolées à partir des crachats des patients au niveau de service de réanimation d'EPH MOHAMED BOUDIEF .ouargla
<i>Klebsiella Sp72</i>	

Principaux BMR

- *Staphylocoques*

Ce sont des cocci à Gram positif, généralement groupés en amas ayant la forme de grappes de raisin, immobiles, non sporulés. *Staphylococcus aureus* est une bactérie commune présente sur la peau et les membranes muqueuses chez 20 à 30 % des personnes en bonne santé et chez les animaux (FLEURETTE, 1989).

- *Entérocoques*

Le genre Entérocoque est constitué de cocci à Gram positif groupés par paires ou en courte chaînette, disposés en diplocoque, ovoïde, pousse en milieu hostile, bile esculine, résiste aux Na Cl à 6,5 % ; ils peuvent être pathogènes opportunistes; ce sont commensaux du tube digestif, chez l'homme et chez l'animal. Leur habitat et leur résistance aux antibiotiques expliquent que les entérocoques soient responsables de plus de 10% des infections nosocomiales (OSMAN, 2011)

- *Entérobactéries*

Les entérobactéries constituent un grand groupe de bactéries ayant une forte similitude. La création de ce groupe a été proposée par Rahn en 1937 qu'il dénomma *Enterobacteriaceae* (JOLY et REYNAUD, 2007).

44 genres sont regroupés en cinq tribus, d'après leurs propriétés fermentatives: *Escherichiae*, *Klebsielleae*, *Proteae*, *Yersinia* et *Erwiniae*.

Les genres les plus communément isolés en bactériologie clinique sont: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* et *Yersinia*. La famille des *Enterobacteriaceae* est constituée des genres bactériens rassemblés sur la base de caractères bactériologiques communs

- *Escherichia coli*

se retrouve en abondance dans la flore commensale humaine, en particulier dans le tube digestif de l'homme qu'elle colonise dès les premières heures de la naissance. Elle constitue l'espèce dominante de la flore aérobie anaéro-tolérante (AHOYO *et al*, 2007; BONACORSI *et al.*, 2001).

- *Salmonelle*

KAUFFMANN, le pionnier de l'analyse du genre *Salmonella*, avait individualisé sur la base de tests phénotypiques et de tests sérotypiques plusieurs sous-genres et de très nombreuses espèces de *Salmonella* (*Salmonella typhi*, espèce responsable de la fièvre typhoïde) (WEILL, 2009). Depuis 2005, une nouvelle nomenclature est en vigueur sur le plan international (TINDALL *et al.*, 2005).

- *Klebsiella*

Les *Klebsiella* sont des bactéries immobiles, en diplobacilles, généralement capsulées (DELARRAS, 2007) et fermentent de nombreux sucres avec production de gaz, mais elles ne sont pas protéolytiques (FAUCHERE et AVRIL, 2002). Sur milieu gélosé, les colonies sont caractéristiques: elles sont volumineuses, bombées, brillantes et très visqueuses à cause de la capsule (FAUCHERE et AVRIL, 2002).

- *Pseudomonas*

Le genre *Pseudomonas* de la famille des *Pseudomonaceae* est un bacille Gram négatif, n'appartient pas à la famille des *Entérobactériaceae*, mais considéré comme une *entérobactérie*, car il végète dans le tube digestif des animaux à sang chaud et peut se

comporter comme un pathogène opportuniste. A la différence des *Enterobactériaceae*, chez La majorité des souches de *Pseudomonas*, le métabolisme glucidique n'est pas fermentatif mais oxydatif.

Pseudomonas aeruginosa C'est un bacille, Commensal du tube digestif mais peu abondant chez le sujet sain, il occasionne de nombreuses infections chez les sujets fragilisés. Il produit deux pigments qui diffusent dans le milieu de culture :

- ✓ La pyocyanine, bleu vert, soluble dans le chloroforme et ;
- ✓ La pyoverdine, jaune vert, fluorescent et soluble dans l'eau.
- ✓ Il existe de rares souches produisant d'autres pigments (noir ou rouge) mais surtout 10% de souches sont non pigmentées,
- ✓ Oxydase+ (**CHOUDER. N., 2006**).

- ***Bacillus***

Le genre *Bacillus* appartient à l'embranchement des *Firmicutes*, classe des *Bacilli*, ordre des *Bacillales*, Famille des *Bacillaceae*. Il comprend 268 espèces réparties en 3 groupes sur la base de la morphologie de l'endospore et du corps bactérien. *Bacillus subtilis* appartient au second groupe avec son endospore ellipsoïdale non déformante. (**BOUHAIRI, 2017**)

B. subtilis fait partie des bactéries gram-positives à faible pourcentage en guanine et en cytosine (%GC) dans leur génome. (MARCHADIER, 2009) *Bacillus subtilis*, bactérie ubiquitaire à Gram positif, catalase positive, aérobie pouvant se développer en anaérobiose, mobile par des flagelles peritriches, formant des spores très résistantes dont l'élimina

- ***Streptocoque***

Les bactéries des genres *Streptococcus* sont des cocci à Gram positif, se disposent en général en chainettes, parfois par paires, ni mobiles ni capable de sporulation, parfois encapsulés, ce sont des anaérobies facultatifs ; exigeants ayant besoin du sang ou d'autres,

milieux riches, certain souche importantes ne se développant que sur les, milieux enrichis en pyridoxine.ion efficace nécessite des conditions particulières.

2. Préparation des dilutions

Des dilutions décimales ont été préparé à partir des échantillons ; pour le lait 1ml est pipeté à l'aide d'une micropipette et est ajouté dans un tube à essais contenant 9ml de l'eau physiologique peptonée à fin d'obtenir la dilution de 10^{-1} jusqu'à 10^{-3} .

Pour les fromages traditionnels (Klila, Kmarria, Smen) 5g de produit est pesé et ajouter dans 45ml de l'eau physiologique peptonée (dilution 10^{-1}) par la suite 1ml de cette dilution est pipeté pour réaliser la dilution 10^{-2} jusqu'à 10^{-3}

Les dilutions ont étéensemencé en profondeur dans le milieu MRSV et incubé à 30°C jusqu'à croissance (48h).

3. Isolement et purification des souches *Leuconostoc*

3.1.Milieux de cultures utilisées pour l'isolement

Pour l'isolement nous avons fait une culture sur milieu gélosé MRS (de Man, Rogosa et Sharpe) sélectif en ajoutant un agent inhibiteur qui est la vancomycine à concentration bien déterminé 0.2% qui agir contre la plus part des bactéries Gram positives. (**L. Savvaidis et al, 2017**)

3.1.1.purification :

La purification des souches isolées est réalisée par repiquages successifs alternant sur milieux sélectifs MRS liquide et solide (par la méthode des stries), et l'incubation à 30°C . (**Kacem et Karam, 2006, Cheriguene et al., 2007**).

La pureté des souches est révélée par des colonies homogènes ayant le même aspect extérieur (couleur, taille et forme) (**Guiraud, 2004**). Ces colonies pures sont retenues pour la suite de l'étude.

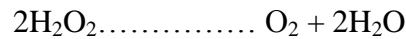
3.2.Pré-identification

3.2.1.Coloration de Gram

La coloration de Gram est un test préliminaire permet à consulter la Gram des bactéries, leur forme et son regroupement. Ce test est basé sur une coloration, décoloration et deuxième coloration. (C. DELARRAS, 2010)

3.2.2.Recherche de Catalase

Le teste de la catalase permet de vérifier si une bactérie possédé l'enzyme de la catalase ayant comme utilité de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau (H₂O) et en (O₂).



Un teste catalase jugé comme positif est observable si des bulles d'oxygéné apparaissent lorsque la colonie bactérienne bien isolé est exposé au peroxyde d'hydrogène. (N. Soleymanzadeh et al., 2016)

3.3.3.Conservation des souches

La conservation est une méthode utilisée dans les laboratoires a pour but à garder les cultures des différentes espèces microbiennes isolées. Ces cultures servent des souches de référence c'est-à-dire gardé constant l'ensemble de ces propriétés morphologique, métabolique, génétique et physiologique (A. Meyer et al, 2004).

3.3.3.a.Conservation courte durée

La méthode de conservation courte nécessite l'utilisation des tubes des milieux solides inclinés nous avons utilisés MRS solide qui est le milieu favorables pour les souches de *Leuconostoc*. Une foisensemencés à partir une culture jeune, les tubes sont placés à l'étuve pour que la croissance (24h à 30°C) débute puis, avant qu'elle ne soit trop abondante, les tubes sont placés dans un réfrigérateur à 4°C (GUIRAUD, 1998).

3.3.3.bConservation longue durée

Pour conserver dans des meilleures conditions les structures cellulaires. Il convient de congeler à la température la plus basse (souvent de -25°C à -80°C) qui arrête la croissance des micro-organismes les cultures jeunes (18-48h) ; qui vont subir une centrifugation à 3000 tr/min de la souche purifiée pendent10 min et après rinçage avec de l'eau

physiologique. La souche est congelée à -20°C dans un milieu contenant 70% de lait écrémé (enrichi par 0.05 % d'extrait de levure) et 30% de glycérol (SAMELIS et al., 1994). La culture peut être conservée plusieurs mois (Accolas et al.1997) .

4. Identification

4.1 Examen macroscopique

L'examen macroscopique est le premier examen effectué à partir de l'isolement après incubation, cet examen permet l'observation des scolonies des souches qui ont été cultivés sur des milieux gélosés MRSv en boite de pétri et aussi dans un milieu liquide MRS en tube, pour déterminer à la fin les caractéristiques culturaux de ces bactéries; leur formes, taille, aspect ... (C. DELARRAS, 2010)

4.2. Examen microscopique

Au cours d'analyse microbiologique, l'observation des bactéries vivants ou tuées et colorés à l'aide d'une microscope optique à fond claire considéré comme une étape essentiel d'identification préliminaire (CAMILLE DELARRAS,2010)

4.3. Tests biochimiques

4.3.1. Test de type fermentaire:

Ce test permet de différencier les bactéries en homofermentaires ou Hétérofermentaires. Il est effectué dans un milieu réduit le plus possible de citrate pour éviter la formation de co₂ liée à ce métabolisme particulier (Dicks et Van Vuuren, 1987) De jeunes souches préalablement préparées sontensemencées dans des tubes contenant du bouillon MRS, avec une cloche de Durham. Après incubation à 30°C pendant 24–48 heures. Le co₂ dégagé par les bactéries hétéro fermentaires s'accumule dans la cloche. (Hariri et al., 2009)

4.3.2. Etude de profil fermentaire:

La fermentation des multiples types des sucres est un caractère différentielle entres les espèces et les sous espèces de *Leuconostoc* .L'étude de la fermentation de différentes types des sures a été réalisé sur milieu gélosé MRS sans extrait de viande et additionnée au propre de Bromocrysol (BCP) comme indicateur de ph. Alors que la source de carbone a été changée selon le type de sucre utilisé au cours de l'expérience. Dans notre étude on a

utilisé les sucres suivants: L-arabinose, Glucose, Galactose, Lactose, D-Fructose, D-Saccharose, D-manitol, D-Maltose, D-Xylose, Mannose et Esculine.

Les solutions des sucres préparés à 1%, 1g de chaque sucre avec 10 ml de l'eau distillé stérile, après une bonne homogénéisation les solutions ont été stérilisés au bain marie à 100°C pendant 15min.

D'autre face, on avait des cultures lactiques jeunes, ces cultures ont été centrifugées à 4000 tours/10min, puis le culot a été rincé par l'eau distillé stérile pour l'obtention des cellules secs ensuite on a ajouté 1ml de milieu MRS BCP au culot.

Le test des sucres a été ensemencé sur plaque d'Elisa car le nombre des souches a testé est grand, chaque ligne verticale comporte un sucre qui sera utilisé par les différentes souches.

4.4.Recherche de ADH Arginine Di Hydrolase

La mise en évidence de cette enzyme l'arginine dé hydrolase (ADH) est intéressent pour la caractérisation des bactéries lactiques. Le rôle de cette enzyme est de libérer l'ammoniac à partir de l'arginine .

