

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOULOUD MAMMERY DE TIZI OUZOU
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE - MICROBIOLOGIE

MEMOIRE DE MAGISTERE



Spécialité : Sciences Biologiques

Option : Biochimie Appliquée et Biotechnologies

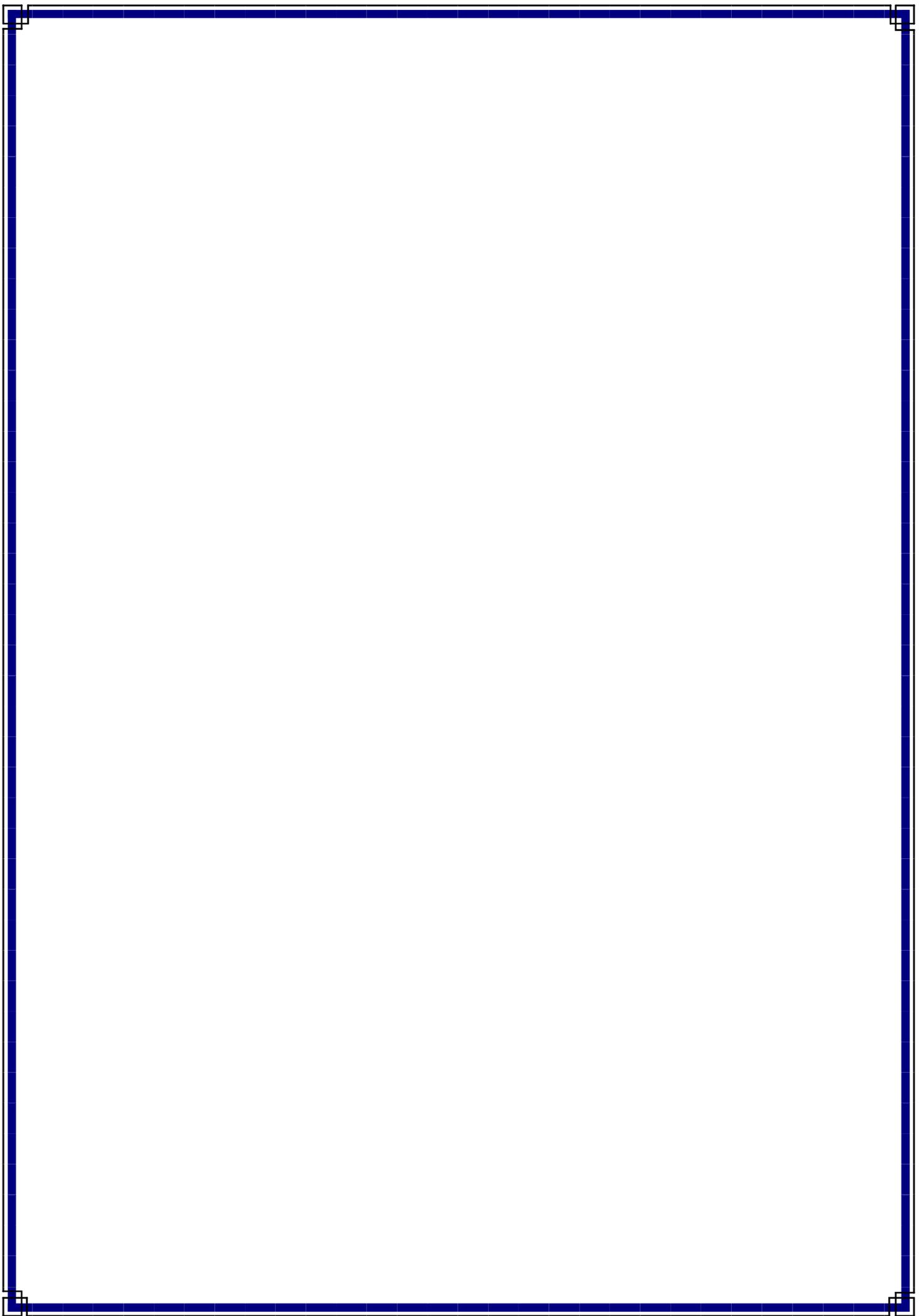
Présenté par : Mr. BARIZ Karim

SUJET :

**Etude de la microflore du lait fermenté
traditionnel (*Ighi*), recherche de souches
de bactéries lactiques productrices de
bactériocines.**

Mr. HOUALI Karim	Maître de Conférences A	Université Tizi-Ouzou	Rapporteur
Mr. MATI Abderahmane	Professeur	Université Tizi-Ouzou	Président
Mme. KIRANE Djamila	Professeur	Université Annaba	Examineur
Mr. MESBAHI Mahmoud	Maître de Conférences A	Université Tizi-Ouzou	Examineur
Mr. DJENANE Djamel	Maître de Conférences A	Université Tizi-Ouzou	Examineur

15/01/2011



REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, j'aimerais en premier remercier D^r MOHAND OUSSAID Ouerdia, Maître de conférences, chargée de cours à l'Université Tizi-Ouzou, qui m'avait proposé ce sujet et pour avoir cru en moi et m'avoir donné une chance dans le domaine de la recherche en microbiologie dans un premier temps en préparant mon mémoire de DES en microbiologie et dans un second temps en préparant mon mémoire de Magister de biochimie appliquée et biotechnologies sur les bactériocines des bactéries lactiques.

Je tiens à remercier tout particulièrement mon promoteur, Docteur Karim HOUALI, Maître de conférences à l'université Mouloud MAMMERI de Tizi-Ouzou, de m'avoir permis de découvrir un domaine de recherche passionnant et de m'avoir soutenu et guidé tout au long de mon travail d'investigation, qu'il trouve ici le témoignage de ma haute considération et profond respect.

Mes vifs et sincères remerciements vont également à :

- Mr. MATI Abderahmane, Professeur à l'université de Tizi-Ouzou de m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury de ma soutenance ;
- Mme. KIRANE Djamilia, Professeur à l'Université Annaba d'avoir accepté d'examiner mon travail ;
- Mr. MESBAHI Mahmoud, Maître de Conférences A à l'Université Tizi-Ouzou d'avoir accepté d'examiner mon travail ;
- Mr. DJENANE Djamel, Maître de Conférences A à l'Université Tizi-Ouzou d'avoir accepté d'examiner mon travail.

J'adresse également mes remerciements à Mr DJERBAL Mouloud, Docteur vétérinaire, Directeur du Laboratoire Régional Vétérinaire de Drâa Ben Khedda et chargé de cours à l'université MOULOUD Mammeri de Tizi ouzou, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et à tout le personnel du laboratoire plus particulièrement Mme KECHIH.

Mes profonds remerciements vont vers toutes les personnes qui m'ont aidé à réaliser ce travail.

SOMMAIRE**ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

1- Bactéries lactiques	03
1.1- Généralités sur les bactéries lactiques.....	03
1.2- Classification.....	03
1.2.1-Enterococcus, Lactococcus et Streptococcus.....	05
1.2.1.1- <i>Streptococcus</i>	05
1.2.1.2- <i>Enterococcus</i>	05
1.2.1.3- <i>Lactococcus</i>	05
1.2.1.4- <i>Vagococcus</i>	06
1.2.2- <i>Aerococcus, Pediococcus et Tetragenococcus</i>	06
1.2.3- <i>Leuconostoc, Oenococcus et Weissella</i>	06
1.2.4- <i>Lactobacillus et Carnobacterium</i>	07
1.3-Le genre <i>Lactococcus</i>	07
1.3.1-Principales caractéristiques.....	07
1.3.2-Classification et écologie	08
1-3-3-Métabolisme	10
1-3-3-1-Métabolisme des hydrates de carbones	11
1-3-3-2-Métabolisme du citrate.....	12
1-3-3-3 Métabolisme du pyruvate	13
1-3-3-4 Métabolisme azoté.....	15
1-3-4-Activités antimicrobiennes des <i>Lactococcus</i>	15
1-3-4-1-Production d'acides organiques	17
1-3-4-2-Peroxyde d'hydrogène	17
1-3-4-3-Les bactériocines.....	18
1-3-4-4-Autres substances et modes d'inhibition.....	18
2 - Les bactériocines	19
2-1-Définition.....	19
2-2- Classification	19
2-2-1-Classe I : les lantibiotiques.....	20
2-2-1-1-Les lantibiotiques de type A	20
2-2-1-2-Les lantibiotiques de type B.....	21
2-2-1-3-Les lantibiotiques type C.....	21
2-2-2-Classe II : Peptides non modifiés	21
2-2-2-1-Sous classe IIa.....	21
2-2-2-2-Sous classe IIb.....	21
2-2-2-3-Sous classe IIc.....	21
2-2-3 -Classe III	22
2-2-3-1-Sous classe IIIa : bacteriolysines.....	22
2-2-3-2-Sous classe IIIb : bactériocines non lytiques.....	22
2-2-4-Classe IV	22
2-3-Les bactériocines des <i>Lactococcus</i>	22
2-3-1-Bactériocines de classe I.....	22
2-3-1-1-Nisine	22
2-3-1-2-La lacticine 3147.....	23
2-3-1-3-La lacticine. 481	23
2-3-2-Bactériocines de classe II.....	23
2-3-2-1-La lactococcine A	23
2-3-2-2-La lactococcine B.....	23
2-3-2-3-La lactococcine M.....	24

2-3-2-4-La lactococcine G.....	24
2-3-2-5-La lactococcine 972	24
2-3-2-6-La bactériocine J 46	24
2-3-3-Bactériocines non classées produites par <i>Lactococcus</i>	24
2-3-4-Mécanisme de production et de régulation.....	26
2-3-4-1-Bactériocine de classe I	26
2-3-4-2-Bactériocine de classe II	27
2-3-5-Mode d'action	29
2-3-5-1-Bactériocines de classe I.....	29
2-3-5-2-Bactériocines de classe II	29
2-3-6-Application des bactériocines des <i>Lactococcus</i>	31

ETUDE EXPERIMENTALE

1-Matériels et méthodes

1-1- Matériels	34
1-1-1-Matériel biologique	34
1-1-1-1-Lait fermenté traditionnel « <i>Ighi</i> »	34
1-1-1-1-1-Préparation du lait fermenté traditionnel	34
1-1-1-1-2-Collecte des laits fermentés traditionnels	34
1-1-1-2-Micro-organismes	34
1-1-2 Milieux de culture.....	34
1-1-2-1-Milieux pour l'isolement et culture des isolats lactiques	34
1-1-2-2- Milieux de culture pour la souche indicatrice	35
1-1-2-3 Milieux pour l'identification	35
1-1-3-Réactifs et Colorants	35
1-1-4-Appareillages.....	35
1-1-5-Verrerie et autres matériels.....	36
1-2-Méthodes	36
1-2-1-Mesure du pH.....	36
1-2-2-Numération des différents groupes microbiens.....	36
1-2-2-1-Numération de la flore mésophile aérobie totale	36
1-2-2-2-Numération de la flore lactique.....	37
1-2-2-3-Coliformes totaux.....	37
1-2-2-4-Coliformes fécaux	37
1-2-2-5-Levures et moisissures	37
1-2-2-6-Recherche des germes pathogènes	38
1-2-2-6-1-Recherche de <i>Staphylococcus aureus</i>	38
1-2-2-6-2-Recherche des Salmonelles.....	39
1-2-3-Isolement et screening d'isolats de <i>Lactococcus</i> bactériocinogéniques.....	39
1-2-3-1-Isolement de souches de <i>Lactococcus</i>	39
1-2-3-1-1-Isolement en surface	40
1-2-3-1-2-Isolement en profondeur	40
1-2-3-2-Purifications des isolats.....	40
1-2-3-3-Conservation des isolats.....	42
1-2-4-Screening d'isolats de <i>Lactococcus</i> bactériocinogéniques.....	42
1-2-4-1-Vérification de la pureté de <i>Listeria innocua</i> F.....	43
1-2-4-2-Détermination du nombre d'UFC/ml en fonction de la DO à 625nm.....	43
1-2-4-3-Méthode double couche	43
1-2-4-4-Méthode diffusion en puits	43
1-2-4-4-1-Préparation du surnageant de la souche lactique	43
1-2-4-4-2-Préparation de l'inoculum de la souche indicatrice	44
1-2-4-5-Elimination de l'effet des bactériocines	44
1-2-4-6-Démonstration de la nature protéique de la substance inhibitrice.....	45