Ce test est effectué sur le milieu gélosé M16 BCP qui contient du lactose (2mg /ml), de l'arginine (4mg/ml), et un indicateur de pH, le bleu de bromothymol, si la couleur du milieu vire au jaune puis vers le vert (ré alcalinisation de milieu) ceci indique la présence de l'enzyme et la dégradation de l'arginine. Si elle reste jaune cela veut dire que la bactérie est ADH négative (**Guy et al., 2009**)

4.5.Production de dextrane

Le dextrane est un polymère de D-glucose qui est produit par des souches *Leuconostoc* développé dans un milieu riche en saccharose. (**M. Gavahian et al, 2010**)

La recherche du dextrane produit par *Leuconostoc* est un test différentiel permet à distinguer entre les souches productrices et non productrices du dextane, on a fait la culture sur milieu gélosé riche en saccharose qui est MSE à partir de préculture jeune et l'incubation a été à 30°C pendant 24h à 48h (**F. Sarwat et al, 2008**)

4.6. Utilisation de citrate

Certaines souches de *Leuconostoc* ont la capacité de dégrader le citrate pour produire le CO₂ grâce à un enzyme appelé citratase, cette caractere permet à différencier entre les souches *Leuconostoc*. (G. BOUREL, 2001)

La fermentation du citrate par les souches de *Leuconostoc* a été détecté par la culture des isolats sur un milieu gélosé appelé KMK (Kempner and McKay), les souches de *Leuconostoc* produisent des colonies bleu foncé grâce à la réaction avec les ions qui se trouve dans les deux réactifs ajoutés au milieu une solution de ferricyanure de potassium et la solution de citrate ferrique, alors que l'apparition de colonies blanches sur le milieu est possible et signifier l'absence de fermentation. (Bandell et al, 1998)

5. Test physiologique (Croissance dans les conditions hostiles)

5.1. Test de croissance à différentes températures :

L'incubation des cultures jeunesensemencées sur MRS liquide à différentes températures 15C°, 30C°, 37C°, 45C°, pendant 24 heures à 5 jours

5.2. Test de croissance à différentes pH :

Ce teste est réalisé en ensemencement nos cultures jeunes dans un boillon MRS de pH ajusté à 4,8 et 9,8. la croissance est appréciée par un trouble du milieu après 24h jusqu'à 48h à 30c° en comparaisant avec autre tube non ensemencé

5.3. Test de croissance à différentes concentrations de NaCl :

ce teste permet de savoir si nos bactéries ont la capacité de croitre dans deux milieux MRS liquide ; le premier est hypo salé (3%NaCl) et l'autre est hyper salé (6,5%NaCl).

les tubes sont incubé à 30c° avec un tube témoin sans sel pendant 24h, La croissance de ces bactéries se manifeste par un trouble de milieu

6. Test biotechnologique

6.1. Test d'antagonisme bactériennes

Afin de tester la capacité de nos isolats lactiques de produire une substance antimicrobienne nous avons appliqué la méthode de Fleming et al (1975). les interaction sont classer en deux catégories : les interaction positives : qui se caractérisent par la

stimulation d'un ou de plusieurs microorganismes, et les interactions négatives correspondant à une inhibition de la croissance et de l'activité métabolique (**Choisy et al., 1997**)

La symbiose est révélée par l'absence des zones d'inhibition par contre l'antagonisme se traduit par la présence de se dernière après une incubation à 37 °C pendant 18h. (**Benkerroum et al., 1993**)

A: Méthode directe de double couche (méthode de FLEMING et al., 1975)

Tout d'abord, il est nécessaire de mettre en évidence l'activité antibactérienne des souches de *Leuconostoc* étudiées. La méthode de spot accordée à **FLEMING, (1975) et TAGG et al., (1971)**, est utilisée pour la détection des inhibitions (**SCHILLINGER et LUCKE, 1989**).

Ce test consiste à déposer un volume de spot de la culture fraîche de 18h de chaque souche *Leuconostoc* (24 souches) (sur une gélose MRS). Les boîtes sont laissées à température ambiante pour permettre le séchage et la stabilisation de spot en ce point, avant de les incuber à 30°C pendant 24h.

En parallèle, une culture fraîche de bactérie pathogène à tester est préparée après une revivification, en la cultivant dans 9 ml du bouillon nutritif et incubée à 37°C pendant 18h. Après l'incubation, 9ml de gélose Mueller Hinton (MH) en surfusion sont inoculés par la souche cible. Puis, le mélange est ensuite coulé sur la couche de MRS, en contact direct avec les spots. Les boîtes sont incubées à 37°C/ 24h. Ce test est répété 2 à 3 fois pour chaque souche cible.

L'activité antibactérienne se révèle par l'apparition de zones claires autour de spots. L'inhibition est considérée positive si la zone dépasse 2 mm de diamètre (**HERNANDEZ et al., 2004**).

Le diamètre des zones d'inhibition est mesuré en millimètre et le diamètre du spot n'est pas pris en compte dans l'expression des résultats. D'autre méthode remplacé l'inoculation la préculture des souches pathogènes par à l'aide d'un écouvillon on reparti par des stries très serrées la suspension versée. Laisse sécher devant le bec benzène ensuite on ensemence par touche les *Leuconostoc* susceptibles d'avoir un pouvoir d'inhiber la croissance des bactéries cibles. On incube à 30°C/24h, pour la détermination des zones d'inhibition qui se manifeste par la présence de zones claire autour d'un trouble formée par

la croissance des souches cibles.

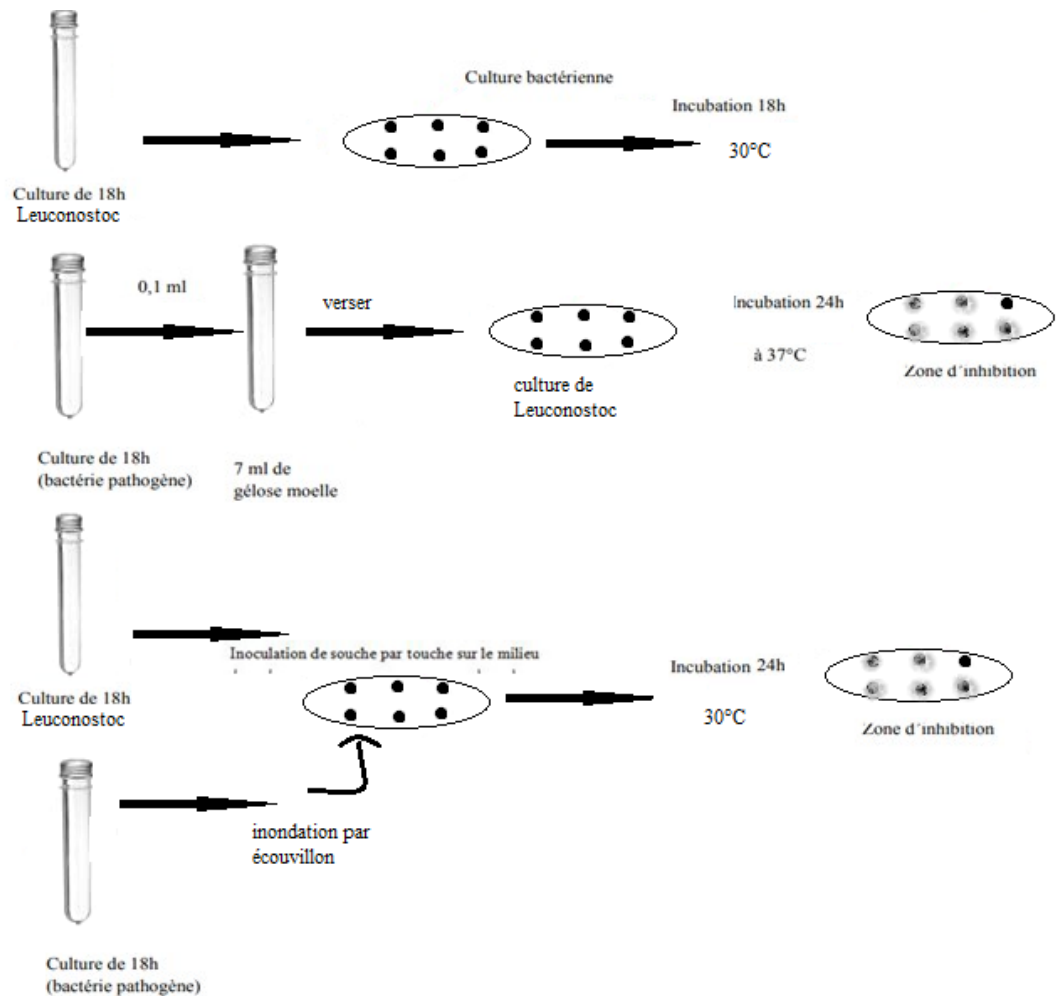


Figure 3: Méthode des spots (Fleming *et al.*, 1975)

B: Méthode de détection indirecte / Méthode des puits (BAREFOOT et KLAENHAMMER, 1983)

Parmi les techniques montrées pour la détection des souches lactiques productrices de bactériocines ; la méthode des puits qui est basée sur le principe de la capacité de ces substances à se diffuser dans le milieu de culture solide ou semi solide.

On inonde sur le milieu MRS, Miller-Hinton ou la gélose nutritive des souches pathogènes cibles (citées dans le tableau n°05). Pendant qu'on le laisse séché ; on prépare le surnageant comme suivant :

Préparation de surnageant : on centrifuge 15 ml de la suspension bactérienne préparé la veille afin d'obtenir une culture jeune 4000 tours/ 30min ensuite on neutralise le

surnageant par NaOH 4N de façon à obtenir un pH de 6,8 (l'élimination de l'effet de l'acide lactique).

On réalise quatre à cinq puits par boîte de Pétri (selon le nombre de test à réaliser) de 8 mm de diamètre, ces puits sont remplis par 50 à 60 µl de surnageant [Le premier surnageant est traité par la pepsine laissé incubé à 37°C/1h] (**pour testé la nature protéique de la substance produite par les isolats on utilise l'enzyme protéolytique à raison de 0,1g dans 1ml d'eau distillée stérile. A l'aide de micropipette on prélève 100ul de ce mélange et on le dépose sur 1ml de surnageant**). [Les trois autres surnageant sont traités à différentes températures à 70°C, 90°C et à 110°C pendant 30min], le cinquième puits est remplis par le surnageant neutre. Après incubation 24 heures à 37°C, les diamètres des zones d'inhibition apparaissant autour des puits sont mesurés.

Une inhibition est considérée positive si le diamètre est supérieur à 2 mm (THOMPSON *et al*, 1996). La mesure du diamètre d'inhibition (Zi) est effectuée selon la formule suivante:

Zi en (mm) = diamètre de la zone d'inhibition obtenue (mm) – diamètre de puits (8 mm)

Ou bien on peut les utilisés le surnageant dans les puits comme les protocoles suivants :

Précipitation des protéines

Précipitation avec le sulfate d'ammonium

Cette méthode consiste simplement à solubiliser une quantité de sulfate d'ammonium (SA) dans la solution dont on veut précipiter les protéines. Cette quantité est celle

nécessaire pour arriver a une concentration équivalente à un certain pourcentage de la quantité de SA suffisante pour saturer cette solution. C'est pourquoi il s'agit bien du % de saturation. Les protéines insolubles vont précipitées par centrifugation : donc le culot contient les protéines insolubles dans 50 % de SA et le surnageant contient les protéines solubles dans 50% de S.A. On reprend alors ce surnageant résultant pour en faire précipiter la protéine d'intérêt. (GAUTHIER, 2009)

Le surnageant neutralisé obtenu est saturé à 50% par l'ajout progressif de sulfate d'ammonium en poudre (50 g de sulfate d'ammonium pour 100 ml de solution) avec agitation modérée à 4°C plus de 48h . Après, une deuxième centrifugation de 4000 tours/

30min à 4°C est effectuée, puis on prend le surnageant afin de réaliser la méthode de détection indirecte / Méthode des puits (**BAREFOOT et KLAENHAMMER, 1983**)

Précipitation par l'éthanol

On peut facilement précipiter les protéines en présence d'éthanol 80% (EtOH), pour un volume de surnageant neutralisé 3 volume de l'éthanol en les gardant à -20°C pendant 24heures. Une centrifugation de 4000 tours/ 30min permet alors de sédimenter les protéines précipitées, le culot résultant est dissout dans 4 ml du l'eau distillé stériles (**M.MOOSAVI et al., 2009 ; S.MONTERSINO et al., 2008**).

Par la suite l'effet de ces protéines précipitées va être testé par la méthode de détection indirecte / Méthode des puits (**BAREFOOT et KLAENHAMMER, 1983**)

Ou bien, Dans des boîtes de Pétri contenant le milieu MH ou GN, qu'on ensemence par écouvillonnage par des bactéries pathogènes.

Ensuite, On dépose des petits disques de papier absorbant sur la gélose, puis on ajoute 100 µl du surnageant brut de la culture lactique à tester ou la solution (culot de surnageant qu'est précipité par le méthanol avec l'eau distillé) ou surnageant précipité par le sulfate d'ammonium.

Les boîtes sont incubées pendant 24 h à 37°C. Les disques entourés d'une zone claire d'inhibition de la souche test et ayant un diamètre supérieur à 2 mm sont considérées comme positive.

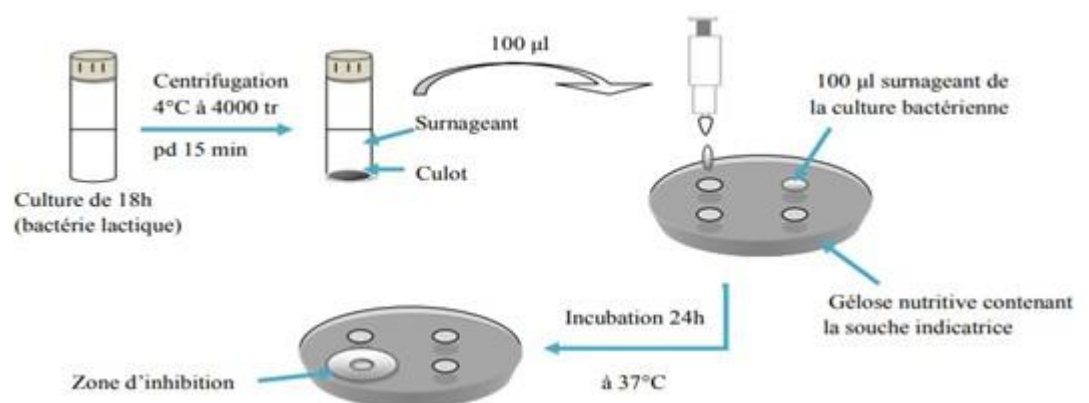


Figure 04 : Méthode des puits (BAREFOOT et KLAENHAMMER, 1983)



Résultats

Et

Discussion

1. Isolement des souches *Leuconostoc*

l'isolement a été fait à partir des différents produits laitiers (lait de chèvre, lait de chamelle, lait de Brebis, lait de vache, Dhan, J'ben et klila), sur milieu gélosé MRS sélectif en ajoutant un agent inhibiteur qui est la vancomycine, nous a permis de sélectionner 155 souches ayant l'aspect des colonies recherchées (colonies de forme lenticulaire ou circulaire de petite taille de couleur blanchâtre)



Photo 01 : aspect des colonies après 24h d'incubation à 30°C

Ensemencement en profondeur

la croissance des micro-organismes dans le lait peut être influencée par divers facteurs du milieu ou de l'environnement, comme le pH, la température, la quantité d'eau libre, la concentration en nutriments ou la composition de lait qui est affectée par plusieurs facteurs, comme l'âge de l'animal, stades de lactations, l'alimentation, la race la présence de substances antimicrobiennes et les interactions entre micro-organismes. Ce qui explique l'absence de *Leuconostoc* dans certains produits et leur présence dans autre et pour ça on a choisi plusieurs échantillon qui diffèrent (Ueli Wyss, 2014).

2. Caractérisation morphologique

a- Caractères macroscopiques

Sur milieu solide MRS on a observé des colonies de petites taille de 0.5 à 1mm blanchâtres, en forme lenticulaire ou circulaire (photo 02), Alors que la culture sur milieu liquide MRS a nous permis l'observation de la croissance bactérienne sous forme d'un trouble au fond de la tube mais la partie supérieur de la tube reste claire (photo 03).



Photo 02: aspect des colonies *Leuconostoc* pure après 24h d'incubation

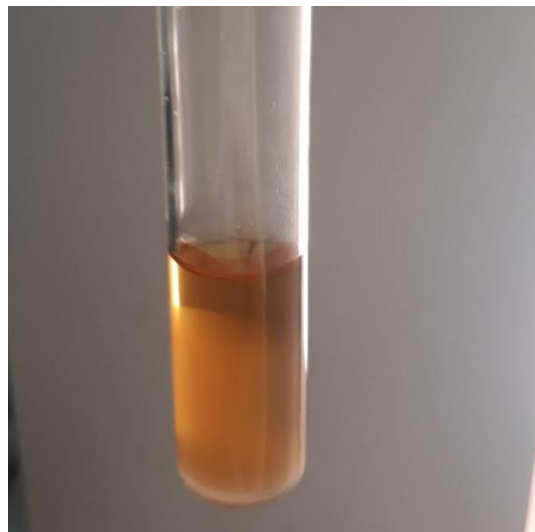


Photo 03 : aspect des colonies *Leuconostoc* après 18h d'incubation sur bouillon MRS

On a réalisé des cultures en masse en fonction des caractéristiques aéroanaérobies facultatifs des bactéries lactiques, après la comparaison des anciens travaux on confirmer partiellement que ces isolats appartient aux bactéries lactiques (N. HASNAL, 2015).

L'accumulation du trouble dans le fond du tube explique les besoins des isolats en oxygène, tandis que les *Leuconostoc* aéro anaérobies facultatifs elles poussent un peu loin au surface (N. HASNAL, 2015).

Caractères microscopiques

L'examen microscopique des isolats a donné des bactéries catalase négatif (photo 04) et Gram positif le test de Gram a permis l'observation des cellules lactiques, en forme coccobacille, leur mode de regroupement est en chaînette de nombre paire (photo 05).



Photo 04: test Catalase sur lame

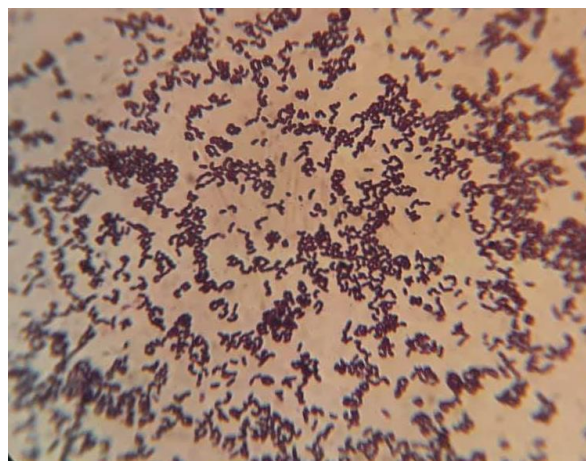


Photo 05 : observation des *Leuconostocs* sous microscope

La catalase est une enzyme synthétisée par des microorganismes intervient dans la décomposition du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 en eau et en oxygène qui observé sous forme des bulles rapidement sur la lame. Alors que, le manque de catalase est évident par un manque ou une faible production de bulles c'est le cas de *Leuconostoc*. (A. KUMAR et al., 2012)

Le violet de Gentiane est pénétré et stabilisé dans le cytoplasme des cellules ce qui permet l'observation la Gram, la forme et la mode de regroupement sous la microscope optique.(E GEHAN et al., 2014)

- 1. Caractérisation physiologique et biochimique**
- 1. Tests biochimiques**
- 1. Test de type fermentaire**

L'ensemencement des pré-cultures dans des tubes contenant du bouillon MRS, avec une cloche de Durham a permis la distinction entre les souches *Leuconostoc* on a observé l'apparition du trouble dans les tubes et aussi le flottement du cloche qui est chargé en CO_2 (Photo 06).

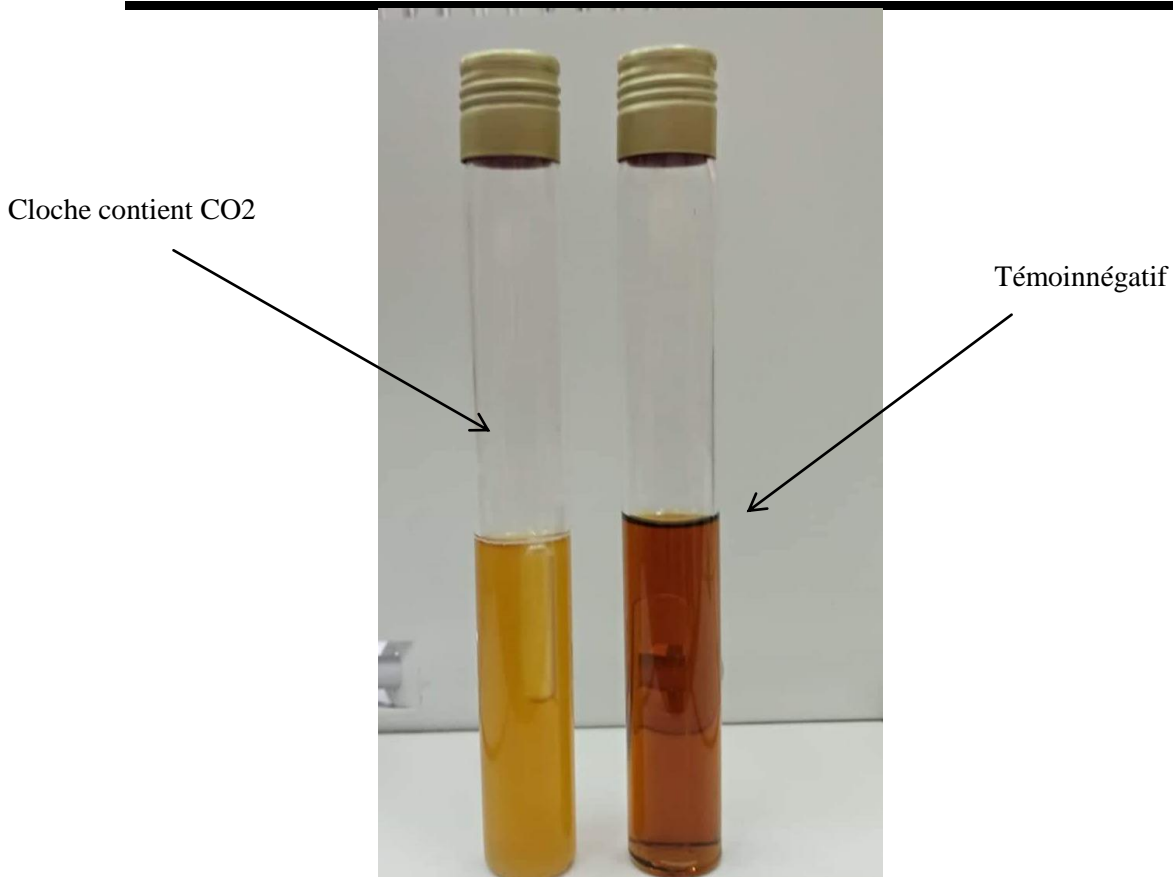


Photo 06 : type fermentaire sur milieu MRS liquide avec cloche de Durham

Après la culture des isolats dans un bouillon MRS on a observé une trouble avec le flottement de cloche que signifier la multiplication des souches et la dégradation du glucose de milieu et la production du gaz carbonique CO₂ qui remplit la cloche de Durham, donc ces souches sont hétérofermentaires et cette caractère est spécifique pour les *Leuconostocs*.(M. VERMOREL1 et al., 2008)

2. Etude de profil fermentaire

La fermentation des multiples types des sucres est un caractère différentielle entres les espèces et les sous espèces de *Leuconostoc*. Pour la différenciation entre elles on a utilisé le milieu MRCBCP avec différents source de carbone. Les résultats de test est dans tableau suivant (Tableau 04), (photo 07).

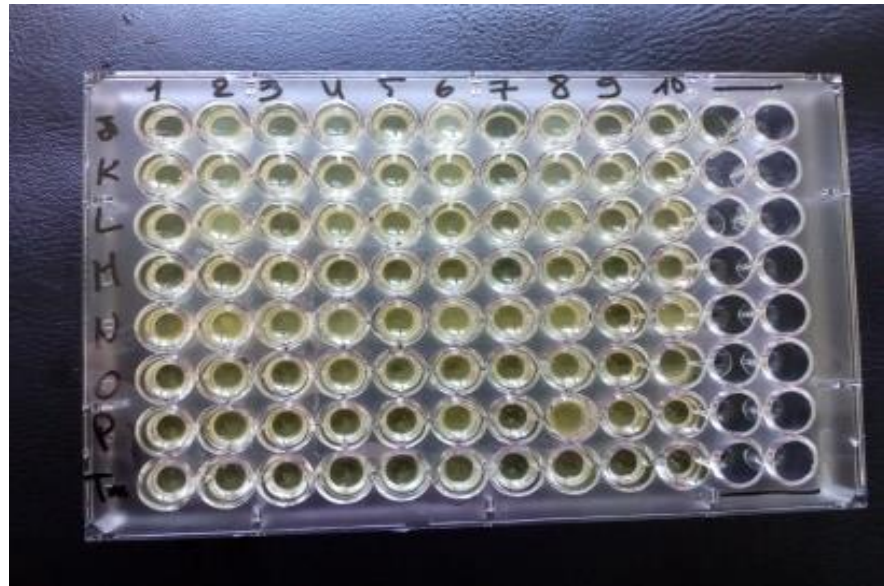


Photo 07: test des sucres

Le profil fermentaire permet mieux identifier l'espèce et la sous espèce de nos isolats en utilisant le milieu MRS BCP contenant le pourpre de bromocrésol (indicateur de pH) ; le virage de couleur au jaune de ce dernier résulte de la fermentation de l'un des douze sucre utilisés dans ce test. (**Badis et al.,2005**)

Tableau 04 :résultats de test des sucres

souche	L-arabinose	D-glucose	D-Galactose	Lactose	D-Fructose	D-Saccharose	D-Manitol	D-Maltose	Mannose	D-Xylose	esculine
C1	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
C2	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
C10	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	±
C12	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
C13	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
C15	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
C16	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	±
C18	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	±
C21	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
C23	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+
C34	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-
C39	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-
C41	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+
C43	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	±
F49	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-
F55	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-
F63	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-
F64	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-
F65	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
F69	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-
F70	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-
F71	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-
V67	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+

1.

L'identification de l'espèce bactérienne des souches isolées a été réalisée par l'étude du profil de dégradation de 10 sucres (Mannose, Xylose, Arabinose, Manitole, Lactose, Maltose, Fructose, Saccharose, Galactose, Glucose) sur milieu MRS-BCP sans extrait de viande et dépourvu du sucre et contient un indicateur de PH (**Badis et al., 2005**).

Le résultat positif révèle par la dégradation de sucre qui provoque une acidification de milieu, et la couleur de ce dernier va virer vers le jaune (**Hansal, 2015**).

Les résultats obtenus montrent la présence de virage de couleur de milieu vers le jaune sauf quelques exceptions. Donc les souches qui ont été isolées ont la capacité de se développer à partir différents source de carbone.

Recherche de ADH Arginine DiHydrolase

La culture de nos souches sur M16BCP a donné des colonies jaunes ou bien le jaunissement du milieu et d'autres colonies vertes

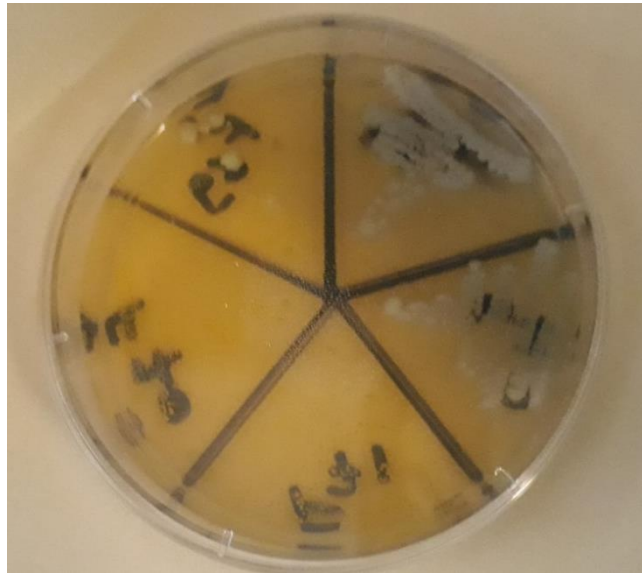


Photo 08 : test de dégradation de l'Arginine

Pour les colonies jaunes, les cellules n'ont pas la capacité à dégrader l'Arginine, elles ont métabolisé les sucres du milieu uniquement et par conséquent le milieu devient jaune à cause des acides produites le pourpre de Bromocrésol a viré de vert vers le jaune, et par contre les autres colonies ont dégradé l'Arginine et le milieu reste basique, l'incapacité à dégrader l'Arginine est un caractère spécifique aux *Leuconostoc* car elles n'ont pas l'enzyme de l'Arginine Dihydrolase. (**V. MOLLER, 1955**).