1-2-5-Identification	46
1-2-5-1-Tests communs.....	47
1-2-5-1-1-Morphologie	47
1-2-5-1-2- Test à la catalase	47
1-2-5-1-3-Mobilité	47
1-2-5-1-4-Types respiratoires.....	48
1-2-5-1-5-Type fermentaire.....	48
1-2-5-1-6-Test nitrate réductase	48
1-2-5-1- 7- Recherche de citratase	49
1-2-5-1- 8-Recherche de l'acétoine.....	49
1-2-5-1- 9-Arginine dihydrolase	50
1-2-5-1-10-Hydrolyse de la gélatine	50
1-2-5-1-11-Thermorésistance à 63°C pendant 30 minutes.....	51
1-2-5-1-12-Métabolisme des sucres	51
1-2-5-2-Tests spécifiques	51
1-2-5-2-1-Croissance à différentes températures	51
1-2-5-2-2-Croissance sur milieux hostiles.....	52
1-2-5-2-2-1-Croissance à différentes concentrations de NaCl	52
1-2-5-2-2-2-Croissance à pH 9,2.....	52
1-2-5-2-2-3-Croissance sur lait de SHERMAN	52
1-2-5-2-2-4-Croissance sur lait tournesolé.....	53
1-2-5-2-2-5-Croissance en présence du tellurite de potassium	53
2- Résultats et discussion	
2-1-Mesure du pH	54
2-2-Numération des différents groupes microbiens	56
2-2-1-Numération de la flore mésophile aérobie totale (FMAT)	56
2-2-2-Numération des bactéries lactiques	57
2-2-3-Numération des coliformes totaux et fécaux	60
2-2-4-Numération des levures et moisissures.....	61
2-2-5-Recherche de <i>Staphylococcus aureus</i> et des Salmonelles.....	64
2-3-Isolement et Screening d'isolats de <i>Lactococcus</i> producteurs de bactériocines.....	66
2-3-1-Isolement	66
2-3-2-Screening d'isolats de <i>Lactococcus</i> producteurs de bactériocines	67
2-3-2-1-Méthode double couche	67
2-3-2-2-Méthode de diffusion en puits.....	75
2-3-3-Elimination de l'effet des bactériocines	77
2-3-4-Démonstration de la nature protéique des substances inhibitrices	80
2-3-5-Identification des isolats.....	80
Conclusion	85
Références bibliographiques	
Annexes	

Liste des abréviations

ADH : arginine dihydrolase.

ADN : acide desoxyribonucléique.

ARN r 16S : gène codant pour l'ARNr 16S.

ARN r 23S : gène codant pour l'ARNr 23S.

ATP : adénosine triphosphate.

°C : degrés Celsius.

Dha : déhydroalanine.

Dhb : déhydrobutyrine.

G+C : guanine plus cytosine.

G : gramme.

kDa : Kilo Dalton.

Lan : lanthionine.

MeLan : β -méthyl-lanthionine.

ml : millilitre.

N : normalité.

Opp : oligopeptide perméase.

DtpT : Di-tripeptide transporter.

DtpP : di-tripeptide perméase.

Dpp : dipeptide perméase.

U/mg : unité par milligramme.

Δ pH : gradient de pH.

$\Delta\Psi$: potentiel de membrane.

RMN : Résonance magnétique nucléaire.

LISTE DES FIGURES

		Page
Figure 01	Arbre phylogénétique construit à partir de l'analyse comparative des séquences d'ARNr 16S montrant les principaux genres de bactéries lactiques	04
Figure 02	Arbre construit à partir de l'analyse comparative des séquences d'ARNr 16S montrant la relation phylogénétique entre les espèces du genre <i>Lactococcus</i>	09
Figure 03	Voies principales du transport et du catabolisme du lactose, glucose et galactose chez les streptocoques homofermentaires	14
Figure 04	Métabolisme du pyruvate et du citrate	16
Figure 05	Métabolisme azoté chez <i>Lactococcus lactis</i>	16
Figure 06	Principales voies de formation du peroxyde d'hydrogène	18
Figure 07	Structure de la nisine A	25
Figure 08	Structure des peptides AI et AII de la lacticine 3147	25
Figure 09	Structure de la lacticine 481	25
Figure 10	Modification post-traductionnelles de la pré-nisine	28
Figure 11	Structure de la pré-nisine et de la nisine	28
Figure 12	Biosynthèse et régulation de la nisine	30
Figure 13	Biosynthèse et régulation des bactériocines de classe II	30
Figure 14	Mode d'action des bactériocines de classe I, II et III	32
Figure 15	Observation au microscope électronique à transmission de cellules de <i>Bacillus subtilis</i> traitées (B) ou non à la nisine (A)	32
Figure 16	Observation au microscope électronique à transmission de l'action de la nisine sur la formation du septum de division chez <i>Bacillus subtilis</i> A1 et A2 : septum normaux ; B, C, D et E : aberration de la formation du septum	32
Figure 17	Photo montrant l'inhibition de <i>Listeria innocua</i> F par l'isolat lactique LFT 26 par la méthode double couche	76
Figure 18	Photo montrant l'inhibition de <i>Listeria innocua</i> F par l'isolat lactique LFT 61 par la méthode double couche	76
Figure 19	Photo montrant l'inhibition de l'isolat LFT26 contre <i>Listeria innocua</i> F par la Méthode de diffusion en puits	78
Figure 20	Photo montrant l'inhibition de l'isolat LFT61 contre <i>Listeria innocua</i> F par la méthode de diffusion en puits	78
Figure 21	Photo montrant l'élimination de l'effet des bactériocines du surnageant de l'isolat lactique LFT26 par traitement thermique à 121°C pendant 30min testé contre <i>Listeria innocua</i> F	79
Figure 22	Photo montrant l'élimination de l'effet des bactériocines du surnageant de l'isolat lactique LFT 61 par traitement thermique à 121°C pendant 30min testé contre <i>Listeria innocua</i> F	79
Figure 23	Photo montrant l'action de la Protéinase K sur la substance inhibitrice de l'isolat LFT 26	81
Figure 24	Photo montrant l'action de la Protéinase K sur la substance inhibitrice de l'isolat LFT 61	81

LISTE DES TABLEAUX

		Page
Tableau I	Caractères différentiels des différents genres de bactéries lactiques	04
Tableau II	Caractéristiques distinctives des espèces du genre <i>Lactococcus</i>	09
Tableau III	Principales caractéristiques des sous espèces de <i>Lactococcus lactis</i>	10
Tableau IV	Quelques applications des bactériocines des <i>Lactococcus</i>	33
Tableau V	Origine, année et mois de collecte ainsi que le temps d'incubation des laits fermentés traditionnels collectés	55
Tableau VI	Teneurs des laits fermentés traditionnels en flore mésophile aérobie totale et en Bactéries lactiques	59
Tableau VII	Teneurs des laits fermentés traditionnels en coliformes totaux et fécaux et en levures et moisissures	62
Tableau VIII	Résultats de la recherche de <i>Staphylococcus aureus</i> et des Salmonelles dans les fermentés traditionnels	65
Tableau IX	Principales caractéristiques des isolats isolés à partir des 20 laits fermentés Traditionnels	68
Tableau X	Résultat d'identification des deux isolats lactiques LFT26 et LFT61	83

Résumé

Ighi est un lait fermenté traditionnel produit en Algérie, cette dénomination est propre à la région de Kabylie. Il est produit à partir du lait de vache. Sa préparation se fait selon des procédés assez primitifs et ce dernier ne subit aucun traitement thermique.

Les bactéries lactiques sont capables de synthétiser beaucoup de substances comme le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyle, l'acétaldéhyde et les bactériocines.

Les changements apportés aux procédés de fabrication d'aliments dus au développement technologique et aux habitudes alimentaires (produits réfrigérés, prêts à cuisiner...etc.) ont favorisé l'apparition de souches microbiennes pathogènes psychrotrophes comme *Listeria monocytogenes* qui représente un risque sanitaire considérable. D'autre part, l'utilisation massive et répétée de conservateurs chimiques dans la conservation des aliments peut entraîner des effets graves sur la santé humaine. Pour cela, la recherche de nouveaux bioconservateurs « naturels » des aliments tels que les bactériocines reste toujours d'actualité.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à déterminer la situation microbiologique de 20 laits fermentés traditionnels produits dans la région de la wilaya de Tizi-Ouzou, et dans un second temps à l'isolement et à la recherche de souches de bactéries lactiques productrices de bactériocines.

Les résultats obtenus montrent que les laits fermentés traditionnels analysés sont acides, les valeurs du pH se situent entre 4,44 à 4,90 avec une moyenne de $4,40 \pm 0,29$. La valeur la plus élevée est celle du LFT 6 (4,90) et la valeur la plus faible est celle du LFT 17(4,44). Les laits fermentés traditionnels analysés sont très riches en flore microbienne, la teneur moyenne en flore mésophile aérobie totale est de $(127,98 \pm 98)10^7$ UFC/ml [$(9,10 \pm 0,33)$ Log₁₀ UFC/ml], celle des bactéries lactiques est de $(48,87 \pm 44,47)10^7$ UFC/ml [$(8,68 \pm 0,39)$ Log₁₀ UFC/ml] pour les *Lactobacillus* et de $(498,65 \pm 305,4)10^7$ UFC/ml [$(9,69 \pm 0,39)$ Log₁₀ UFC/ml] pour les *Lactococcus*. Les résultats ont montré également que ces laits sont fortement contaminés par les coliformes et les moisissures. La teneur moyenne des coliformes totaux est de $(298 \pm 49,3)10^2$ UFC/ml [$(4,47 \pm 0,07)$ Log₁₀ UFC/ml] tandis que celle des coliformes fécaux est de $(18 \pm 2,03)10^2$ UFC/ml [$(2,97 \pm 0,04)$ Log₁₀ UFC/ml]. Les levures et les moisissures sont présentes à une moyenne de $(103,66 \pm 59,6)10^7$ UFC/ml [$(9,01 \pm 0,24)$ Log₁₀ UFC/ml]. Les laits fermentés traditionnels analysés sont contaminés par des germes pathogènes comme *Staphylococcus aureus*. Deux souches de *Lactococcus lactis ssp lactis* (LFT26 et LFT61) ont été sélectionnées pour leurs aptitudes à produire des bactériocines actives contre *Listeria innocua* F. Les diamètres d'inhibition obtenus par la méthode double couche sont de $8 \pm 0,15$ mm pour l'isolat LFT26 et $6 \pm 0,21$ mm pour l'isolat LFT61 tandis que ceux obtenus avec la méthode diffusion en puits sont $14,5 \pm 0,85$ mm et $13,75 \pm 0,16$ mm pour les isolats LFT61 et LFT26 respectivement. L'activité inhibitrice de ces bactériocines a été annihilée par la protéinase K. Les résultats d'identification des deux isolats lactiques LFT26 et LFT61 montrent un pourcentage de parenté de 95 % et 97,5 % avec l'espèce *Lactococcus lactis ssp lactis* respectivement.

Ces résultats montrent que nos produits fermentés traditionnels constituent une source naturelle pour la recherche et l'isolement de nouvelles souches de bactéries lactiques sauvages productrices de bactériocines présentant une activité inhibitrice significative contre les souches microbiennes pathogènes.

Mots clés : lait fermenté traditionnel, *Ighi*, bactéries lactiques, bactériocines.

Abstract

Ighi is traditional fermented milk produced in Algeria, this denomination is specific to the area of Kabylia. It is produced starting from the cow's milk. Its preparation is done according to rather primitive processes' and this last does not undergo any heat treatment.

The lactic bacteria are able to synthesize many substances such as the hydrogen peroxide, the carbon dioxide, the diacetyl, the acetaldehyde and bacteriocins.

Changes brought to the manufacturing processes of food due to the technological development and the food practices (produced cooled, ready with cooked... etc.) supported the appearance of pathogenic microbial strains psychrotrophic as *Listeria monocytogenes* which represents a considerable medical risk. In addition, the massive and repeated use chemical conservatives in the conservation of food can entrain serious effects on human health. For that, the search for new "natural" bioconservatifs of food such as the bacteriocins always remains of topicality.

In this work, we were initially interested to determine the microbiological situation of 20 traditional fermented milks products in the area of Tizi-Ouzou, and in the second time with the insulation and the search of strains of lactic acid bacteria bacteriocin production.