1. Production de dextrane

La culture sur milieu MSE a permis l'obtention des colonies visqueuses, gluantes de grand taille. (Photo 09).

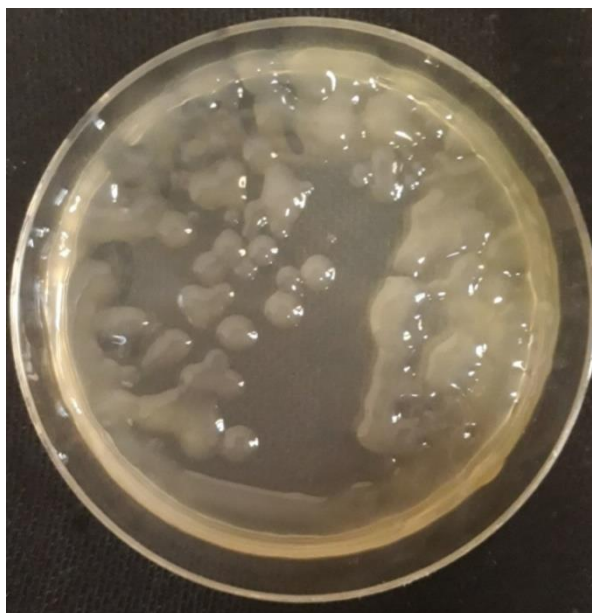


Photo 09: production de dextrane par *Leuconostoc*

L'incorporation de dextrane dans les produits de boulangeries en industrie alimentaire améliore la texture et le volume de pain et il est aussi utilisé comme un additif dans des plusieurs produits (VETTORI et al., 2012).

Sur milieu MSE qui est un milieu sélectif permettant la recherche et le dénombrement des *Leuconostoc* dans le lait, les produits laitiers et les aliments sucrés. La production de dextrane a été vérifiée sur milieu MSE dont lequel ce genre de bactéries utilisent le saccharose de milieu pour synthétiser des exopolysaccharides (dextrane) qui donnent aux colonies un aspect gélatineux (HANSAL, 2015).

On a obtenue après 48h d'incubation des colonies larges, visqueuses, gluantes et transparentes sous deux forme:

a-De grosses colonies gluantes, devenant rapidement confluentes au fur et à mesure que l'incubation se prolonge; Reflètent l'aspect macroscopique de *Leuconostoc mesenteroides subsp. Mesenteroides*.

b-De petites colonies (2 mm environ de diamètre) bombées et adhérant fortement à la surface de la gélose. Reflètent l'aspect macroscopique de *Leuconostoc mesenteroides subsp.dextranicum*.

Ce caractère important nous a permis de différencier entre les espèces de *Leuconostoc* et de supposer leurs appartenance à une des deux espèces productrices de

dextrane: *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Mesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*, ce qui a été montré par (MAYEUX et ELLIKER, 1962).

On peut dire que la production de dextrane à partir de dégradation de saccharose a été observée chez la plupart des souches isolées de lait de chèvre, lait de vache et du fromage, La capacité de production de dextrane rend ce genre très utilisable dans l'industrie alimentaire grâce à ces propriétés technologiques (épaississantes, La production de dextrane sur milieu MSE est un caractère important pour différencier entre les espèces de *Leuconostoc* : *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* qui apparaissent de grosses colonies gluantes, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* qui manifestent sous la forme d'une petite colonie (Mayeux et al.1962).

1. Test de citrate

La culture de nos souches sur milieu KMK a permis l'observation des colonies bleues. (Photo 10).



Photo 10 : hydrolyse de citrate après 24 h

les souches capables de fermenter le citrate par la réaction entre les ions de fer et de ferrocyanure de potassium et manifestent sous des colonies bleues contrairement les souches qui ne fermentent pas le citrate donnent des colonies blanches (Guirraud,1998)

2. Tests physiologiques

Les tests physiologiques des isolats ont été fait sur différents milieux, MRS liquide à concentration 3%, 6.5% du NaCl pour les test de salinité, MRS liquide aussi pour le test de température à différents degré Celsius 4,10,37,44,63°C. Ensuite, la culture des isolats sur MRS liquide à pH différents 4.8 et 9.8.

Toutes nos souches isolées ont poussés à 15C°,30C°, 37C° mais pas à 4C° et 45C° se qui confirme leur caractère mésophile . la thermorésistance a été aussi testé à 63,5 C° pendant 30 min dont la croissance de nos souches a resté négatives.les leuconostoc sont généralement mésophiles , avec une température optimale de croissance de 25 C° à 30C°.(Garvie ,1984)

On a observé une croissance des isolats sur milieu MRS liquide du pH 6,5 et non pas à pH 4,8 ; selon **Mc Donald et al.,(1990)**

les *leuconostoc* laitiers se développent le mieux à un pH proche de celui du lait et sont inhibées à un milieu acideNos souches ont montré une croissance sur milieu MRS à 3% de NaCl et non pas à MRS de Na Cl 6,5% (**Dellaglio et al .,1994**).

Tableau 05: les résultats des tests biochimiques et les tests physiologiques

Souche	Gram	Catalase	Production du CO2	Croissance en présence NaCl		Croissance pH différent		Croissance en température différents					Production de flexirane	Hydrolyse de l'ADH	Utilisation de citrate
				3%	6.5%	4.8	9.8	4°	10°	37°	45°	63.5°			
F49	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
F55	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
F63	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
F64	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+
F65	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
F69	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+
F70	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
F71	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
C1	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+
C2	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+
C10	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
C12	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
C13	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
C15	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+
C16	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+
C18	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+

C21	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-
C23	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+
C34	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
C39	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
C41	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+
C43	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
V67	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+

Après la comparaison avec le tableau de référence on a sélectionné les noms de nos souches, les résultats sont dans le tableau 06:

Tableau 06: répartition de différents souches isolés

Echantillon	Souche	Nomenclature
Fromage traditionnel	F49	<i>Ln.mesenteroides subsp dextranicum</i>
	F55	<i>Ln.fallax</i>
	F63	<i>Ln.fallax</i>
	F64	<i>Ln.fallax</i>
	F65	<i>Ln.mesenteroides subsp mesenteroides</i>
	F69	<i>Ln.mesenteroides subsp dextranicum</i>
	F70	<i>Ln.mesenteroides subsp mesenteroides</i>
	F71	<i>Ln.mesenteroides subsp mesenteroides</i>
Lait de chèvre	C1	<i>Ln.mesenteroides subsp mesenteroides</i>
	C2	<i>Ln.mesenteroides subsp mesenteroides</i>
	C10	<i>Ln.gelidum</i>
	C12	<i>Ln.fallax</i>
	C13	<i>Ln.mesenteroides subsp mesenteroides</i>
	C15	<i>Ln.mesenteroides subsp mesenteroides</i>
	C16	<i>Ln.carnosum</i>
	C18	<i>Ln.fallax</i>
	C21	<i>Ln.mesenteroides subsp cremoris</i>
	C23	<i>Ln.fallax</i>
	C34	<i>Ln.mesenteroides subsp dextranicum</i>
	C39	<i>Ln.mesenteroides subsp cremoris</i>
	C41	<i>Ln.carnosum</i>
	C43	<i>Ln.citreum</i>
Lait de vache	V67	<i>Ln.mesenteroides subsp dextranicum</i>

3. Test biotechnologique

3.1. Test d'interactions bactériennes

3.1.1. Méthode Directe

Après l'ensemencement de 24 souches lactiques par touche sur le milieu MRS solide dans le but de cribler et de sélectionner celles qui possèdent une activité antimicrobienne.

Méthode directe de double couche est une méthode de criblage des bactéries lactiques ayant une activité antimicrobienne (**méthode de Fleming *et al.*,1975**).

La souche teste et la souche cible vont être en contact directe à 30 C° pendant 18h à montrer que 17 souches des bactéries lactiques testées ont le pouvoir d'inhiber les bactéries multirésistantes. Le contact entre eux nous permet d'observer un halo lumineux sur la zone de répulsion dite une zone d'inhibition. La zone claire est l'indice de l'inhibition qui est due à déférentes facteurs (les Acides organiques, le diacétyle, le peroxyde d'hydrogène et/ou les bactériocines) (**Schillinger *et al.*,1996**).

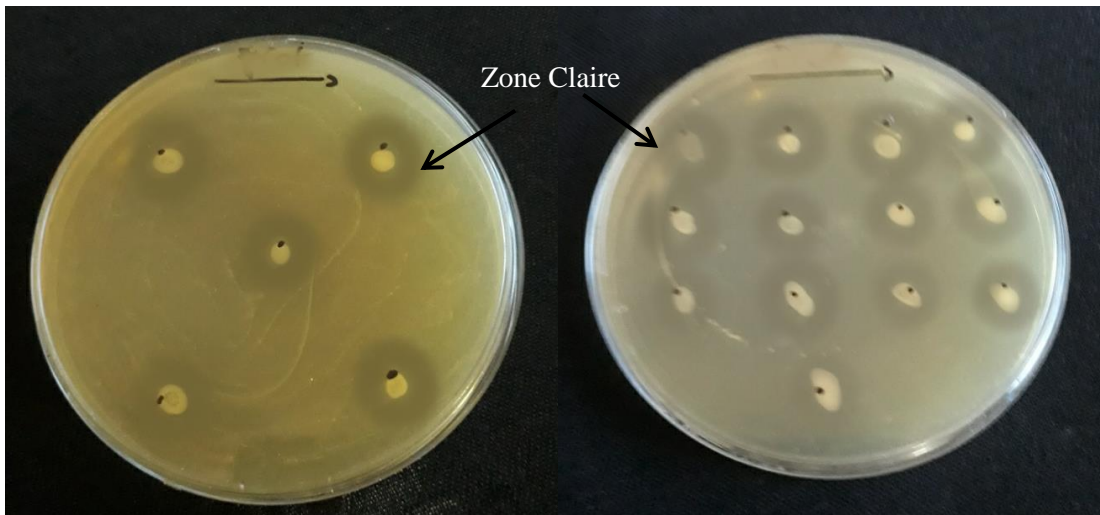


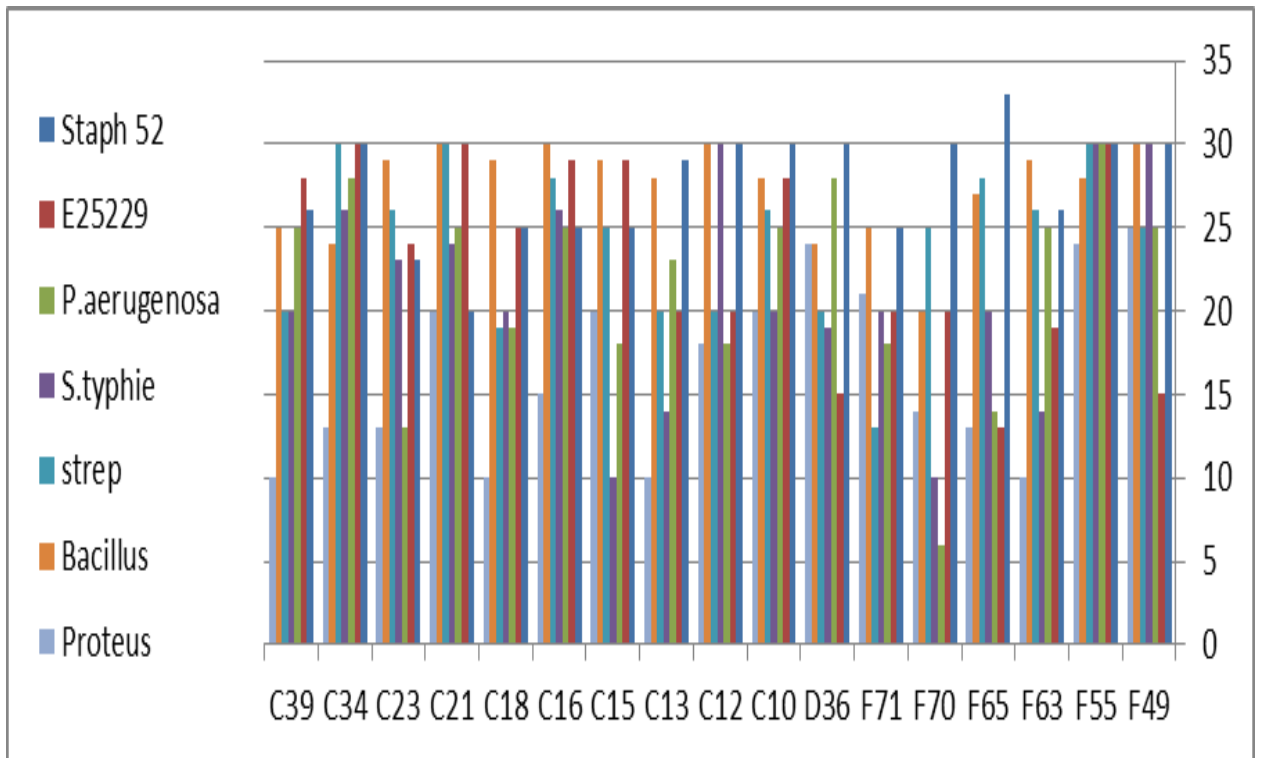
Photo 11 : méthode direct de double couche après 18h d'incubation

Les 17 souches de *Leuconostoc* ont l'activité antimicrobienne contre les bactéries pathogènes à testées cette activité est apparu comme des zones avec des différentes diamètres le tableau (Tableau 07) suivant représente les résultats de ce test.

Tableau 07 : résultats de test d'interaction direct. (Les valeurs en millimètre)

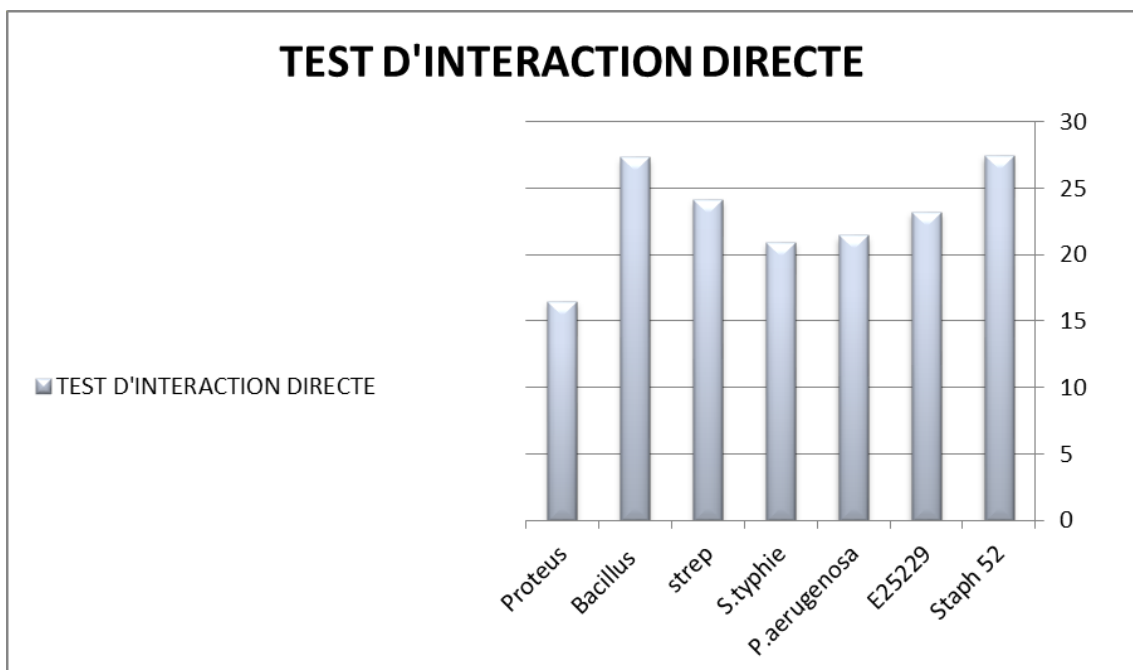
	F49	F55	F63	F65	F70	F71	D36	C10	C12	C13	C15	C16	C18	C21	C23	C34	C39
<i>Staph 52</i>	30	24	26	28	24	25	30	23	24	29	25	30	25	30	23	30	26
<i>E25229</i>	15	30	19	13	20	20	15	28	20	20	29	29	25	30	24	30	28
<i>P.aerugenosa</i>	25	30	25	14	6	18	28	25	18	23	18	25	19	25	13	28	25
<i>S.typhie</i>	30	32	14	20	10	20	19	20	30	14	10	26	20	24	23	26	20
<i>Strep</i>	25	30	26	28	25	13	20	26	20	20	25	28	19	30	26	30	20
<i>Bacillus</i>	30	28	29	27	20	25	24	28	30	28	29	30	29	30	29	24	25
<i>Proteus</i>	25	24	10	13	14	21	24	20	18	10	20	15	10	20	10	13	10

L'histogramme suivant récapitulé les résultats de tableau



On observe que les valeurs des zones d'inhibitions convergentes mais certains souches ont représenté une meilleur activité selon l'histogramme on peut dire que F55, F49, C21, C34, C10 sont les souches de *Leuconostoc qui ont* la capacité à défendre contre les bactéries indésirables par leur différents moyen.

L'histogramme suivant récapitulé les moyennes des résultats de tableau



On observe que la croissance de la majorité des bactéries pathogènes a été inhibée, les diamètres d'inhibition convergents mais la majorité des souches de *Leuconostoc* ont mieux activité inhibitrice contre *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* que les autres bactéries indésirables.

3.1.2. Méthode indirecte Méthode de detection indirecte/Méthode des puits (Barfoot et Klaenhammer,1983)

L'objectif de ce teste est de déterminer la nature des substances active; On observe des zones d'inhibition autour des puits lorsqu'on a utilisé le surnageant des souches sélectionnée qu'ont une activité contre les bacteries pathogènes .**Photo**

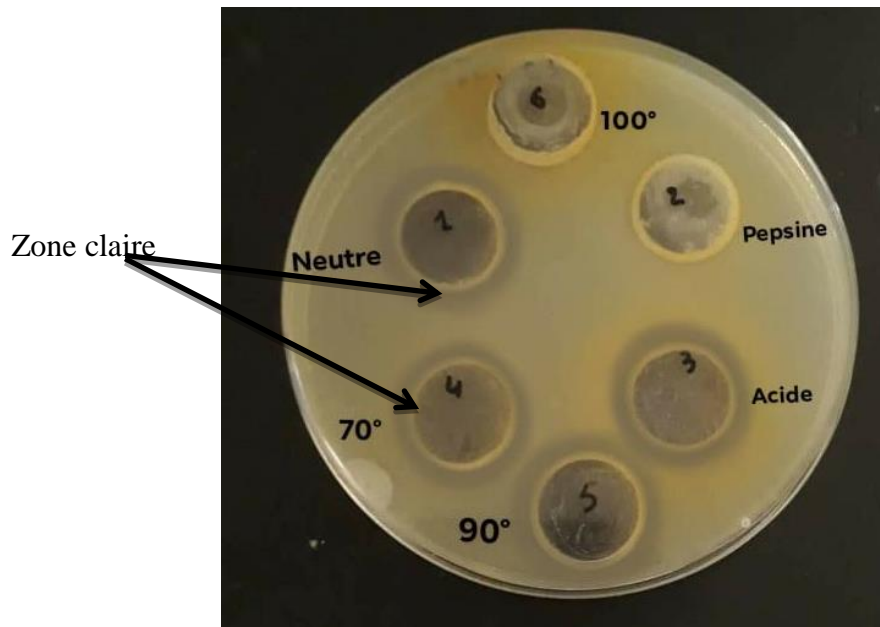


Photo 12 : méthode indirect après 18h d'incubation

Ce test a été réalisé sur tous les bacteries testées en fonction de leur inhibition remarquable dans les testes precedents. Les bacteries lactiques peuvent produire des substances inhibitrices déferents des bactériocines. On utilise le surnageant pour confirmer qu'il y a une substance produite. Pour rechercher si la cause d'inhibition est due à une substance de nature proteique ou au moins dont la partie portante cette activité est proteique on a éliminé deux cause d'inhibition; l'acidité et le H₂O₂ (en utilisant les bacteries catalase positive)

Les bactéries lactiques produisent des acides organiques tels que l'acide lactique et acétique (**Kihal et al,2006**) qui se libère dans le milieu de culture de ce qui conduit à l'acidification et qui peuvent être une cause principale d'inhibition des souches indésirables. La neutralisation de surnageant par le NaOH nous a permis de stabiliser le pH et donc d'exclure l'effet de l'acidité qui présente un pouvoir antimicrobien.

Labioui et al.(2005) confirme ces résultats avec leur test.

Une inhibition remarquée même après le chauffage (70C° ,90C°,110C°)qui veut dire que la substance résiste à la température (**Lachance,2000**)

Une disparition de la zone d'inhibition après le traitement du surnageant avec le pepsine, ceci indique que l'agent inhibiteur est sensible aux enzymes protéolytiques.**Savado** **et al.(2004),Hernandez (2005)et Mami (2013)**ont rapporté des résultats similaires à ceux obtenus dans ce travail

En fin , d'après les résultats de la recherche de pouvoir antimicrobien des bactéries lactiques; on suggère que cette bactériocine secrétée par les genres testés, *Leuconostoc* , *Lactococcus*, *Enterococcus* appartient à la classe 2 qui renferme les bactériocines thermorésistantes (**Klaenhammer,1988**)



Conclusion

Conclusion

Les bactéries lactiques occupent une place importante dans les industries agroalimentaires. Ce sont des Gram positives non pathogènes. Elle regroupe un ensemble des espèces hétérogènes productrices d'acide lactique. Dans l'industrie alimentaire surtout l'industrie laitière et la fermentation de nombreux autres produits alimentaires (Saumurage des légumes, boulangerie, saurissage des poissons, fabrication du vin...) elles interviennent comme flore technologique pour l'amélioration de la qualité technologique, la qualité organoleptique et l'inhibition de la flore d'altération et des germes pathogènes par la production de substances inhibitrices.

Sa fermentation des glucides en acide lactique diminue le pH du milieu favorable à la conservation des aliments. Elles ont une capacité d'antagonisme (compétition sur les substances si les conditions sont favorables), ou la fabrication de substances inhibitrices (bactériocines telles que la nisine)

Les nouvelles recherches ont montré que les souches appartenant au genre *Leuconostoc* ont la capacité d'inhiber les bactéries pathogènes

Dans notre travail on a fait des tests physiologiques et biochimiques nous a permis d'identifier les 17 souches de *Leuconostoc* isolés de 150 souches d'isolement. Elles sont de Gram positif et catalase négative et dépourvues de l'arginine dihydrolase.

Le but de ce travail est de sélectionner des souches de *Leuconostoc* à partir de différents biotopes en utilisant le MRS additionné à la vancomycine pour sélectionner les *Leuconostoc* qui résistent à cette antibiotique contrairement aux autres bactéries lactiques. Et d'étudier l'activité antibactérienne de *Leuconostoc* isolé et la détermination de ces substances inhibitrices par les méthodes d'interactions de ces souches productrices et des germes pathogènes Gram positif (*Listeria Sp* et *Staphylococcus aureus*) et des Gram négatif (*E. coli*)

De nos jours, l'intérêt de l'emploi de bactéries lactiques productrices de substances inhibitrices a suscité beaucoup de recherches grâce à la résistance des bactéries pathogènes (*Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Bacillus*....) à l'antibiothérapie a orienté l'industrie pharmaceutique vers la découverte de nouvelles molécules antimicrobiennes comme les bactériocines pour des applications médicales.

Le but de cette recherche consiste à étudier l'activité antibactérienne de certaines

souches de *Leuconostoc* à l'égard de quelques bactéries pathogènes qu'est basé sur la sélection des souches productrices des substances antimicrobiennes et la détermination de la nature de ces substances inhibitrices par la méthode des interactions de ces souches productrices et les germes pathogènes.

Les souches de *Leuconostoc* utilisées dans cette étude ont été isolées à partir de fromage traditionnel (J'ben) et autre de différente nature de lait

Nous avons essayé de montrer que tous les *Leuconostoc* utilisés dans ce travail produisent une activité antimicrobienne contre les bactéries pathogènes sur le milieu solide (MH et GN).

Nous avons des souches pures qui sont capables de produire des substances antimicrobiennes permettant d'éliminer la croissance des germes cibles pathogènes (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus sp*, *Klebsiella sp*)

Par la suite, nous avons déterminé la nature biochimique de ces substances inhibitrices par traitement de surnageant neutralisé à différentes températures (70°C, 90°C et 110°C) pendant 30min et par des enzymes protéolytiques (pepsine) en adoptant la

méthode de diffusion sur milieu solide (méthode de puits). On a constaté que ces composés étaient de nature protéique et se localisent dans les fractions extracellulaires parce que les zones d'inhibition ont été détectées lors de traitement de surnageant des bactéries lactiques et non pas le culot bactérien.

La mesure de diamètres des zones d'inhibition sur la culture de la souche cible a révélée une variation des résultats pour chaque traitement ce qui nous a laissé suggérer que ces bactériocines appartiennent à la classe II –bactériocine like-.