The results obtained show that analyzed traditional fermented milks are acid, the values of the pH range between 4,44 to 4,90 with an average of $4,40 \pm 0,29$. The highest value is that of the LFT 6 (4,90) and the lowest value is that of the LFT 17(4,44). Analyzed traditional fermented milks are very rich in microbial flora, the average content of aerobic mesophilic flora is $(127,98 \pm 98)10^7$ CFU/ml [$(9,10 \pm 0,33)$ Log₁₀ CFU/ml], that of the lactic acid bacteria is $(48,87 \pm 44,47)10^7$ CFU/ml [$(8,68 \pm 0,39)$ Log₁₀ CFU/ml] for *Lactobacillus* and $(498,65 \pm 305,4)10^7$ CFU/ml [$(9,69 \pm 0,39)$ Log₁₀ CFU/ml] for *Lactococcus*. The results also showed that these milks are strongly contaminated by the coliforms and moulds. The average content of the total coliforms is $(298 \pm 49,3)10^2$ CFU/ml [$(4,47 \pm 0,07)$ Log₁₀ CFU/ml] while that of the fecal coliforms is $(18 \pm 2,03)10^2$ CFU/ml [$(2,97 \pm 0,04)$ Log₁₀ CFU/ml]. The yeasts and the moulds are present at an average of $(103,66 \pm 59,6)10^7$ CFU/ml [$(9,01 \pm 0,24)$ Log₁₀ CFU/ml]. Analyzed traditional fermented milks are contaminated by pathogenic germs like *Staphylococcus aureus*. Two strains of *Lactococcus lactis ssp lactis* (LFT26 and LFT61) were selected for their aptitudes to produce bacteriocin activate against *Listeria innocua* F. The diameters of inhibition obtained by the method double layer are of $8 \pm 0,15$ mm for isolate LFT26 and $6 \pm 0,21$ mm for isolate LFT61 while those obtained with the method diffusion out of well are $14,5 \pm 0,85$ mm and $13,75 \pm 0,16$ mm for isolates LFT61 and LFT26 respectively. The heat treatment 121°C during 30 min eliminated the inhibiting substances. However the untreated and not neutralized supernatants continue with shown inhibition (the diameters of inhibition are of $12,35 \pm 0,85$ mm and $13,89 \pm 0,45$ mm for isolates LFT26 and LFT61 respectively). The inhibiting activity has been destroyed by the protéinase K what shows their proteinic nature (bacteriocin). The results of identification of two lactic isolates LFT26 and LFT61 show a percentage of relationship of 95 % and 97,5% with the species *Lactococcus lactis ssp lactis* respectively.

These results show that analyzed traditional fermented milks are of bad microbiological quality and that the latter constitute a natural source for the search and the insulation for new wild strains of lactic acid bacteria producing bacteriocins presenting a significant inhibiting activity against the pathogenic microbial strains.

Key words: traditional fermented milk, *Ighi*, lactic acid bacteria, bacteriocin.

INTRODUCTION

Introduction

L'homme à toutes les époques et sous tous les climats a toujours eu le souci de conserver les produits alimentaires tout en adaptant à chaque fois une méthode pour un produit donné.

La fermentation microbienne est le procédé le plus ancien de conservation des produits alimentaires plus particulièrement le lait. L'utilisation de ce procédé de conservation remonte à 10000 ans avant Jésus-Christ, date approximative d'apparition des premiers laits fermentés traditionnels et le début de la domestication de certains animaux comme la vache, la brebis et la chèvre (TAMIME, 2006)

Les laits fermentés traditionnels sont préparés dans beaucoup de pays du monde et avec des techniques toujours empiriques et primitives.

Ighi est un lait fermenté traditionnel produit en Algérie, cette dénomination est propre à la région de Kabylie. Il est produit à partir du lait de vache. Sa préparation se fait selon des procédés assez primitifs et ce dernier ne subit aucun traitement thermique (HARRATI, 1974)

La microflore des laits fermentés traditionnels est très diverse allant de la flore mésophile aérobie totale et des bactéries lactiques jusqu'à la flore de contamination comme les levures et moisissures, coliformes et germes pathogènes tels que *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* et les Salmonelles (NARVHUS et GADAGA, 2003).

Les bactéries lactiques sont à la base du processus de la fermentation du lait en lait fermenté, elles permettent de transformer le lactose en acide lactique et de ce fait abaisser le pH du produit. Elles sont également capables de synthétiser beaucoup de substances comme le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyl, l'acétaldéhyde et les bactériocines. Elles jouent, ainsi, un rôle très important dans la biopréservation des produits alimentaires (GUINANE *et al.*, 2005).

Les changements apportés aux procédés de fabrication des aliments suite à l'évolution des procédés technologiques et aux habitudes alimentaires (produits réfrigérés, prêts à cuisiner...) ont entraîné l'émergence de germes pathogènes psychrophiles comme *Listeria monocytogenes* qui est capable de croître à + 4°C.

D'autre part, l'utilisation répétée d'antibiotiques entraîne l'apparition de souches résistantes et l'emploi de conservateurs chimiques peut avoir des effets néfastes sur la santé humaine. Pour cela, les chercheurs se retournent vers la recherche de nouveaux bioconservateurs « naturels » tels que les bactériocines.

Les bactériocines sont des peptides à activité antimicrobienne, synthétisés par certains genres bactériens. Cependant celles produites par les bactéries lactiques sont reconnues comme sûres. Elles sont sensibles aux protéases digestives et ne sont pas toxiques pour les cellules eucaryotes (WIJAYA *et al.*, 2006).

La recherche de nouvelles souches de bactéries lactiques productrices de nouvelles bactériocines douées d'un maximum de caractéristiques et d'un spectre d'inhibition très large reste toujours d'actualité et ne cesse de stimuler les chercheurs à travers tout les pays du monde.

C'est dans cette optique que s'inscrit notre travail de recherche, isoler des souches lactiques sauvages productrices de bactériocines à partir d'un produit laitier fermenté traditionnel « *Ighi* ».

L'objectif de ce travail est dans une première étape de déterminer la qualité microbiologique du lait fermenté traditionnel « *Ighi* » produit et commercialisé dans la région de Tizi-Ouzou et dans une seconde étape d'isoler à partir de ces laits des bactéries lactiques productrices de bactériocines.

ETUDE
BIBLIOGRAPHIQUE

1- BACTERIES LACTIQUES

1.1- Généralités sur les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont définies comme des cellules vivantes procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes. Elles forment un groupe hétérogène composé de coques, coccobacilles et de bacilles, dont la principale fonction métabolique est de produire de l'acide lactique à partir de la fermentation des sucres (BADIS *et al.*, 2005 ; LABIOUI *et al.*, 2005).

Les bactéries lactiques sont des cellules qui gardent la coloration de Gram, généralement immobiles, exception faite pour certaines espèces du genre *Vagococcus*, très proche du genre *Lactococcus*, homofermentaires ou hétérofermentaires, anaérobie mais aérotolestants, ne possèdent ni la nitrate réductase ni cytochrome oxydase et elles sont catalase négative (DELLAGLIO *et al.*, 1994 ; POT, 2008 ; RIGAUX, 2008).

La plupart sont mésophiles mais certaines espèces peuvent se développer à +4°C ou à des températures supérieures à 40°C. Elles ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés, vitamines, acides gras et glucides (FUGELSANG et EDWARDS, 2007).

Etant dépourvues de cytochromes (elles sont incapables de synthétiser le noyau hème des porphyrines), elles sont incapables de toute respiration et toute leur énergie provient du métabolisme fermentaire (LEVEAU *et al.*, 1991).

1.2- Classification

Du point de vue taxonomique, les bactéries lactiques sont un vaste ensemble de micro-organismes procaryotes qui se rattache au phylum des *Clostridium* des bactéries à Gram positif dont le pourcentage de G+C est inférieur à 50%. Elles appartiennent à la lignée des *Firmicutes*, à la classe des *Bacilli* et à l'ordre des *Lactobacillales* (GARRITY *et al.*, 2007).

Le genre *Bifidobacterium* est considéré comme un genre lactique en raison de ses caractéristiques physiologiques et biochimiques semblables aux autres genres lactiques, cependant des études de biologie moléculaire basées sur la détermination du pourcentage G+C ont permis de classer ce genre dans le phylum des *Actinomycètes* (bactéries gram positif à G+C > 50%) (KLEIN *et al.*, 1998).

D'après STILES et HOLZAPFEL (1997) les bactéries lactiques qui interviennent dans les aliments regroupent les différents genres suivants: *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Bifidobacterium*, *Dolosigranulum*, *Globicatella*, *Lactosphaera*, *Melissococcus*.

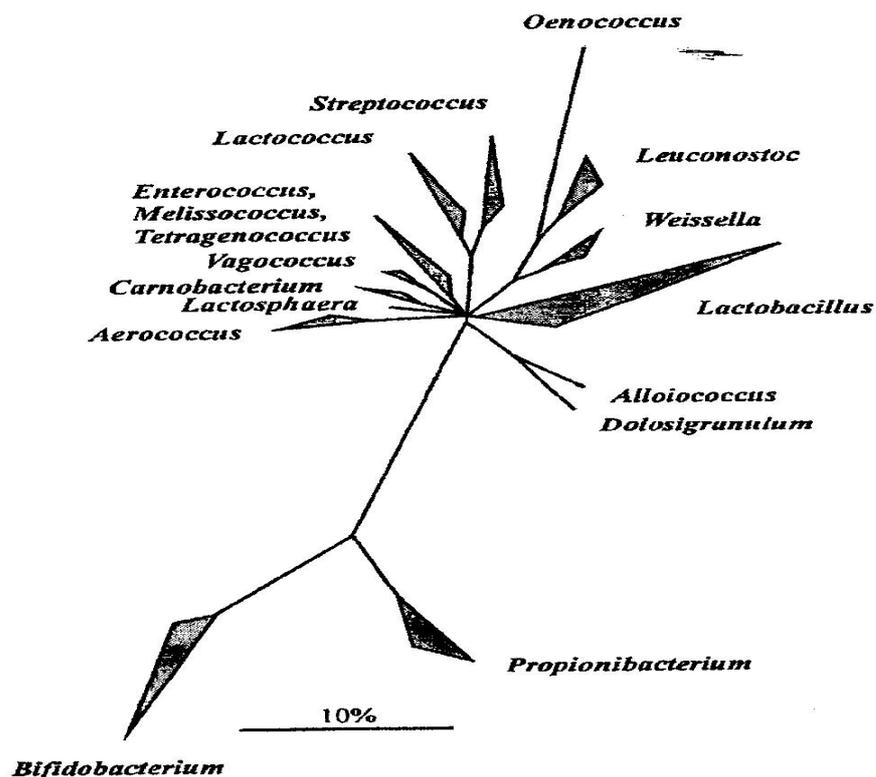
La relation phylogénétique basée sur la comparaison des séquences d'ARNr 16S ainsi que les principales caractéristiques physiologiques et biochimiques entre les différents genres des bactéries lactiques sont représentées dans la figure 1 et le tableau I.

Récemment 15 nouveaux genres lactiques ont été décrits : *Abiotrophia*, *Dolosicoccus*, *Eremococcus*, *Facklamia*, *Ignavigranum*, *Alkalibacterium*, *Allofustis*, *Desemzia*, *Granulicatella*, *Isobaculum*, *Marinilactibacillus*, *Trichococcus*, *Atropobacter*, *Paralactobacillus*, *Oscillospira* (GARRITY *et al.*, 2007).

Tableau I : Caractères différentiels des différents genres de bactéries lactiques (AXELSSON, 2004).

Genres	Caractères									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Carnobacterium</i>	-	-	+	-	ND	-	ND	-	L	9
<i>Lactobacillus</i>	-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	+/-	-	D, L, DL	104
<i>Aerococcus</i>	+	-	+	-	+	-	-	+	L	6
<i>Enterococcus</i>	-	-	+	+	+	-	+	+	L	33
<i>Lactococcus</i>	-	-	+	-	-	-	+/-	-	L	5
<i>Vagococcus</i>	-	-	+	-	-	-	+/-	-	L	6
<i>Leuconostoc</i>	-	+	+	-	+/-	-	+/-	-	D	14
<i>Oenococcus</i>	-	+	+	-	+/-	-	+/-	-	D	2
<i>Pediococcus</i>	+	-	+/-	+/-	+/-	-	+	-	L, DL	10
<i>Streptococcus</i>	-	-	-	+/-	-	-	-	-	L	65
<i>Tetragenococcus</i>	+	-	+	-	+	+	-	+	L	4
<i>Weissella</i>	-	+	+	-	+/-	-	+/-	-	D, DL	11

1 : formation de tétrades ; 2 : production de CO₂ ; 3 : croissance à 10°C ; 4 : croissance à 45°C ; 5 : croissance à 6,5% NaCl ; 6 : croissance à 18% NaCl ; 7 : croissance à pH 4,4 ; 8 : croissance à pH 9,6 ; 9 : type d'acide lactique ; 10 : nombre d'espèces identifiées.