Références bibliographiques

- ADAMS M.R. et HALL C.J. 1988. Growth inhibition of food borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. *Int. J. Food Sci. Technol.* 23: 287-292.
- AHOYO A.T., BABA-MOUSSA L., ANAGO A.E., AVOGBE P., MISSIHOUN T.D., LOKO F., PREVOST G., SANNI A. ET DRAMANE K. 2007. Incidence d'infections liées à *Escherichia coli* producteur de β -lactamase à spectre élargi au Centre hospitalier départemental du Zou et Collines au Bénin. *Médecine et maladies infectieuses*.
- ANDERSSON R. 1986. Inhibition of *Staphylococcus aureus* and spheroplasts of gram- negativebacteria by an antagonistic compound produced by a strain of *Lactobacillus plantarum*. *Int. J. Food Microbiol.* 3:149-160.
- ANDRERNONT, (1997) Laboratoire de Bactériologie, Groupe Hospitalier Bichat-Claude-Bernard et CHU Xavier-Bichat, Université Paris VII, 46, rue Henri-Huchard, 75018 Paris, France
- AROUS, A. RAMNATH, M., S. GRAVESEN, J. W. HASTINGS, AND Y. HECHARD. (2004). Expression of *mptC* of *Listeria monocytogenes* induces sensitivity to class IIa bacteriocins in *Lactococcus lactis*. *Microbiology* 150:2663–2668.
- AVRIL J.L., DABERNAT H., DENIS F. ET MONTEIL H. 2000. *Bactériologie clinique*. 3ème édition. Ellipses édition marketing S.A. Paris.
- AXELSSON L.T., CHUNG T.C., DOBROGOSZ W.J. et LINDGREN S.E. 1989. Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microbiol. Ecol. Health Dis.* 2:131-136.
- *Bacteria: Microbial and Functional Aspects*, 3rd ed. Marcel Dekker, New York. 375–
- BADIS A., LAOUABDI-SELLAMI N., GUETARNI D., KIHAL M. ET OUZROUT R., 2005. Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales «Arabia et Kabyle». *Sci. Technol.*, 23: 30-37.
- BAREFOOT S.F. ET KLAENHAMMER, T.R. (1983). Detection and activity of lacticin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45
- :1808- 1815.
- BAUER, R ET DICKS, L. M. (2005). Mode of action of lipid II-targeting antibiotics. *Int. J. Food Microbiol. Rev.* 101: 201-216.
- BENDALI F. (2009). Criblage de souches de bactéries lactiques douées d'activité antagoniste à l'égard de *Listeria monocytogenes*. Thèse de Doctorat en Microbiologie. Université A/MIRA de Bejaia. 130p.
- BERCHE P. 2003. *Bactériologie systématique D.C.E.M.* 1. Faculté de médecine Necker- Enfant malade. Sur le lien : www.medix.free.fr/.../bacterie-diarrheeague.
- BERGEY'S MANUAL TRUST, 2001–2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1–5, 2nd ed. Springer-Verlag, New York
- BERRY E.D., LIEWEN M.B., MANDIGO R.M. ET HUTKINS R.W. 1995. Bial activities among Bulgarian lactobacilli strains. *J. Culture Collections.* 2: 15-

20. Biosynthesis and utilisation of folic acid and vitamin B12 by lactic cultures in skim milk. *J. Dairy Sci.* 67: 1169-1174.
- BONACORSI S., HOUDOIN V. ET BINGEN E. 2001. Facteurs de virulence associés à
 - E. coli responsable de méningite néonatale. Paris, France.
 - BOTTAZZI V. et DELLAGLIO F. 1967. Acetaldehyde and diacétyle production by
 - *Streptococcus thermophilus* and other lactic streptococi. *J. Dairy Res.* 34: 109-113.
 - BOUDJAIB S. (2013). Etude physico-chimique du produit laitier du sud Algérien « Jben » recherche du pouvoir antimicrobien des bactéries lactiques. Mémoire de Master en Biologie. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers. Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen. 91p.
 - BOUHAIRI Soraya, 2017. *Bacillus subtilis* : caractères et application. Thèse de doctorat. Université Mohamed V- Rabat.
 - BOUKADIDA J., SALEM N., HANNACHI N., MONASTIRI K. ET SNOUSSI N. 2002. Exploration génotypique d'une bouffée épidémique nosocomiale néonatale à *Klebsiella pneumoniae* productrice de B-lactamase à spectre étendu. Editions scientifiques et médicales Elsevier SAS.
 - BROUGHTON J TUNELI A. ET DELVES-. (1998). International acceptance of nisin as a food preservative. *Int. Dairy. Fed. Bull.*, 329, 20-23
 - BYCZKOWSKI J. et GESSNER T., 1988. Biological role of superoxide ion radical. *Int. J. Biochem.* 20: 569-580
 - CALVEZ. S ; BELGUESMIA. Y ; KERGOURLEY. G.(2009). in bactériocines : de la synthèse aux applications in bacteries lactiques : physiologique , métabolisme, génomique et applications industrielles édition : Economica .2009. p 100-122.
 - CAPLICE, E., FITZGERALD, G. F., 1999. Food fermentation: role of microorganismes in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology* 50, 131- 49.
 - CARINE. D ; TONART. P., 2009. Les bactériocines des bactéries lactiques caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. BASE. VOLUME 13.
 - CARRÈRE A. ET NORDMANN P. 2009. *Klebsiella pneumoniae* CTX-M-15 : vers une modification de l'épidémiologie des β -lactamases à spectre étendu. *Pathologie Biologie*.
 - CASTALA, E., MONTEL, M. C., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The
 - *Lactococcus* genus. *International Journal Food Microbiology* 126, 271-273.
 - CETINKAYA, Y., FALK, P. & MAYHALL, C., 2000. Vancomycin-Resistant Enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*, Volume 13, pp. 686- 707.
 - CHATTERJEE, C., PAUL, M., XIE, L., AND VAN DER DONK, W. A. (2005)
 - Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chem Rev.* 105: 633-684.
 - CHOUDER. NEDJMA, 2006. Contribution à l'étude de flores intentionnelles des poulets conventionnels sains. Mém: magister en médecine vétérinaire

- CHU-PS Pitié-Salpêtrière. 2003. Bactériologie DCEM1. Université PARIS
- CINTAS L.M., HERRANZ C., HERNANDEZ P.E., CASAUS M.P., NES I.F. ET HERNANDEZ P.E. 2001. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Food Sci. Technol. Int. 7: 4, 281-305.
- COLLINS, M. D., WILLIAMS, A. M. AND WALLBANKS, S. (1990). The phylogeny of Aerococcus and Pediococcus as determined by 16S rRNA sequence analysis: description of Tetragenococcus gen. nov. FEMS Microbiology Letters 70, 255-262.
- COLLINS, M.D., FARROW, J.A., PHILLIPS, B., FERUSA, S. AND JONES, D. (1987) Classification of Lactobacillus divergens, Lactobacillus piscicola and some catalase-negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus, Carnobacterium. International Journal of Systematic Bacteriology 37, 310-316.
- CONDON S. 1987. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. FEMS Microbiol. Rev., 46: 269-280. Coryniformis strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal
- DAGNRA A.-Y., AKOLLY K., GBADOE A., AHO K. ET DAVID M. 2007. Émergence des souches de salmonelles multirésistantes aux antibiotiques à Lomé (Togo). Médecine et maladies infectieuses.
- DE VUYST L. ET VANDAMME E. J. (1994). A bacterial potential of lactic acid bacteria. Dans: Bacteriocin of lactic acid bacteria. Ed. Blacki Academic & Profitionel, Londre.
- DEEGAN L.H., COTTER P.D., HILL C. ET ROSS P. 2006. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. Int. Dairy J. 16: 1058-
- DEEGAN L.H., COTTER P.D., HILL C. ET ROSS P. 2006. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. Int. Dairy J. 16: 1058-1071.
- DEEGAN. L. H; COTTER. P. D; HILL. C; ROSS. P. (2006). Bacteriocins: biological tools for bio preservation and shelf-life extension. International. Dairy. Journal.
- DELARRAS C. 2007. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Edition Techniques et Documentation. Paris. p 248-296.
- DELLAGLIO F., DE ROISSARD H., TORRIANI S., CURK M.C. ET JANSSENS D., 1994. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques (De Roissard H. et Luquet F.M.).Ed., Lorica, Uriage. 1 :pp. 25-116.
- DESMAZEAUD M., 1998. Bactéries lactiques et qualité des fromages. Lab. De recherches laitières INRA. 1-3.
- DICKS, L. M. T., HEUNIS, D. A., VAN STADEN, D. A., BRAND, A., SUTYAK NOLL, K., AND CHINKINDAS, M. L. (2011) Medical and personal care applications of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. In: Drider, D., and Rebuffat, S. (Eds). Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications. Springer Verlag. Stellenbosch, South Africa. pp 391-421.
- DICKS, L. M. T., HEUNIS, D. A., VAN STADEN, D. A., BRAND, A., SUTYAK NOLL, K., AND CHINKINDAS, M. L. (2011) Medical and personal care

- applications of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. In: Drider, D., and Rebuffat, S. (Eds). *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Springer Verlag. Stellenbosch, South Africa. pp 391-421.
- DICKS, L. M., DELLAGLIO, F. AND COLLINS, M. D. (1995). Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45, 395-397.
 - DIEP, INGOLF F., NES, DZUNG B, ET HOLO H., (2007). Bacteriocin Diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. Laboratory of Microbial Gene Technology, Department for Chemistry, Biotechnology and Food Science, Norwegian University of Life Sciences, N1432 Ås, Norway. Vol4: 1198
 - DORTU, C, AND P THONART. "Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et." *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 13 (2009): 143-154.
 - DORTU, C. ET THONART, P. (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 143-154.
 - DRIDER .D ; PREVOST. H. (2009). Bactéries lactiques : physiologie, métabolisme, génomique et applications industrielles Edition : Economica
 - DRIDER J., PREVOST H. (2009). Bactéries lactiques. Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles. Ed . Economica., Paris , 504p.
 - DRIESSEN ET AL 1995. In. Bacteriocins :mechanism of membrane insertion and pore formation .*Antonie Van Leeuwenhoek* 76: p 186.1999
 - edientseds.Goldberg I. et Williams R. Van Nostrand Reinhold, New York. pp. 461 483.
 - EKLUND T. 1989. Organic acids and esters. In: Gould, G.W. (Ed.), *Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures*, Elsevier Applied Science, London, pp. 161-200.
 - EKLUND T. 1989. Organic acids and esters. In: Gould, G.W. (Ed.), *Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures*, Elsevier Applied Science, London, pp. 161-200.
 - EUZÉBY, J.P., (1997). List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature. *International Journal of Systematic Bacteriology* 7: 590-592.
 - FAUCHERE L.et AVRIL J.2002.*Microbiologie général et médicale*. Edition ellipses paris. P 141-319.
 - FIELD ET AL ., 2007. in construction of a new shuttle vector and its use for cloning AND expression of two plasmide encoded bacteriocins from *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* BGSJ2-8.*Int.J.Food Microbiol*.
 - FLEMING, H.R., ETCHELL, G.L., COSTILOW, R.N. (1975).Microbial inhibition by isolate of *pediococcus* from cucumber brine. *Appl and Microbiology*, 30:104-1042.
 - FLEURETTE J. (1989).*Staphylocoques et Microcoques*. In *Bactériologie médicale*. 2ème édition. Paris : Médecine-Sciences. Flammarion ; p 773.
 - FREDERIQ, P. (1946) «Sur la pluralité des récepteurs d'antibiose d'E.coli.» *C.R Soc Biol* 140: 1189-1194.
 - FREESE E., SHEU C.W. ET GALLIERS E. 1973. Function of lipophilic acids as antimicrobial foodadditives. *Nature*. 241: 321-325.

- FRENEY, J., RENAUD, F., HANSEN, W., BOLLET, C., 2000. Précis de Bactériologie clinique. Ed. Eska (Paris), 1692 p.
- GALVEZ A., ABRIOURL H., BEN OMAR N. AND LUCAS R., 2011. Food Applications and Regulation In: Drider D., et Rebuffat S. (eds). Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications. Springer Verlag. Jaen, Spain. pp. 253-390.
- GÁLVEZ, A., ABRIOUEL, H., LÓPEZ, R. L., BENOMAR, N. (2007). Bacteriocin- based
- GARNEAU, S., MARTIN, N.I., VEDERAS, J.C., 2002. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie* 84, 577-592.
- GILL A.O. ET HALLEY R.A. 2003. Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme, nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24°C. *Int. J. Food Microbiol.* 80: 251-259.
- GOULD G.W. 1991. Antimicrobial compound. In: *Biotechnology and Food Ingr*
- GRAVESEN, A., RAMNATH, M., RECHINGER, K.B., ANDERSEN, N., JÄNSCH, L., HÉCHARD, Y., HASTINGS, J.W., KNOCHER, S. (2002). High-level resistance to class IIa bacteriocins is associated with one general mechanism in *L. monocytogenes*. *Microbiology*, 148 : 2361- 2369.
- GUARDABASSI L., COURVALIN P. (2006). Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance. In: Aarestrup F.M. (Ed.), *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin*. ASM Press : Washington ; p : 1-18.
- GUESSAS B., HADADJI M., SAIDI N. ET KIHAL M. 2006. Inhibition of
- GUIRAUD J.P. (2003). *Microbiologie alimentaire*. Edition DUNOD. P.
- GUIRAUD J.P. 2003. *Microbiologie alimentaire*. Edition DUNOD. P.
- H. CHEN, D.G. HOOVER, Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Rev. Food Sci. Food Safety*, 2 (2003) 82–100.
- HAMMES W.P. ET HERTEL C. (2009). Genus I. *Lactobacillus*. Dans: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.
- HANCOCK, R. E. (2000) Cationic antimicrobial peptides: towards clinical applications. *Expert Opin Investig Drugs*.9: 1723-1729.
- HASSAN A.N. ET FRANK J.F., 2001. Starter Cultures and their use. In: *Applied Dairy Microbiology* (Marth E.H. et Steele J.L.) 2e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 151-205.
- HÉCHARD, Y., PELLETIER, C., CENATIEMPO, Y., FRÈRE, J. (2001) Analysis of sigma(54)-dependent genes in *Enterococcus faecalis* : a mannose PTS permease (EII(Man)) is involved in sensitivity to a bacteriocin, mesentericin Y105. *Microbiology*, 147 : 1575 1580.
- HERNANDEZ D, CARDELL E ET ZARATE V. (2005). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese : initial characterization of plantaricin TF711 A bacteriocin-like Substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. *Journal of Applied Microbiology*. 99, 77-84.
- HERNANDEZ D., CARDELL E. ET ZARATE V. (2005). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheeses: Initial characterization of

- plantaricin TF 711, bacteriocin like substance produced by *Lactobacillus plantarum*. TF 711. *J. Appl. Microbiol.* 99: 77-84
- HIRSCH, A, E GRINSTED, H.R CHAPMAN, ET A.T.R MATTICK. «A note on the inhibition of an anaerobic sporeformer in Swiss-type cheese by a nisin-producing *Streptococcus*.» *J Dairy Sci* 18 (1951): 205–206.
 - HOLS P., HANCY F., FONTAINE L., GROSSIORD B., PROZZI D. ET LEBLOND- BOURGET N., (2005). New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiology Reviews*, 29:435–463.
 - HUGAS, M., GARRIGA, M ET AYMERICH, M.T. (2003). Functionally of enterococci in meat product. *Int. J. Food Microbiol.* 88(2-3): 22-33. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 on beef by application of organic acids. *J. Food Prot.* 59: 370-373. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bacteriocin-producing *Pediococcus* during manufacture of fermented semi-dry sausage. *J. Food Protect.* 53: 194- 197.
 - JEHL F. (2003). Pharmacocinétique et pharmacodynamie des glycopeptides. *Antibiotiques* 2003 ; 5: 89-98.
 - JOHN S., 2002. *Pratique cliniques en bactériologie, mycologie et parasitologie.* Paris 28- 51
 - JOLY B. ET REYNAUD A. 2007. *Entérobactéries : systématique et méthodes de diagnostic.* Edition Techniques et Documentation. Paris.
 - KHODJA Badra (2017). *Caractérisation phénotypique et moléculaire des souches de bactéries lactiques productrice de bactériocine.* Thèse de doctorat. Université Djillali Liabes de Sidi Bel Abbes
 - KIHAL.M, HENNI J.H..PREVOST ET DIVIÉS.C(2006). A new manometric methode for measuring carbon dioxide production by dairy starter culture : a cause of *leuconostoc meenteroides*.*Int.African J. Biotechnol.*Vol.5(4): 378-383.
 - KLAENHAMMER T.R., 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Review* 12, 39-85.
 - KLAENHAMMER, T.R. «Bacteriocins of lactic acid bacteria.» *Biochimie* 70 (1988): 337-349.
 - KLAENHAMMER, T.R., 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70, 337- 349.
 - KONG S. ET DAVISON A.J. 1980. The role of interactions between O₂, H₂, OH - and O₂ in free radical damage to biological systems. *Arch. Biochem. Biophys.* 204: 13-29.
 - FROK jean , 1992, balade au pays des fromages les triditions fromagères en France
 - Komorowski Jerzy, 2011 *ICAF structural integrtety : influence of efficiency and Green imperatives.*
 - BOUFODJI MOULOUD, 2017 *comparaison de la qualité physicochimique de Trois types de smen d'origine végétale*
 - KULSHRESTHA D.C. ET MARTH E.H. 1974. Inhibition of bacteria by some volatile and nonvolatilecompounds associated with milk. I. *Escherichia coli*. *J. Milk Food Technol.* 37:510-516.

- LABIOUI H, ELMOUALDI L, EL YACHIOUI M ET OUHSSINE M. (2005). Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux. 144, 237-250.
- LABIOUI, H., ELMOUALDI,L., EL YACHIOUI,M ET OUHSSINE,M.(2005)
- Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes.Bull.Soc.Pharm.Bordeaux.144
- :237-250.
- LACHANCE, M. (2000).Purification et caractérisation d'une bactériocine produite par Lactococcus Lactis supp.Lactis MJC15.Mémoire (MSc.)Faculté des études supérieures de l'université Laval. Lactea Latinoamericana.7. Lactococcus lactis. Res Microbiol.152: 131- 139.
- LAMNAOUER D. 2002. Détermination des propriétés biologiques (activités pharmacologiques et toxicologiques) des plantes médicinales et aromatiques du PNT. Programme de l'UICN en Afrique du Nord.
- LANSING M., PRESCOTT, JOHN P., HARLEY, DONALD A. KLEIN, (2003).
- Microbiologie De Boeck Supérieur, P 549
- LEROY, F. AND DE VUYST, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Trends in Food Science & Technology 15, 67- 78.
- LEVEAU J.Y, BOUIX M, DE ROISSART H. 1991. La flore lactique In Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaire. Bourgois C.M, Leveau J.Y.Edition : Techniques et documentations, Lavoisier. Paris. pp 152-186.
- LOZNIIEWSKI A., RABAUD C. (2010). Resistance bacterienne aux antibiotiques. Infections associées aux soins, Nancy : 4P.
- LOZNIIEWSKI A., RABAUD C. (2010). Resistance bacterienne aux antibiotiques Infections associées auxsoins ; Nancy. Juillet 2010.
- LUQUETF.M. ET CORRIEU G., 2005. Bactéries lactiques et probiotiques. Santé et Nutrition. France.306p.
- M. BAKAR DIOP, R. DUBOIS-DAUPHIN, E. TINE, A. NGOM, J. DESTAIN, P. THONART, Bacteriocin producers from traditional food products. Biotechnol. Agron. Soc. Environ, 11 (2007) 275–281.
- M. BASSIROU FALL. (1999). Evaluation de la prescription des Antibiotiques dans la region de Kaolack (sénégal).Thèse de Doctorat en pharmacie à universite CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR.
- M. MOOSAVI-NASAB, Z. ALAHDAD, et SH. NAZEMI , (2009).Characterization of the Dextran Produced by Leuconostoc mesenteroides from Date Fruit Extract. Iran Agricultural Research, Vol. 27, No. 1-2, 2008 and Vol. 28 No. 1, 2009
- MADI N. (2010). Criblage de souches de bactéries lactiques douées d'activité antibactérienne envers Staphylococcus aureus multirésistant. Mémoire de Magister en Microbiologie Appliquée. Université A/MIRA de Béjaia. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. 89p.

- MAGNUSSON J. ET SCHNÜRER J. 2001. *Lactobacillus coryniformis* subsp.
- MARCHADIER Elodie, 2009. Etude fonctionnelle d'un centre d'interactions protéiques chez *Bacillus subtilis* par une approche intégrée. Thèse de doctorat. Université PARIS XI UFR SCIENTIFIQUE D'ORSAY
- MARGARET, A.R, ET E.W JOHN . «BACTERIOCINS: Evolution, Ecology, and Application.» *Annu Rev Microbiol* 56 (2002): 117–137.
- MARTINEZ JL, BAQUERO F, ANDERSSON DI. (2007). Predicting antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* ; 5(12) : 958-65.
- MATTICK , A.T.R, ET A HIRSCH. «Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci.» *Lancet* 2 (1947): 5–7.
- MCAULIFFE, O, T O'KEEFFE, C HILL, AND R.P ROSS. (2001) "Regulation of immunity to the two-component lantibiotic, lacticin 3147, by the transcriptional repressor LtnR." *Mol Microbiol* 39: 982-993.
- MICHEL FEDRIGHI, 2005. Bactériologie alimentaire. Compendium d'hygiène des aliments. 2^{ème} édition. Page
- MOFREDJ, A., BAHLOUL, H., CHANUT, C., 2007. *Lactococcus lactis* : un pathogène opportuniste. *Revue générale. Médecine et Maladies infectieuses* 37, 200-207.
- MOLL. G. N; KONINGS. W. N; DRIESSEN. J. M. (1999) .Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation .*Antonie Van Leeuwenhoek* 76: p 182
- MORAES, M.P, L.M PERIN, M.B.T ORTOLANI, A.K YAMAZI, G.N VIÇOSA, AND L.A NERO. "Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic." *Food Sci.Technol* 43 (2010): 1320-1324.
- MORISSET ET AL (2002). in *bactéries lactiques : physiologie, métabolisme, génomique et applications industrielles* édition : Economica .2009.
- MOZZI, F., RAYA, R. R., VIGNOLO, G. M. (2010). *Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications*. Blackwell publishing, Singapore.
- MURRAY BE. (1990)The life and times of the *Enterococcus*.*ClinMicrobiol Rev* 1990 ; 3: 46-65.
- NAGHMOUCHI, K., DRIDER, D., KHEADR, E., LACROIX, C, PREVOST, H. et FLISS, I. (2006). Multiple characterizations of *Listeria monocytogenes* sensitive and insensitive variants to divergicin M35, a new pediocin-like bacteriocin. *Journal of Applied Microbiology*. 100: 29-39.
- NIGUTOVA, K., MOROVSKY, M., PRISTAS, P., TEATHER, R.M., HOLO, H., JAVORSKY, P., 2007. Production of enterolysin A by rumen *Enterococcus faecalis* strain and occurrence of enlA homologues among ruminal Gram+ cocci. *Journal of Applied Microbiology* 102, 563-569.
- NIKAIDO H. (2009). Multidrug resistance in bacteria. *Annu. Rev. Biochem.*, 78, 119-146.
- NILSEN, T., NES, I.F., HOLO, H., 2003. Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG2333. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 2975-2984.

- O. KANDLER AND N. WEISS, “Regular, Nonsporing Gram-Positive Rods,” In: P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt, Eds., *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*, Williams and Williams, Baltimore, 1986, pp. 1208-1234. of Action of Food Preservation Procedures, Elsevier Applied Science, London, pp. 161-200.
- OGIER J.C., CASALTA E., FARROKH C. ET SAIHI A. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms : The *Leuconostoc* genus. *International Journal of Food Microbiology* 126 p 286- 290.
- OPPEGARD ET AL (2007). In *Les bactériocines des bactéries lactiques caractéristiques et intérêts pour la bio conservation des produits alimentaires*. BASE.VOLUME 13.
- OSMAN M., 2011. L’examen cytobactériologique de pus .Mém : de fin d’étude en vue d’obtention d’un diplôme d’état. Université Stif.
- OUWEHAND A.C. et VESTERLUND S. 2004. 11 Antimicrobial components from lactic acid bacteria.In: Salminen S., Ouwehand A., Von Wright A. (eds.). *Lactic Acid*
- OUWEHAND, A. C., KIRJAVAINEN , P. V., GRONLUND, M. M., ISOLAURI, S. J ET SALMINEN, S. (1999).Adhesion of probiotic microorganisms to intestinal mucus. *International Dairy Journal*, 9:623-630.
- OYETAYO V.O., ADETUYI F.C. et AKINYOSOYE F.A. 2003. Safety and protective effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* used as probiotic agent in vivo. *Afr. J. Biotech.* 2: 448-452.
- PAPAGIANNI, M., 2003. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function and applications. *Biotechnology Advances* 21, 465- 499.
- PARENTE E., RICCIARDI A. ET ADDARIO G. 1994. Influence of pH on growth and bacterioc production by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* 140NWC during batch fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41: 388-394.
- PATTON ET AL., (2005). In *Les bactériocines des bactéries lactiques caractéristiques et intérêts pour la bio conservation des produits alimentaires*. BASE.VOLUME 13
- PIARD J.C. ET DESMAZEAND M., 1991. Inhibiting factors produced by lactic and bacteria part L.oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait.* 71: 525-
- PIARD J.C. ET DESMAZEAND M., 1991. Inhibiting factors produced by lactic and bacteria part L.oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait.* 71: 525-541.
- PIARD JC. , DESMAZEAUD M. (1991). Inhibitions‘ factors produced by lactic acid bacteria: Bacteriocins and other antibacterial substances. *Le lait*, 72, 113-142.
- PILET M.F., MAGRAS C., FEDERIGH M., 2005. Bactéries lactiques. In : *bactériologie alimentaire* (Federighi M.). 2e Ed., Economica. Paris. 219-240.
- PODOLAK P.K., ZAYAS J.F., KASTNER C.L. ET FUNG D.Y.C. 1996.
- POOLE K. (2004).Resistanceto beta-lactamantibiotics.*Cell Mol Life Sci.* 61(17): 2200- 2223.