**Figure 1 :** Arbre phylogénétique construit à partir de l'analyse comparative des séquences d'ARNr 16S montrant les principaux genres de bactéries lactiques (HOLZAPFEL *et al.*, 2001).

1.2.1- *Enterococcus, Lactococcus et Streptococcus*

Le nom générique de «*Streptococcus*» a été proposé pour la première fois par ROSENBAACH en 1884, il regroupe toutes les espèces dont les cellules bactériennes forment des chaînes de cellules et qui sont associées aux infections humaines (STILES et HOLZAPFEL, 1997).

1.2.1.1- *Streptococcus*

Malgré l'identification de nouveaux genres lactiques, les streptocoques restent toujours difficiles à classer. Ce genre comprend des espèces chimio-organotrophes, non sporulées dont les cellules sont en forme de cocci ou de coccobacilles groupées en paires ou en chaînettes. Elles possèdent un métabolisme homofermentaire avec production d'acide L-lactique (PILET *et al.*, 1998 ; POT, 2008).

Les espèces de ce genre ont été initialement regroupées au sein d'un même genre «*Streptococcus*». Des études effectuées par Kilpper-Balz *et al* (1982) sur le séquençage et la comparaison de l'ARN 23S et par Stacke-Brandt et Teuber (1988) sur l'ARN 16S ont abouti à divisé les Streptocoques en trois groupes : les Streptocoques au sens stricte, le genre *Lactococcus* et le genre *Enterococcus*.

Le genre Streptocoque est divisé en trois groupes : les Streptocoques oraux, Streptocoques pyogènes et autres Streptocoques. Les Streptocoques pyogènes comprennent des espèces pathogènes comme *S. agalactiae* et *S. pyogène*, l'espèce *S. pneumoniae* est également incluse dans ce groupe. Les streptocoques oraux forment une microflore importante et normale de la cavité buccale et des voies respiratoires supérieures de l'homme, on peut en citer *S. mutans* l'agent étiologique des caries dentaires (AXELSSON, 2004 ; HARDIE et WHILEY, 2006).

L'espèce thermophile *Streptococcus thermophilus* se différencie des autres par son habitat, le lait et produits laitiers et également par son caractère non pathogène. Cette espèce a été classée initialement dans le groupe «autre Streptocoques», elle a été ensuite transférée vers le groupe des Streptocoques oraux et ceci suite à une forte homologie observée aux cours des études d'hybridation ADN-ADN entre cette dernière et l'espèce *Streptococcus salivarius* (STILES et HOLZAPFEL, 1997 ; POT, 2008).

1.2.1.2- *Enterococcus*

Le genre *Enterococcus* rassemble la plupart des espèces du groupe sérologique D et comprend notamment des espèces anciennement désignées sous le terme de Streptocoques fécaux, comme *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*. Ils se caractérisent par un développement à 10°C et à 45°C et par une aptitude à croître en présence de 6,5% NaCl et à pH 9,6. Ils se caractérisent également par une résistance aux facteurs de l'environnement (PILET *et al.*, 1998).

Les Entérocoques ont été longtemps assimilés aux *Lactococcus*, cependant des études faites sur l'ARN 16S (séquençage et la comparaison) ont permis de séparer définitivement les espèces de ce genre du genre *Lactococcus* (OGIER et SERROR, 2007).

1.2.1.3- *Lactococcus*

C'est à Lister qu'appartient la première description des *Lactococcus* en 1873. Ce sont des bactéries apparues avant les cyanobactéries photosynthétiques et leur présence sur la surface de la terre remonterait à 2,75 milliard d'années (TEUBER et GEIS, 2006).

Les espèces du genre *Lactococcus* sont associées à de nombreuses fermentations alimentaires et ne présentent pas de caractère pathogène et de ce fait possèdent le statut GRAS « *Generally Recognized As Safe* » qui autorise leur usage dans le domaine agro-alimentaire particulièrement dans les processus de fermentation en tant que souches starters et dans la biopreservation grâce à leurs aptitudes à produire des bactériocines (CASTALA et MONTEL, 2008).

1.2.1.4- *Vagococcus*

Ce genre a été récemment décrit et ses espèces sont souvent confondues avec celles du genre *Lactococcus*. En effet, ce genre ne diffère du genre *Lactococcus* que par la mobilité de ses espèces et leurs profil en acide gras (COLLINS *et al.*, 1989 ; AXELSSON, 2004).

1.2.2- *Aerococcus, Pediococcus et Tetragenococcus*

Les *Pediococcus* sont des coques homofermentaires, regroupés en tétrades, ils sont mésophiles et le plus souvent incapables d'utiliser le lactose, ne produisent pas de CO₂ à partir du glucose et ne réduisent pas les nitrates (PILET *et al.*, 1998 ; HOLZAPFEL *et al.*, 2006).

Cependant, certaines espèces comme *P. halophilus* se distingue des autres espèces du genre *Pediococcus* par son aptitude à croître en présence de 18% NaCl. Des études basées sur le séquençage de l'ARN 16S ont permis de séparer cette espèce halophile du genre *Pediococcus* et de créer le genre *Tetragenococcus* (STILES et HOLZAPFEL, 1997).

Le genre *Aerococcus* ressemble beaucoup au genre *Pediococcus*, ce genre est constitué de cinq espèces. Récemment, l'espèce *P. urinae* a été transférée vers le genre *Aerococcus* et ceci suite à une très forte homologie (99,9%) de séquence de l'ARN 16S avec l'espèce *Aerococcus viridans* (POT, 2008).

1.2.3- *Leuconostoc, Oenococcus et Weissella*

Les espèces de ce genre rassemblent les coques lenticulaires en paire ou en chainettes, mésophiles, possédant un métabolisme hétérofermentaire avec production d'acide lactique D, de CO₂ et d'éthanol. Certaines espèces synthétisent du dextrane quand elles sont cultivées dans un milieu très riche en saccharose (JOHANNA et HOLZAPFEL, 2006).

Les *Leuconostoc* possèdent l'aptitude de dégrader le citrate du lait et d'en former du diacétyle. L'espèce *Leuconostoc mesenteroide ssp cremoris* est très utilisée dans l'industrie laitière (LEVEAU *et al.*, 1991 ; AXELSSON, 2004).

L'espèce *Leuconostoc oenos* se caractérise par une plus grande tolérance à l'acidité car elle peut pousser à un pH initial de 4,8, ceci à entraîner son intégration dans le nouveau genre : *Oenococcus*. (HUTKINS, 2006).

Le genre *Weissella* a été décrit pour la première fois par COLLINS *et al* (1993). Un polymorphisme cellulaire allant de la forme sphérique à la forme lenticulaire est observé chez les espèces de ce genre (STILES et HOLZAPFEL, 1997).

Plusieurs caractéristiques physiologiques et biochimiques différentielles ont été observées entre le genre *Leuconostoc* et le genre *Weissella*, telles que l'hydrolyse de l'esculine, les conditions de croissance (pH et température) et fermentation des sucres (AXELSSON, 2004 ; JOHANNA et HOLZAPFEL, 2006).

1.2.4- *Lactobacillus et Carnobacterium*

Les Lactobacilles sont des cellules à Gram positif, asporulées, de forme bacillaire, catalase négative, non mobile et occasionnellement nitrate réductase positive. Leur métabolisme est soit homofermentaire avec production de plus de 85% d'acide lactique à partir du lactose, soit hétérofermentaire avec production d'un mélange d'acide lactique, CO₂ et éthanol (LEVEAU *et al.*, 1991 ; HAMMES et HERTEL, 2006).

D'après VERNOUX *et al* (2007), le genre *Lactobacillus* contient 135 espèces et 27 sous espèces, ce dernier manifeste une très large hétérogénéité morphologique qui est reflétée par le pourcentage de G+C dans la composition de l'ADN et qui varié de 32 % à 55 % (AXELSSON, 2004 ; POT, 2008).

Les Lactobacilles sont divisés en trois groupes selon que leur métabolisme soit homofermentaire obligatoire, hétérofermentaire facultatif ou hétérofermentaire obligatoire (PILET *et al.*, 1998). Les espèces de ce genre sont très répandues dans la nature, elles sont présents dans les produits végétaux, animaux et elles sont liées à de nombreuses fermentations alimentaires (LEVEAU *et al.*, 1991).

Le genre *Carnobacterium* est morphologiquement très proche des lactobacilles, néanmoins certaines caractéristiques physiologiques et biochimiques les différencient des lactobacilles comme leur tendance psychrotrophe et leur production majoritaire d'acide L lactique (AXELSSON, 2004) Une autre différence assez importante entre les deux genre est la composition chimique du peptidoglycane de la paroi, les lactobacilles possèdent le dipeptide Lys-Asp alors que les *Carnobacterium* possèdent l'acide méso-diaminopimélique (HAMMES et HERTEL, 2006).

Les *Carnobacterium* sont isolées à partir de produits carnés ou de produits de mer (STILES et HOLZAPFEL, 1997 ; PILET *et al* 1998).

1.3- Le genre *Lactococcus*

1.3.1- Principales caractéristiques

Il s'agit de bactéries en forme de coques, de diamètre compris entre 0,5 et 1 µm. Leur division s'effectue parallèlement à un seul plan, ce qui conduit à des associations de cellules par paires (diplocoques), en chaînes et en chaînes de diplocoques (Streptodiplocoques) (LEVEAU *et al.*, 1991 ; TEUBER et GEIS, 2006).

Ce sont des cellules à Gram positif, non mobiles, mésophiles poussent à 10°C et à 40°C mais pas à 45°C, se développent à 4% NaCl (exception faite pour *Lactococcus cremoris*) mais pas à 6% NaCl et à pH 9,6. Certaines espèces de *Lactococcus* peuvent également se développer à 0,1% de bleu de méthylène (LEVEAU *et al.*, 1991 ; HOLT *et al.*, 1994).

Elles sont anaérobies facultatives, catalase négative, asporulées et présentent un métabolisme homolactique en produisant de l'acide lactique L(+) par la voie des hexoses diphosphates (PILET *et al.*, 1998). Les espèces du genre *Lactococcus* sont caractérisées par un % GC qui varie de 34% à 43%, la taille de leur génome est comprise entre 2300-2600Kb (CAMPO *et al.*, 2002).

Généralement, les *Lactococcus* ne présentent pas de pouvoir pathogène, cependant certaines espèces comme *lc. garvieae* est considérée comme l'agent étiologique de la

lactococcoses, une maladie émergente qui affecte beaucoup d'espèces de poisson en provoquant une septicémie aigüe et hémorragique (VENDRELL *et al.*, 2006).

1.3.2- Classification et écologie

Comme tout groupe microbien, les bactéries lactiques voient leur systématique et leur classification sans cesse modifiées surtout avec l'avènement des techniques nouvelles de biologie moléculaire. La première description des cellules appartenant au genre *Lactococcus* revient à LISTER (1873), il leur donna le nom de «*Bacterium lactis*», cette dernière a été ensuite classée par Orla-Jensen (1919) dans le genre *Streptococcus* créé par ROSENBAACH (1884) et lui donna le nom de «*Streptococcus lactis*» (TEUBER et GEIS, 2006).

Avec la caractérisation sérologique des *streptococcus* en 1933, LANCEFIELD regroupa toutes les cellules apparentées à cette souche dans le groupe sérologique N, mais suite à des études de séquençage et de comparaison de l'ARNr 16S, CHELEIFER (1985) rassembla certaines espèces du groupe sérologique N dans un nouveau genre qu'il appela «*Lactococcus*» (STILES et HOLZAPFEL, 1997).

Actuellement, le genre *Lactococcus* contient cinq espèces : *Lactococcus lactis*, *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus piscium*, *Lactococcus plantarum* et *Lactococcus raffinolactis* (CASTALA et MONTEL, 2008). La relation phylogénétique entre les espèces du genre *Lactococcus* ainsi que leurs caractéristiques sont présentées dans la figure 2 et le tableau II respectivement.

Récemment, une nouvelle espèce de *Lactococcus* a été découverte par CHO *et al* (2008) : *Lactococcus chungangensis* sp.

Cependant, une seule espèce *Lactococcus lactis* et ses deux sous espèces *Lactococcus lactis* ssp *lactis* ainsi que son biovar *diacetylactis* et *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* qui sont très utilisées dans les industries alimentaires. *Lactococcus lactis* représente un intérêt économique très considérable dans la transformation des aliments. (DELLAGLIO *et al.*, 1994 ; STILES et HOLZAPFEL, 1997).

L'espèce *Lactococcus lactis* est subdivisée en trois sous espèces : *Lactococcus lactis* ssp *lactis* (anciennement *Lactobacillus xylosus*), *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* (anciennement *Streptococcus cremoris*), *Lactococcus lactis* ssp *hordniae* (anciennement *Lactobacillus hordniae*). Leurs principales caractéristiques sont données dans le tableau III.

La sous espèce *Lactococcus* ssp *lactis* biovar *diacetylactis* se caractérise par la production du diacétyle à partir du citrate, elle n'a pas le statut d'une sous-espèce car cette caractéristique biochimique liée à la production du diacétyle est très instable du fait de son support plasmidique (STILES et HOLZAPFEL, 1997 ; LUKAČ *et al.*, 2001).

Les espèces de *Lactococcus* sont associées à de nombreuses fermentations alimentaires, elles se rencontrent plus souvent dans la nature où elles sont associées aux plantes, aux animaux et à l'homme. Les produits végétaux sont leur principal réservoir, mais ils sont largement présents dans le lait et les produits laitiers (PILET *et al.*, 1998).

Lactococcus garvieae et *Lactococcus raffinolactis* sont souvent isolés à partir des laits crus, on les retrouve également sur la peau et dans la salive des animaux. *Lactococcus piscium* est isolé de salamondes et *Lactococcus plantarum* est souvent isolé des petits pois (TEUBER et GEIS, 2006).

Tableau II : Caractéristiques distinctives des espèces du genre *Lactococcus* (LARPENT 1991, LEVEAU *et al.*, 1991 ; TEUBER et GEIS, 2006).

Caractères	<i>Lc. lactis</i> <i>subsp lactis</i>	<i>Lc. subsp</i> <i>cremoris</i>	<i>Lc. lactis subsp</i> <i>hordniae</i>	<i>Lc. garviae</i>	<i>Lc. plantarum</i>	<i>Lc.</i> <i>raffinolactis</i>
Type de peptidoglycane	Lys-D-Asp	Lys-D-Asp	Lys-D-Asp	Lys-Ala-Gly-Ala	Lys-Ser-Ala	Lys-Thr-Ala
Croissance à 40°C	+(v)	-	-	+	v	-
Croissance en présence de NaCl 4%	+	-	-	+	+	-
Fermentation :						
Amygdaline	v	-	-	+	(+)	v
Galactose	+	+	-	+	-	+
Lactose	+	+	-	+	-	+
Maltose	+	-	-	+(v)	+	+
Mélibiose	-	-	-	v	-	+
Mélizitose	-	-	-	-	+	v
Raffinose	-	-	-	-	-	+
Ribose	+	-	-	+	-	-(v)
Salicine	+(v)	-(v)	+	+	+	+
Sorbitol	-	-	-	-	+	-
Saccharose	v	-	+	v	+	-
Tréhalose	+	-(v)	(+)	+	+	+
hydrolyse de l'arginine	+	-	+	+	-	-(v)

+ : réaction positive, - : réaction négative, v : réaction variable.

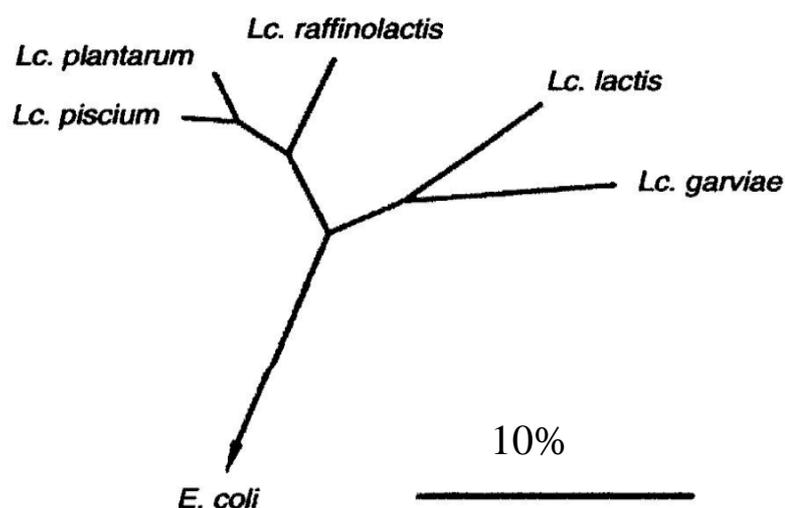
**Figure 2** : Arbre construit à partir de l'analyse comparative des séquences d'ARNr 16S montrant la relation phylogénétique entre les espèces du genre *Lactococcus* (TEUBER et GEIS, 2006).

Tableau III : Principales caractéristiques des sous espèces de *Lactococcus lactis* (TEUBER et GEIS 2006).

Caractéristiques	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>	<i>Lactococcus lactis ssp lactis biovar diacetylactis</i>	<i>Lactococcus lactis ssp cremoris</i>
Croissance à 10°C	+	+	+
à 40°C	+	+	-
à 45°C	-	-	-
Croissance à 4% NaCl	+	+	-
à 6,5% NaCl	-	-	-
Croissance à pH 9,2	+	+	-
Croissance en présence de 0.1% bleu méthylène	+	+	-
ADH	+	+	-
CO ₂ à partir du citrate	-	+	-
Diacétyle et acétoïne	-	+	-
Fermentation du maltose	+	+	Rarement
Hydrolyse de l'amidon	-	-	-
Thermorésistance 30min à 60°C	V	V	V
Groupe sérologique	N	N	N
% GC	33,8-36,9	33,6-34,8	35,0-36,2

+ : réaction positive, - : réaction négative, v : réaction variable.

Lactococcus lactis et ses sous-espèces sont très répandues dans les laits crus, laits fermentés et fromages (TAMIME, 2006). Ils représentent également la flore majoritaire dans les produits fermentés traditionnels comme le *leben* Algérien, le *lben* marocain et le *lben* Tunisien (HARRATI, 1974 ; TANTAOUI-ELARAKI *et al.*, 1983 ; BEN AMOR *et al.*, 1998 ;).

Lactococcus lactis est présent aussi dans d'autres laits fermentés traditionnels d'Afrique comme, *Ergo* d'Ethiopie et le *Kule naoto* de Kenya (GONFA *et al.*, 2001 ; MATHARA *et al.*, 2004).

1-3-3 Métabolisme

Les bactéries lactiques sont des bactéries qui ne possèdent pas de cytochrome, elles sont incapables d'effectuer un métabolisme respiratoire et s'en remettent entièrement à la fermentation. Les *Lactococcus* sont des bactéries ayant un métabolisme homofermentaire et qui produisent leur énergie métabolique par phosphorylation au niveau du substrat pendant la fermentation des glucides (LARPENT, 1991 ; PELMONT, 1995).

Cependant, *Lactococcus lactis* est capable d'effectuer une respiration sur un milieu riche en hème en aérobiose et d'utiliser l'oxygène comme accepteur final d'électrons. Le gène de la cytochrome oxydase a été isolé, séquencé chez *Lactococcus lactis* MG1363 (DUWAT *et al.*, 2001).

Les bactéries lactiques sont également des cellules hétérotrophes et possédant des besoins nutritionnels particulièrement complexes car en plus des hydrates de carbone, les souches lactiques exigent plusieurs acides aminés, peptides, vitamines et les précurseurs des bases azotées (JUILLARD *et al.*, 1996).

1-3-3-1 Métabolisme des hydrates de carbones

Comme toute bactérie lactique, les *Lactococcus* utilisent les hydrates de carbones comme source de carbone et d'énergie. Deux systèmes sont particulièrement important pour le transport des sucres : le système phosphoenolpyruvate (PTS) et le système perméase (POSTMA *et al.*, 1993).

- **Système perméase**

Dans ce système, les molécules du substrat ne sont pas modifiées chimiquement au cours de leur passage à travers la membrane cytoplasmique. Une enzyme membranaire (ATPase) couple l'hydrolyse de l'ATP à la sortie de protons générant ainsi un potentiel électrochimique de protons appelé force motrice le long de la membrane cytoplasmique. Le transport du sucre se fait suite à un couplage avec le mouvement des protons le long du gradient électrochimique. Une fois à l'intérieur de la cellule, le sucre va être phosphorylé par une kinase ATP dépendante et ensuite dégradé (DESMAZEAUD, 1983 ; POOLMAN, 2002).

- **Le système PTS**

Ce système est un ensemble complexe d'enzymes qui a comme fonction la translocation du sucre à travers la membrane cytoplasmique couplée à une phosphorylation de ce dernier. Trois protéines sont impliquées dans ce système : deux protéines de couplage énergétique, l'enzyme I (EI) et HPr. Ces deux protéines sont présentes chez toutes les bactéries et ne présentent pas de spécificité vis-à-vis d'un substrat quelconque. La troisième protéine est l'enzyme E II (EII), cette dernière est par contre spécifique au substrat à transporter. L'enzyme EII est constituée de trois domaines (EIIA, EIIB et EIIC) (AXELSSON, 2004 ; NEVES *et al.*, 2005).

Le processus de translocation et d'internalisation commence avec le transfert du groupement phosphate du PEP vers la protéine EI puis vers HPr. La protéine HPr phosphorylée catalyse à son tour la phosphorylation de l'enzyme EII, ensuite le sucre est phosphorylé par les domaines EIIA ou EIIB (POOLMAN, 2002).

Chez *Lactococcus lactis* le glucose est transporté généralement par le système PTS-mannose (forte affinité pour le glucose) ou par le système PTS-glucose (moindre affinité pour le glucose). Le fructose et le mannose sont également transportés par le système PTS-mannose. Le glucose peut être également transporté par le système perméase et sera phosphorylé par une glucokinase intracellulaire (NEVES *et al.*, 2005).

- **Métabolisme du glucose et du lactose**

En fonction de sa voie d'internalisation dans la cellule, le glucose va rejoindre directement la glycolyse s'il est transporté par le système PTS (forme phosphorylée G6P), soit indirectement s'il est transporté par une perméase (forme libre, non phosphorylée). Les principales étapes de la voie glycolytique sont représentées dans la figure 3 (DESMAZEAUD, 1983).

Les différentes voies du métabolisme du lactose sont aussi étroitement liées au type du transporteur. Si le lactose est transporté par le système PTS-lactose, il se retrouve sous sa forme phosphorylée (lactose-6-phosphate) et il va être clivé par une phospho β galactosidase en galactose 6-phosphate et en glucose. Le glucose va rejoindre la glycolyse après phosphorylation tandis que le galactose-6-phosphate va rejoindre la voie du Tagatose-6-phosphate pour ensuite

rejoindre la glycolyse. Les principales étapes de la voie du Tagatose-6-phosphate sont représentées dans la figure 3 (DESMAZEAUD, 1983 ; LARPENT, 1991).

Si par contre le lactose est transporté par une perméase et une fois à l'intérieur de la cellule, il va être clivé par une β galactosidase en glucose et galactose. Le glucose va rejoindre la glycolyse et le galactose la voie de Leloir. Les principales étapes de la voie de Leloir sont représentées dans la figure 3 (DESMAZEAUD, 1983).

Les bactéries du genre *Lactococcus* sont également capables de dégrader d'autres hydrates de carbone comme le saccharose, maltose, xylose, arabinose, raffinose, tréhalose et l'arabinose. Ces oses sont transportés soit par une perméase soit par le système PTS (LARPENT, 1991).