- POPOFF M.Y. 2001. Antigenic formulas of the Salmonella serovars, 8th ed. WHO Collaborating center for reference and research on Salmonella, Institut Pasteur, Paris, France.
- POT B., 2008. The taxonomy of lactic acid bacteria. In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris.1 106.
- R.W. JACK, J.R. TAGG et B. RAY, Bacteriocins of Gram positive bacteria. Microbiol Rev, 59 (1995) 171–200.
- RACCACH M., MC GRATH R. ET DAFTARIAN H. 1989. Antibiosis of some lactic acid bacteria including Lactobacillus acidophilus to ward Listeria monocytogenes. Int. J. Food Microbiol.
- RAO D.R., REDDY A.V., PULUSANI S.R. ET CORNWELL P.E. 1984.
- ROGERS, L.A. (1928): “The inhibiting effect of Steptococcus lactis on Lactobacillus bulgaricus”. J. Bacteriol 5 161-168.
- ROSS, R. P., MORGAN, S. AND HILL, C. (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. International Journal of Food Microbiology 79, 3-16.
- ROSS, R. P., MORGAN, S., AND HILL, C. (2002) Preservation and fermentation: past, present and future. Int J Food Microbiol.79: 3-16.
- RUOFF, K. L. (2007). Aerococcus, Abiotrophia, and Other Aerobic Catalase-Negative, Gram-Positive Cocci. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. L. Landry, J. H. Jorgensen & M. A. Pfaller (Eds.), 9th ed., pp. 443-454
- S.MONTERSINO, A. PRIETO, R.MUÑOZ, AND B. DE LAS RIVAS (2008). Evaluation of Exopolysaccharide Production by Leuconostoc mesenteroides Strains Isolated from Wine. Journal of Food Science. ScholarOne, 375 Greenbrier Drive, Charlottesville, VA, 22901.
- SAVADOGO A, OUATTARA CHEIK A T, BASSOLE IMAEL H N ET TRAORE A
- S. (2004). Antimicrobial Activities of Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Burkina Faso Fermented Milk. Pakistan Journal of Nutrition. 3 (3), 174-179.
- SAVIJOKIE K., INGMER H. ET VARMANEN P., 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. Appl.Microbiol. Biotechnol. 71 : 394-406.
- SCARDOVI, V.,(1986). Section 15. Irregular nonsporing. Gram-positive rods. Genus Bifidobacterium Orla- Jensen 1924. In: Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E., Sharpe and J.G. Holt (Eds.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 9th Edn., Williams and Wilkins Co., Baltimore, 2: p 1418-1434.
- SCHILLINGER U. ET LÜCKE K. (1989). Antimicrobial activity of Lactobacillus sake
- isolated from meat. Appl. Environ. Microbiol. 55: 1901-1906.
- SCHLEIFER, K. H., EHRMANN, M., BEIMFOHR, C., BROCKMANN, E., LUDWIG, W. AND AMANN, R. (1995). Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria. International Dairy Journal 5, 1081- 1094
- SHAH, N.P. ,(2000) : Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods, Journal of Dairy Science, , 83, 894-907

- SHOLEVA Z., STEFANOVA S. ET CHIPEVA V. 1998. Screening of antimicro
- SMITH J.L. ET PALUMBO S.A. 1983. Use of starter cultures in meats. *J. Food Prot.* 46: 11, 997-1006.
- SMITH L. ET PALUMBO M. 1983. De Bacterias Lacticas: Novel approaches for the development of lactic acid bacteria resistant to phages. *Aniverario. Technologia*
- SMULDERS F.J.M., BARENDSEN P., VAN LOGTESTIJN J.G., MOSSEL D.A.A. ET VAN DER MAREL G.M. 1986. Review: Lactic acid: considerations in favor of its acceptance as a meat decontaminant. *J. Food Technol.* 21: 419-436.
- SOUNA DJAHIDA ; 2011. Epidémiologie de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries au niveau du C.H.U de Sidi Bel Abbès. Mém : Magister. Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen *Staphylococcus aureus Growth by Lactic Acid Bacteria in Milk. Dirasat, Agricultural Sci.* 32: 3, 304-312.
- STILES, M. E. (1996) Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 70: 331-345.
- STILES, M.E. "Biopreservation by lactic acid bacteria." *Antonie van Leeuw* 70 (1996): 331-340.
- STILS M.E. and Holzapfl w.H. (1997), *Int.J. food Microbiol.* ,36:1-29. *Th. Méd. Vét., Dakar, 1997, n09, III p.*
- SUTRA L., FEDERIGHI M. ET JOUVE J. L., (1998). *Manuel de bactériologie alimentaire.* Ed : POLYTECHNICA, Paris, 308(6) : 31-249.
- SYLVIE C. 2009. Art : La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important!
- T. MATILLA-SANDHOLM, J. MÄTTÖ, M. SAARELA, LAB with health claim interactions and interference with gastrointestinal flora. *Int. Dairy J.* 9 (1999) 25–35.
- T.R. KLAENHAMMER, Bacteriocin of lactic acid bacteria. *Biochimie,* 70 (1988) 337 – 349.
- TAGG J.R. ET MCGIVEN A.R. (1971). Assay system for bacteriocins. *J. Appl. Microbiol.* 21: 943.
- TAILLIEZ, P., QUIBERONI, A., REZAIKI, L., EL KAROUI, M., BISWAS, I., AND GRUSS, A. (2001) Distinctive features of homologous recombination in an 'old' microorganism,
- TALARICO T.L. et DOBROGOSZ W.J 1989. Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33 : 674-679.

Annexe

Compositions des milieu:

Milieu MRS (de Man Rogosa et Sharpe, 1960)

- ✓ Extrait de levure..... 5g
- ✓ Extrait de viande..... 5g
- ✓ Peptone..... 10 g
- ✓ Acétate de sodium..... 5g
- ✓ Citrate de sodium2g
- ✓ Glucose20g
- ✓ KH₂PO₄2g
- ✓ MgSO₄0.1g
- ✓ MnSO₄ 0.05 g
- ✓ Agar12g
- ✓ Tween801 ml
- ✓ Eau distillée1000 ml
- ✓ pH=6.5 ± 0.2 à 37°C Autoclavage : 121°C /15min.
- ✓ MRS semi solide.....agar 7g

- ✓ Milieu Mueller-Hinton (Mueller et Hinton, 1941)
- ✓ Infusion de viande de boeuf3000 cm³
- ✓ Peptone de caséine17,5 g
- ✓ Amidon de maïs1,5 g
- ✓ Agar-agar17 g
- ✓ pH 7.4 Autoclavage 120°C/ 20 minutes

- ✓ Gélose nutritive
- ✓ Extrait de viande 1 g
- ✓ Extrait de levure2 g
- ✓ Peptone5 g
- ✓ Chlorure de sodium5 g
- ✓ Agar-agar15 g
- ✓ Eau distillée1000 ml
- ✓ pH 7,4 Autoclavage 120 °C pendant 20 minutes

- ✓ **Bouillon nutritif**
- ✓ **Extrait de viande1 g**
- ✓ **Extrait de levure2 g**
- ✓ **Peptone5 g**
- ✓ **Chlorure de sodium5 g**
- ✓ **Eau distillée1000 ml**
- ✓ **pH 7,4 Autoclavage 120 °C pendant 20 minutes**

- ✓ **MSE (Mayeux ,Sandine et Elliker,1962**
- ✓ **Extrait de levure5 g**
- ✓ **Peptone20 g**
- **Saccharose.....100g**
- **Gelatine.....2,5g**
- **Glucose.....5g**
- ✓ **Citrate de sodium1 g**
- ✓ **Azide de sodium.....0.075g**
- ✓ **Agar -agar.....15g**
- ✓ **Eau distillée1000 ml**
- ✓ **pH 6,8 Autoclavage 120 °C pendant 20 minutes**

- ✓ **Milieu M16 BCP(Thomas ,1973(**
- ✓ **Extrait de viande5 g**
- ✓ **Extrait de levure2,5 g**
- ✓ **Peptone10 g**
- **Acide ascorbique.....0,5g**
- ✓ **L-arginine.....4 g**
- ✓ **Pourpre de Bromocrésol.....0,05g**
- ✓ **Agar-agar.....15g**
- ✓ **Eau distillée1000 ml**
- ✓ **pH 6,8 Autoclavage 120 °C pendant 20 minutes**

- ✓ **Milieu MRS BCP**
- ✓ **MRS (milieu liquide)moins l'extrait de viande et sans sucre 1000ml**
- ✓ **Bromocrésol pourpre.....0,025 g**

- ✓ **pH 7 Autoclavage 120 °C pendant 20 minutes**
- ✓ **Milieu KMK(Kempler et Mc Kay,1980(**
- ✓ **Biopolytone.....2,5 g**
- ✓ **Extrait de levure3 g**
- ✓ **Glucose.....5 g**
- ✓ **Agar-agar.....15 g**
- ✓ **Eau distillée1000 ml**
- ✓ **pH 6,8 Autoclavage 121 °C pendant 15minutes**
- ✓ **Eau physiologique:**
- ✓ **Chlorure de sodium.....8,5 g**
- ✓ **Eau distillée1000 ml**
- ✓ **pH 7 Autoclavage 120 °C pendant 20 minutes**

Anex 2:

La coloration de Grama été réalisée selon la technique suivante:

1. Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre
2. Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec la goutte d'eau, strier et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène
3. Couvrir le frottis par du cristal violet pendant 60 secondes
4. Ajouter du lugol pendant 30 secondes
5. Décoloré avec l'alcool 95 % .
6. Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes
7. Ajouter la fuschine et laisser pendant 15 à 30 secondes
8. Laver à l'eau
9. Après séchage déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope au grossissement (*10)

Les cellules Gram positif absorbe la couleur du cristal violet et demeurent bleues violettes en apparence, contrairement aux cellules Gram negative qui apparaissent distinctement rosâtres.

Résumé

Les leuconostokes sont des bactéries lactiques Gram-positives, catalase négatif, non-pathogènes, tolérant les milieux acides, capable de produire le CO₂, les produits aromatiques, les acides organiques. Les études ont montré qu'ils sont des bactéries lactiques ont la capacité de produire des composés antibactériens type bactériocine qui ont un effet sur *Listeria monocytogenes*. Le but de ce travail est la sélection des souches de leuconostoc productrices des substances antibactériennes et l'étude de leur nature.

Ce travail nous a permis d'isoler 17 souches lactiques de différents habitats (lait de chèvre, lait de vache, fromage traditionnel...) et on les a identifiées par les tests basiques jusqu'à l'atteindre aux souches des Leuconostocs. Suivi d'une purification.

Le criblage des souches Leuconostocs avec les souches pathogènes (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aerogenosa*, *Salmonella typhi*, *Bacillus subtilis*...) a donné des résultats positifs même après les différents traitements effectués sur les surnagants des Leuconostocs, les substances secrétées dans ces surnagants contiennent des protéines « bactériocine » totalement sensibles à l'action des enzymes protéolytiques mais elles peuvent résister au traitement à 70°C 90°C 110°C pendant 20 min.

Les résultats de notre travail ont confirmé que les souches isolées ont sûrement le pouvoir antimicrobien contre les bactéries pathogènes.

Mots clés : Leuconostocs, bactéries pathogènes, bactériocine, pouvoir antimicrobien, test d'antagonisme.

Abstract

Leuconostoc are Gram-positive lactic acid bacteria, catalase negative, non-pathogenic, acid-tolerant, they are able to produce CO₂, aromatic products, organic acids. The studies have shown that they are lactic bacteria have the capacity to produce bacteriocin-like antibacterial compounds that have an effect on *Listeria monocytogenes*. The purpose of this work is the selection of strains of leuconostoc producing antibacterial substances and studying of this nature.

In our work we have isolated 17 lactic acid strains from different habitats (goat's milk, cow's milk, traditional cheese, etc.) and we have identified them by microbiological tests, biochemical tests and physiological tests until we reach that are strains of Leuconostocs. Then, we continued the study of the antimicrobial activity of isolated strains by antagonism test, direct and indirect interaction methods to consult and confirm the type and nature of substance secreted by these strains.

The screening of Leuconostoc strains with the pathogenic strains (*Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Pseudomonas aerogenosa*, *Salmonella typhi*, *Bacillus subtilis*...) gave positive results even after the different treatments carried out on the supernatants of Leuconostocs, the substances secreted in these supernatants contain "bacteriocin" proteins fully sensitive to the action of proteolytic enzymes but they can resist the treatment at 70 ° C 90 ° C 110 ° C for 20 min.

The results of our work have confirmed that the isolated strains have certainly the antimicrobial power against pathogenic bacteria.

Key words: Leuconostocs, pathogenic bacteria, bacteriocin, antimicrobial power, antagonism test.

المخلص

Leuconostoc هي بكتيريا حمض اللبنيك ايجابية الجرام ، سلبية الكاتالاز ، غير مسببة للأمراض ، مقاومة للحمض ، قادرة على إنتاج ثاني أكسيد الكربون ، منتجات عطرية ، أحماض عضوية ، وقد أظهرت الدراسات أن البكتيريا اللبينية لديها القدرة لإنتاج مركبات مضادة للجراثيم شبيهة بالبكتريوسين لها تأثير على جراثيم الليستيريا . والغرض من هذا العمل هو اختيار سلالات من المواد المضادة للبكتيريا *Leuconostoc* المنتجة ودراسة طبيعتها

في عملنا هذا قمنا بعزل 17 بكتيريا حمض اللبن مختلفة المصدر (حليب الماعز ، حليب البقر ، جبن تقليدي ..) ثم قمنا بالتعرف عليها باختبارات ميكروبيولوجية ، بيوكيميائية وفيزيولوجية للوصول في النهاية الى ان هذه البكتيريا هي *Leuconostoc* . واصلنا دراسة العينات المعزولة من أجل معرفة طبيعة ونوع المواد المضادة للبكتيريا التي تفرزها بكتيريا *Leuconostoc* وذلك من خلال اختبار التضاد بوجهيه المباشر وغير المباشر من أجل دراسة تفاعل بكتيريا *Leuconostoc* مع البكتيريا الممرضة.

تم عزل بكتيريا *Leuconostoc* مع نظيراتها الممرضة (*Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Pseudomonas aerogenosa*, *Salmonella typhi*, *Bacillus subtilis*...) أعطى نتيجة ايجابية حتى بعد معالجة مستخلص بكتيريا *Leuconostoc* ، بعد المعالجة الأولية بانزيمات هاضمة للبروتينات فقدت المواد المفترزة من طرف *Leuconostoc* مفعولها بينما قاومت الاختبار الفيزيائي بالحرارة 70°، 90° و110° لمدة 20د وهذا يثبت ان المواد المفترزة من طرف *Leuconostoc* بروتينات « bacteriocine »

النتائج النهائية لعملنا هذا اكدت ان بكتيريا *Leuconostoc* لديها قدرة كبيرة على إنتاج مواد مضادة للبكتيريا الممرضة.

كلمات مفتاحية : *Leuconostoc* ، البكتيريا الممرضة، بكتيريا حمض اللبن ، bacteriocine ، مواد مضادة للبكتيريا، اختبار التضاد.