D'autres galactosides comme le mélibiose peuvent être utilisés par les espèces du genre *Lactococcus*. *Lactococcus raffinolactis* ATCC 43920 est capable de cataboliser le mélibiose, les gènes codant pour les enzymes hydrolytiques comme l' α -galactosidase et ceux de la voie de Leloir ont été isolés, amplifiés, séquencés et finement caractérisés. Ces derniers sont organisés en opérons et sont fortement induits par la présence du lactose, mélibiose et le raffinose (BOUCHER, 2003).

AXELSSON (2004) rapporte que la souche *Lactococcus lactis* 64.1 est capable d'utiliser le maltose, ce dernier est transporté par une perméase puis il est dégradé en glucose et β -glucose-1-phosphate. Le glucose va rejoindre la glycolyse tandis que le β -glucose-1-phosphate va servir à la synthèse de la paroi bactérienne. D'autres études suggèrent que le β -glucose-1-phosphate issu de la dégradation du maltose est converti en α glucose-1-phosphate par une β -phosphoglucomutase. Ce dernier va rejoindre directement la glycolyse (QUIAN *et al.*, 1997 ; NILSSON et RADSTROM, 2001).

Des sucres complexes comme l'amidon peuvent être aussi utilisés par certaines souches de *Lactococcus*, des gènes codant pour les enzymes amylolytiques (*amyL*, *amyY*, *apu* et *glpP*) ont été mis en évidence dans le génome de la souche *Lactococcus lactis* IL1403 (BOLOTIN *et al.*, 2001). PETROV *et al* (2008) ont isolé à partir de produits fermentés une nouvelle souche de *Lactococcus* (*Lactococcus lactis* ssp *lactis* B84) ayant des aptitudes amylolytiques et capable de transformer la totalité de l'amidon en acide lactique L(+).

1-3-3-2 Métabolisme du citrate

Le citrate est présent à faible concentration dans le lait (environ 1,7mg/ml) comparativement au lactose, mais il constitue néanmoins une substance clé dans l'élaboration des produits laitiers fermentés. Le citrate est en effet un précurseur du diacétyle, de l'acétaldéhyde, de l'acétate et du CO₂ qui sont les principaux arômes de produit laitiers (DELLAGLIO *et al.*, 1994).

Les bactéries lactiques qui métabolisent le citrate jouent un rôle important dans de nombreux procédés laitiers, car dans ces bactéries, le co-métabolisme du citrate et du lactose entraînent la production du diacétyle, d'acétoïne et de CO₂, participant ainsi aux qualités aromatiques et texturales des produits laitiers (DESMAZEAUD, 1983).

Parmi les espèces du genre *Lactococcus*, seul *Lactococcus lactis* ssp *lactis* biovar *diacetylactis* est capable de métaboliser le citrate. La première étape du métabolisme du citrate est son transport à l'intérieur de la cellule, ce dernier est transporté par une enzyme inductible

«la citrate perméase» et sans modification chimique (DESMAZEAUD, 1983 ; KONINGS *et al.*, 1989 ; LUKAČ *et al.*, 2001).

Cependant d'autres études ont montré que le citrate ne constitue pas un inducteur pour la citrate perméase, mais cette dernière est induite par l'acidité provoquée suite au co-métabolisme lactose-citrate (HUGENHOLTZ, 1993 ; GARCIA-QUINTANS *et al.*, 1998).

Une fois à l'intérieur de la cellule, le citrate est scindé en oxaloacetate et en acétate par une citrate lyase. L'oxaloacetate est ensuite décarboxylé en pyruvate et en CO₂ par une oxaloacetate decarboxylase. Le pyruvate va être ensuite métabolisé par différentes voies en fonction des souches et des conditions de culture. Les différentes voies sont représentées dans la figure 4 (AXELSSON, 2004 ; RAYNAUD, 2006).

MAGNI *et al* (1999) ont montré que le transport du citrate est très actif à pH acide et est couplé à l'expulsion du lactate vers l'extérieur de la cellule. De ce fait, l'utilisation du citrate par la cellule bactérienne représente un moyen de défense vis-à-vis du stress provoqué par l'acidité et l'abaissement du pH.

1-3-3-3 Métabolisme du pyruvate

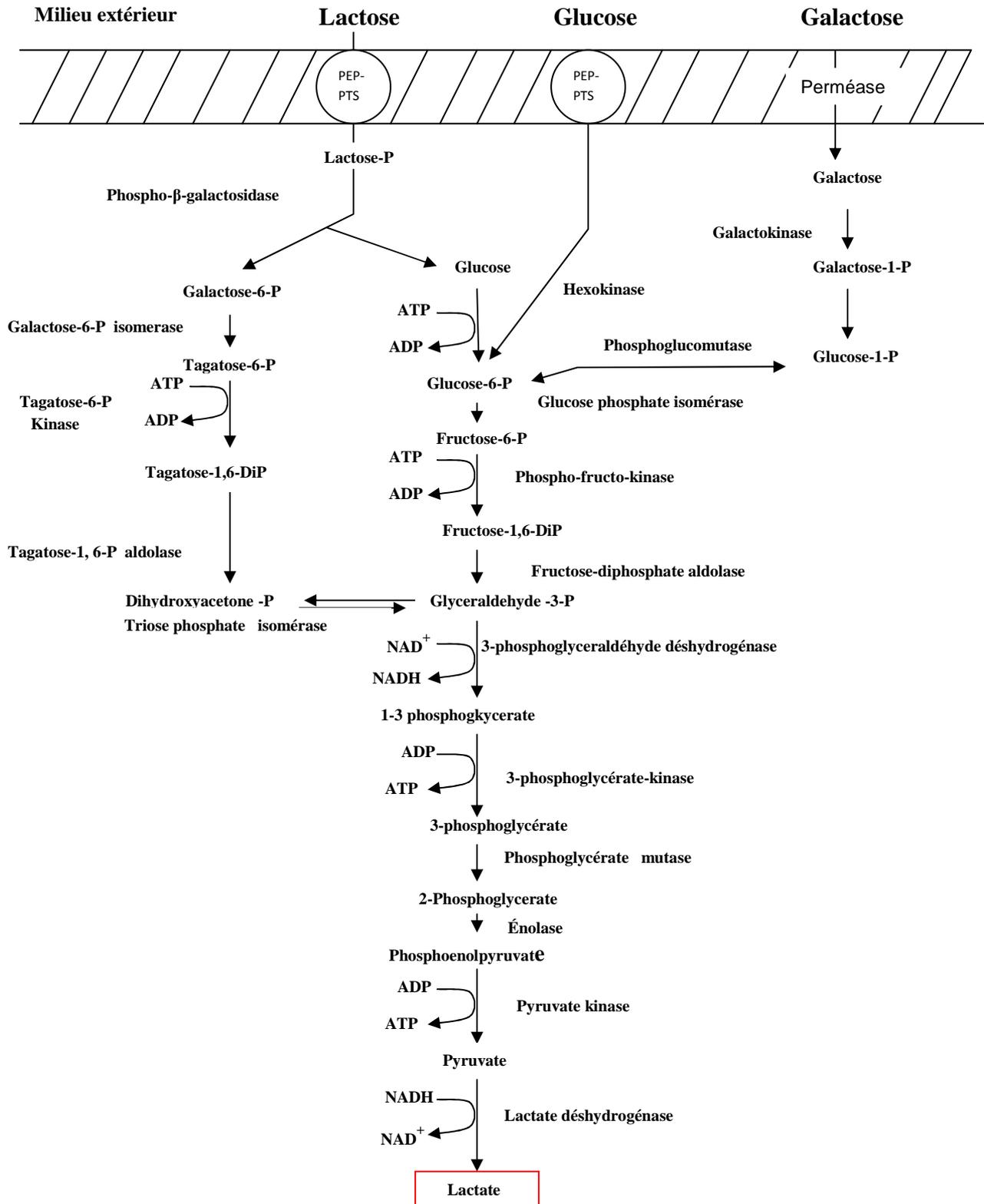
Le pyruvate constitue une substance clé du métabolisme des bactéries lactiques dans le lait, car il résulte à la fois de la dégradation des sucres (glycolyse) et des citrates. Il est d'autre part, à l'origine de nombreux produits finaux du métabolisme : lactate, formiate, éthanol, acétate, butane diol et CO₂, mais aussi des substances intermédiaires telles que le diacétyle et l'acétaldéhyde qui sont recherchés pour leurs propriétés aromatiques (LARPENT, 1991).

Chez *Lactococcus lactis ssp lactis biovar diacetylactis*, le pyruvate provenant de la dégradation du lactose ne se convertit en diacétyle et acétoïne qu'en présence du citrate, car il est transformé préférentiellement en lactate pour réoxyder le NADH en NAD⁺ nécessaire à la poursuite du métabolisme.

En présence du citrate et de lactose, *Lactococcus lactis ssp lactis biovar diacetylactis* produit plus de pyruvate qu'il n'est nécessaire pour régénérer le NAD⁺ ; cet excès devient toxique pour la cellule et est éliminé sous forme de diacétyle et d'acétoïne. Cependant, une petite partie du pyruvate provenant de la glycolyse peut être convertie en acétaldéhyde mais surtout en éthanol par une alcool déshydrogénase (LARPENT, 1991 ; RAYNAUD, 2006).

Dans les conditions d'anaérobioses, le glucose est converti en lactate pour réoxyder le NADH. Beaucoup de souches de *Lactococcus lactis ssp lactis biovar diacetylactis* peuvent produire des molécules autres que le lactate, à partir du pyruvate telles que l'acétate, le CO₂, le formiate, l'éthanol, l'acétoïne, le diacétyle et 2,3 butane diol (AXELSSON, 2004).

La formation du lactate à partir du pyruvate n'implique qu'une seule enzyme : la lactate déshydrogénase alors que la production des composés cités précédemment implique tout un ensemble d'enzymes. Les différentes voies du métabolisme du pyruvate en fonction des espèces et des conditions de culture sont représentées dans la figure 4 (RAYNAUD, 2006).



VOIE DU D-TAGATOSE-6-P

VOIE GLYCOLYTIQUE DE
EMBDEN-MEYERHOF-PARNAS

VOIE DE LELOIR

Figure 3 : Voies principales du transport et du catabolisme du lactose, glucose et galactose chez les streptocoques homofermentaires (DESMAZEAUD, 1983).

1-3-3-4 Métabolisme azoté

Pour se développer, les bactéries lactiques exigent la présence de plusieurs acides aminés car elles sont incapables d'en effectuer la synthèse à partir des composés azotés simples. Le lait contient des concentrations faibles en acides aminés libres ce qui ne permet pas une croissance optimale des bactéries lactiques (LARPENT, 1991).

Les espèces du genre *Lactococcus* ne font pas exception du reste des genres lactiques, elles sont également auxotrophes pour plusieurs acides aminés comme l'acide glutamique, histidine, isoleucine, leucine, méthionine, valine, arginine, cystéine et la phenylalanine. Ces dernières possèdent un système protéolytique complexe nécessaire pour l'hydrolyse des protéines du lait comme les caséines afin d'en satisfaire leur besoin nutritionnels en matière d'acides aminés (THOMAS et MILLS, 1981 ; MONNET et CRIPON, 1994).

Dans le lait, la croissance et l'assimilation des sources azotées par *Lactococcus* est divisée en deux étapes, la première étape est l'utilisation des acides aminés libres et les peptides du lait, dans une deuxième étape, le système protéolytique attaque les protéines comme les caséines (LETORT *et al.*, 2002). Les acides aminés libres et les peptides du lait sont transportés par des transporteurs spécifiques couplés soit à une force proton motrice soit à une hydrolyse de l'ATP (POOLMAN et KONINGS, 1988).

Les caséines du lait sont dégradées par une peptidase (PrtP) localisée au niveau de la paroi cellulaire, c'est une protéase à serine caractérisée par un domaine catalytique constitué d'environ 500 résidus d'acides aminés. On distingue deux types de protéases (type PI et PIII) et ceci en fonction de leur affinité d'hydrolyse pour les caséines. Le type PI hydrolyse préférentiellement la caséine β et κ tandis que le type PIII manifeste une affinité catalytique pour les trois types de caséines à savoir α , β et κ (REID *et al.*, 1994 ; KUNJI *et al.*, 1996 ; FERNANDEZ-ESPLA *et al.*, 2000).

L'hydrolyse des protéines du lait et des caséines génère des peptides de tailles différentes, ces derniers sont internalisés par trois systèmes de transport spécifiques : Opp, DtpT et DtpP. Une fois à l'intérieur de la cellule bactérienne, ils vont être à leur tour hydrolysés par des peptidases intracellulaires en acides aminés libres pour être utilisés pour la croissance (HAGTING *et al.*, 1995).

PICCON *et al* (2010) ont isolé à partir du lait cru des souches sauvages de *Lactococcus lactis* qui possèdent à la fois les deux types de transporteurs de peptides à savoir Opp et Dpp. Ils ont également constaté une très forte corrélation entre la présence de ces deux transporteurs et le pouvoir d'assimilation des peptides et par conséquent un très haut pouvoir protéolytique.

Les différentes étapes essentielles de la protéolyse chez *Lactococcus lactis* sont représentés dans la figure 5. Le système protéolytique de *Lactococcus lactis* est également impliqué dans le développement de la saveur et de la flaveur du fromage par la production de peptides et d'acides aminés précurseurs d'arômes (AXELSSON, 2004).

1-3-4 Activités antimicrobiennes des *Lactococcus*

Les *Lactococcus* sont capables de produire une variété de substances à effet antimicrobien tels que les acides organique, le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines (peptides ou protéines à activité antimicrobienne). De ce faite, elles sont capables d'inhiber la flore pathogène de contamination. Elles peuvent aussi exercer un pouvoir inhibiteur par le phénomène évolutif qui est la compétition nutritionnelle. Ces aptitudes inhibitrices d'autres espèces microbiennes fait des

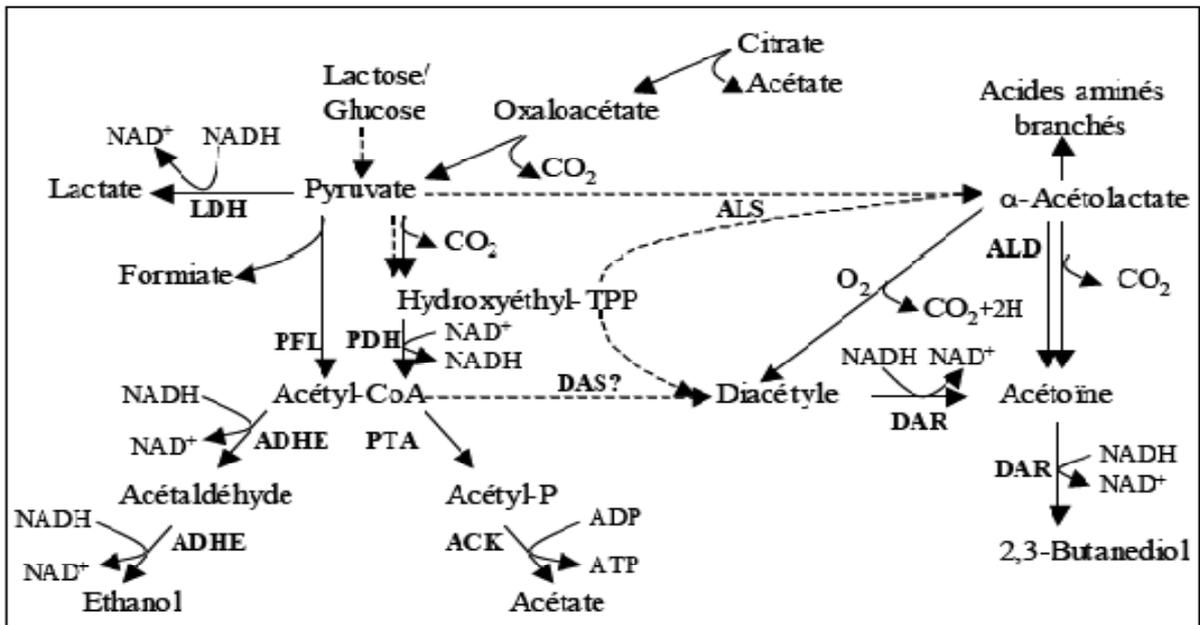


Figure 4 : Métabolisme du pyruvate et du citrate (RAYNAUD, 2006).

LDH : lactate deshydrogénase ; PFL : pyruvate formate lyase ; PDH : pyruvate deshydrogénase ; PTA : phosphotransacétylase ; ACK : acetate kinase ; ADHE : alcool deshydrogénase ; ALS : α -cétolactate synthase ; ALD ; α -cétolactate decarboxylase ; DAS : diacétyle synthase ; DAR : diacétyle-acetate reductase.

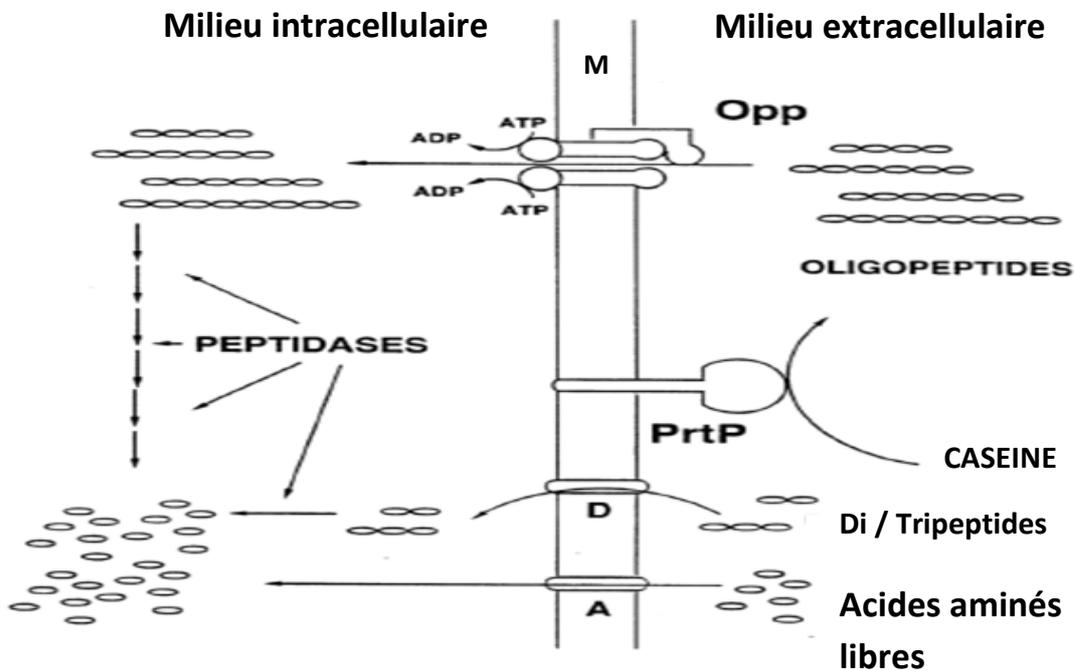


Figure 5 : Métabolisme azoté chez *Lactococcus lactis* (AXELSSON, 2004).

Lactococcus d'excellents acteurs dans la biopréservation des produits alimentaires (PIARD et DESMAZEAUD, 1991 ; DACOSTA, 2000).

1-3-4-1 Production d'acides organiques

Les acides organiques sont issus du métabolisme des hydrates de carbones, leur pouvoir antimicrobien est associé à l'abaissement du pH et à la pénétration de la forme indissociée de l'acide dans le cytoplasme de la cellule. Généralement, l'acide lactique et les autres acides organiques faibles produit par les souches de *Lactococcus* ne réduisent pas le nombre de microorganismes mais retardent leur croissance, mais il arrive dans certains cas où ces derniers tuent la cellule cible (JUILLARD *et al.*, 1987).

L'effet du pH est renforcé par la forme sous laquelle se trouve l'acide lactique, en effet, la forme non dissociée de l'acide qui est prédominante à pH acide est plus toxique pour les cellules (PILET *et al.*, 1998). Le premier cas d'inhibition des *Lactococcus* par l'acidité a été observé par DALY *et al* (1972) sur une souche de *Staphylococcus aureus* par une souche de *Streptococcus diacetylactis*.

Par la suite, d'autres cas d'inhibition par l'acide lactique produit par des espèces de *Lactococcus* (*Lactococcus lactis ssp lactis biovar diacetylactis* C1 et *Lactococcus lactis ssp lactis* 261 sur *Escherichia coli* et *Salmonella Enteritidis* ; *Lactococcus lactis ssp lactis* et *Lactococcus lactis ssp cremoris* sur certaines espèces de *Clostridium*, *Staphylococcus* et *Enterobactéries* ; *Lactococcus lactis* CBT-P7 sur *Salmonella enteritidis*) ont été également observés (TEUBER et GEIS., 2006 ; MUFANDAEDZA *et al.*, 2006).

1-3-4-2 Peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène produit par les *Lactococcus* peut exercer un effet antimicrobien sur certaines bactéries pathogènes et d'altération. Les principaux mécanismes pouvant générer le peroxyde d'hydrogène sont représentés dans la figure 6 (DACOSTA, 2000).

Les espèces du genre *Lactococcus* peuvent générer du peroxyde d'hydrogène en présence d'oxygène et d'enzymes telle que la NAD oxydase, la L-lactate oxydase et la pyruvate oxydase. La concentration maximale du peroxyde d'hydrogène que les *Lactococcus* peuvent produire est de 1,04mM/l. La nature des hydrates de carbones présents dans le milieu influence fortement cette concentration. En effet, elle a tendance à augmenter sur lactose que sur glucose (PIARD et DESMAZEAUD, 1991 ; DACOSTA, 2000).

L'effet antimicrobien du peroxyde d'hydrogène résulterait de l'oxydation des groupements sulfhydriques des enzymes provoquant ainsi leur dénaturation. Le peroxyde d'hydrogène peut altérer les lipides membranaires (oxydation) perturbant ainsi la perméabilité de la membrane cytoplasmique. L'effet inhibiteur peut résulter aussi de la production de radicaux libres pouvant endommager l'ADN (AMMOR, 2004).

Le peroxyde d'hydrogène produit par les espèces de *Lactococcus* peut exercer un effet inhibiteur sur les souches de *Lactococcus* elles-mêmes ou sur des souches pathogènes comme *Staphylococcus aureus* et les bactéries psychrotropes contaminants le lait cru (DACOSTA, 2000). DELBES-PAUS *et al* (2010) ont rapporté l'inhibition de *Staphylococcus aureus* SA15 par le peroxyde d'hydrogène produit par *Lactococcus garvieae* N2010.

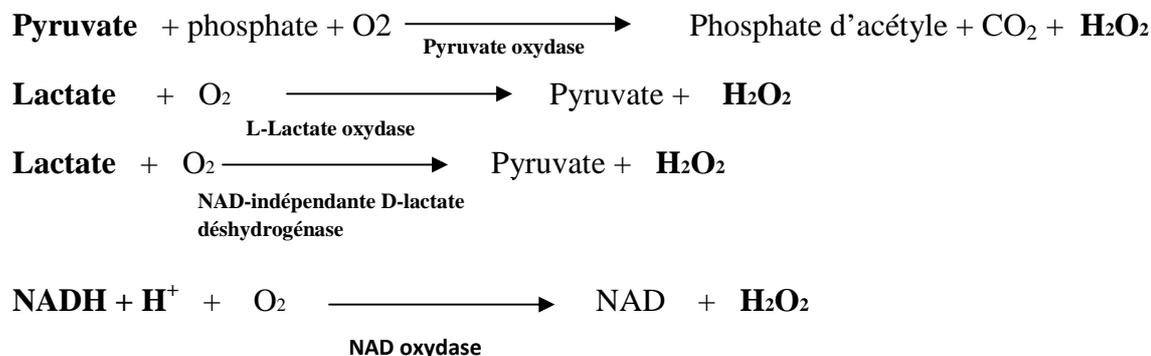


Figure 6 : Principales voies de formation du peroxyde d'hydrogène (DACOSTA, 2000)

1-3-4-3 Les bactériocines

Les bactériocines sont des peptides ou protéines à activité antimicrobienne, elles sont produites par un grand nombre de bactéries lactiques. Chez les Lactocoques, c'est la nisine qui est la mieux décrite, elle exerce un effet inhibiteur sur un très grand nombre de bactéries Gram+ comme *Listeria monocytogenes* et *Listeria innocua* (DIOP *et al.*, 2007).

MITRA *et al* (2010) ont isolé à partir du lait fermenté traditionnel de l'inde «Dahi» une souche de *Lactococcus*, *Lactococcus lactis* W8 produisant la nisine à très large spectre d'inhibition. En effet, la nisine de cette souche inhibe *B. cereus*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *C. perfringens* et d'autres Gram- comme *S. typhimurium*, *V. cholerae* et *P. putida*.

1-3-4-4 Autres substances et modes d'inhibition

Le diacétyle et le CO₂ qui sont issus du métabolisme du citrate ou du pyruvate par *Lactococcus lactis ssp lactis biovar diacetylactis*, possèdent une activité inhibitrice surtout sur les bactéries Gram -, les levures et les moisissures (DACOSTA, 2000).

Les *Lactococcus* peuvent manifester un pouvoir inhibiteur sur d'autres espèces microbiennes en inhibant leur croissance par un phénomène de compétition soit pour les nutriments soit pour les sites d'adhésion. Ainsi CHARLIER *et al* (2008) ont rapporté que des souches de *Lactococcus lactis ssp lactis*, *Lactococcus lactis ssp lactis biovar diacetylactis* et *Lactococcus lactis ssp cremoris* exercent un effet inhibiteur sur la croissance par compétition nutritionnelle sur deux souches de *Staphylococcus aureus* (LM 48 et RN4220).

BALCÁZA *et al* (2007) ont également observé au cours d'études *in-vitro*, l'exclusion compétitive exercée pour les sites d'adhésion par *Lactococcus lactis ssp cremoris* CFLP102 et *Lactococcus lactis ssp lactis* CFLP 100 sur *Aeromonas salmonicida ssp salmonicida* CFLP 501 et *Carnobacterium piscicola* CFLP 601, toutes deux agents pathogènes chez le poisson.

2 - LES BACTERIOCINES

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont des peptides antimicrobiens de faible poids moléculaire. Elles ont une activité inhibitrice dirigée contre les bactéries phylogénétiquement proches de la souche productrice. Leur spectre est généralement étroit (DEEGAN *et al.*, 2006 ; DORTU et THONART, 2009). Elles sont intensivement étudiées durant ces dernières années et sont actuellement considérées comme le meilleur moyen de bio-préservation des aliments (TAMIME *et al.*, 2006).

2-1 Définition

Les bactériocines sont des protéines ou des complexes de protéines, avec une activité bactéricide dirigée contre des espèces proches de la souche productrice. Elles sont caractérisées par des propriétés biochimiques, mode et spectre d'action différents (KLAENHAMMER, 1988).

Ce sont des molécules qui sont synthétisées par voie ribosomale et sont considérées comme des métabolites primaires. Les gènes responsables de leur synthèse sont organisés en opéron (HUST, 1981 ; JACK *et al.*, 1995).

2-2- Classification

La première classification des bactériocines revient à KLAENHAMMER (1993), cet auteur a proposé de classer ces bactériocines en quatre classes : classe I (peptides modifiés) classe II peptides non modifié classe à deux peptides, classe III (protéines thermolabiles) et classe IV (protéines complexes nécessitant une partie glucidique ou lipidique pour leur activité).

Avec la découverte de nouvelles bactériocines ayant une structure cyclique, une nouvelle classification est proposée par COTTER *et al* (2005). En effet, ces auteurs ont sauvé la classe I mais a supprimé la classe IV et a renommé la sous classe IIc (initialement cette classe était caractérisée par l'activation des bactériocines par la présence de groupement thiols). COTTER *et al* (2005) ont proposé ensuite la classification suivante : classe I : lantibiotiques , classe II : IIa pediocine-like, IIb bactériocine à deux ou plusieurs peptides, IIc peptide cycliques, IId autres peptides n'appartenant ni à IIa ni à IIb et enfin la classe III protéines.

Cependant, cette classification est légèrement remise en cause par HENG *et al* (2007) surtout pour les sous classe de la classe II. Ils proposent alors une autre classification qui est la suivante :

- **Classe I** : Lantibiotiques,
- **Classe II** : Bactériocines à deux ou plusieurs peptides
 - o Sous classe IIa : pediocine –like
 - o Sous classe IIb : deux ou plusieurs peptides
 - o Sous classe IIc : autres bactériocines
- **Classe III** : Protéines supérieures à 10 kDa
 - o Sous classe IIIa : Bactériolysines
 - o Sous classe IIIb : Protéines non lytiques
- **Classe V** : Peptides à structure cyclique.

2-2-1 Classe I : les lantibiotiques

Les lantibiotiques sont des peptides d'une taille qui varie de 19 à 38 résidus d'acide aminé. Ils sont caractérisés par la présence dans leur structure primaire d'acides aminés modifiés tels que : la lanthionine (Lan), β -méthyl lanthionine (Met Lan), la dehydroalanine (Dha) et la dehydrobutyrine (Dhb). Ces derniers sont issus de modifications post-traductionnelles. Ils sont stables à la chaleur, hydrophobes et leur masse moléculaire est inférieure à 5 KDa (MORISSET *et al.*, 2005 ; HENG *et al.*, 2007).

Les lantibiotiques du monde bactérien, ont été initialement divisés en deux sous classes en fonction de leur homologie structurale (sous classe A et B), par la suite, des chercheurs ont observés que certaines bactériocines des deux sous classes possédaient les deux mode d'action simultanément (formation de pore et blocage de la synthèse de la paroi) et d'autres étaient formé de deux peptides. Une nouvelle classification de cette classe a été proposée, actuellement cette classe est divisée en 11 sous classes (WEIDEMANN *et al.*, 2001 ; COTTER *et al.*, 2005).

Cependant, les bactéries lactiques et plus particulièrement les *Lactococcus* produisent uniquement des bactériocines de deux sous classes A et B. De plus, les bactériocines des classes I et II sont les mieux étudiées car elles sont les plus abondantes et paraissent se prêter le mieux à des applications dans l'industrie alimentaire (DACOSTA, 2000).

Récemment, une nouvelle classification des lantibiotiques produits par les bactéries lactiques a été proposée par ASADUZZAMAN et SONOMOTO (2009). En effet, ces auteurs classent les lantibiotiques en trois sous classes principales : lantibiotiques type A avec deux sous classes AI (les résidus lanthionine et 3-méthyllanthionine sont formés par deux enzyme : Lan B et Lan C) et AII (les résidus modifiés sont formés par une seule enzyme : Lan M), le type B ou lantibiotique globulaire et le type C qui regroupe les lantibiotiques à plusieurs peptides.

Ces auteurs ont également proposé de classer les lantibiotiques en se basant sur l'homologie des séquences des loci codant pour ces peptides. En effet, ils ont fait ressortir deux classes : classe I caractérisée par la présence d'un motif très conservé à la position -20 et -15 et par la présence d'une proline à la position -2 tandis que la classe II est plutôt caractérisée par la présence de doublet GG et GA au niveau du site de clivage du peptide leader et initialement appelé «motif double glycine». Ils sont également caractérisés par la présence de plusieurs résidus Asp et Glu.

2-2-1-1 Les lantibiotiques de type A

Les lantibiotiques de type A sont des peptides linéaires, cationiques (chargés positivement), leur structure secondaire est en hélice α , amphiphiles et leur masse moléculaire est inférieure à 4 KDa (ARTHUR et SATU, 2004 ; LORRAINE *et al.*, 2008). On distingue deux sous types : AI comme la nisine, peptide linéaire et AII comme la lacticine 481 organisée en queue et en anneau (ASADUZZAMAN et SONOMOTO, 2009).

Le lantibiotique de type A le mieux caractérisé est la nisine synthétisée par *Lactococcus lactis*. Cette dernière existe sous deux formes (nisine A et nisine Z) qui se distinguent seulement par le fait que le résidu occupant la position 27 est de l'histidine pour la nisine A et de l'acide aspartique pour la nisine Z (DACOSTA, 2000 ; CHEIGH et PYUN, 2005).

2-2-1-2 Les lantibiotiques de type B

Cette sous classe comprend des peptides globulaires d'une structure plus compacte, chargés négativement. Ils peuvent contenir jusqu'à 19 résidus d'acides aminés. Leur masse moléculaire se situe entre 1,8 et 2,1 KDa (TWOMEY *et al.*, 2002).

2-2-1-3 Les lantibiotiques type C

Les lantibiotiques de cette sous classe sont constitués de deux ou plusieurs peptides qui sont nécessaire à leur activité. On en trouve aussi dans cette sous classe les lantibiotiques qui possèdent les deux modes de fonction (formation de pore et inhibition de la synthèse de la paroi). La lacticine 3147 A1 et A2 produites toutes les deux par la *Lactococcus lactis* font partie de cette sous classe (DORTU et THONART, 2009).

2-2-2 Classe II : Peptides non modifiés

Ce sont des peptides non modifiés, de masse moléculaire inférieur à 10 KDa, très stables à la chaleur. Leur pHi se situe entre 8 et 10. Cette classe est également divisée en trois sous classes : IIa, IIb et IIc (DIEP et NES, 2002 ; DORTU et THONART, 2009).

2-2-2-1 Sous classe IIa

Les bactériocines de cette sous classe sont composés de 27 à 48 résidus d'acides aminés, elles possèdent une extrémité N-terminale hydrophobe contenant une séquence consensus (YGNGV) très conservée au cours de l'évolution (DRIDER *et al.*, 2006).

Elles sont également caractérisées par l'existence d'un pont disulfure au niveau de leur partie N-terminale et d'une ou de deux hélices α au niveau de leur partie C-terminale (Les bactériocines de cette sous classe possèdent toutes une activité anti-listeria (FIMLAND *et al.*, 2000 ; RICHARD *et al.*, 2006).

La bactériocine représentative de cette sous classe est la pediocin PA-1 produite par *Pediococcus acidilactici*. Il y a aussi la divercin V41 produite par *Carnobacterium divergens* V41, la bavaricin A produite par *Lactobacillus sake* MI401 et la carnobacteriocin B2 produite par *Carnobacterium piscicola* LV17B (FIMLAND *et al.*, 2000 ; RODRIGUEZ *et al.*, 2002).

2-2-2-2 Sous classe IIb

Les bactériocines de cette sous classe nécessitent la présence de deux ou de plusieurs peptides pour accomplir leur fonction. Deux types 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 (EIJSSINK *et al.*, 1998 ; DRIDER *et al.*, 2006 ; DORTU et THONART, 2009).

La lactococcine G produite par *Lactococcus lactis*, la thermophiline 13 produite *Streptococcus thermophilus*, l'enterocine L50 produite par *Enterococcus faecium* et la plantacine C11 produite par *Lactobacillus plantarum* font parties de cette sous classe (NISSEN-MEYER *et al.*, 1992 ; MARCISSET *et al.*, 1997 ; CINTAS *et al.*, 2000 ; DIEP *et al.*, 2003).

2-2-2-3 Sous classe IIc

Dans cette classe on trouve les bactériocines qui ne sont classées ni dans la sous classe IIa ni dans la sous classe IIb. Ces dernières ont été initialement classées par COTTER *et al.* (2005) dans la sous classe IId (HENG *et al.*, 2007).

La sakacin Q produite par *Lactobacillus sakie*, Mutacine IV et V produites par *Streptococcus mutans* ainsi que la sakacine T et X produite également par *Lactobacillus sakie* sont classées dans cette sous classe (QI *et al.*, 2001 ; VAUGHAN *et al.*, 2003 ; MATHIESSEN *et al.*, 2005 ; HALE *et al.*, 2005).

2-2-3 Classe III

Les molécules de cette classe sont des protéines d'une masse moléculaire supérieure à 30 KDa, elles sont thermolabiles et ne possèdent pas d'acides aminés modifiés. Cette classe est divisée en deux sous classes.

2-2-3-1 Sous classe IIIa : bacteriolysines

La zoocine A produite par *Streptococcus equi ssp zooepidermicus*, la stellalysin produite par *Streptococcus constellatus sp contellatus*, la millericine B produite par *Streptococcus milleri* et l'enterolyline A produite par *Enterococcus faecalis* font partie de cette sous classe (HENG *et al.*, 2007).

Ces protéines à activité antimicrobienne sont des enzymes lytiques qui neutralisent la cellule cible par une lyse complète de la cellule bactérienne.

2-2-3-1 Sous classe IIIb : bactériocines non lytiques

Les bactériocines de cette sous classe agissent à l'opposé de la sous classe IIIa par dissipation de la force proton motrice et elles ne manifestent aucun pouvoir lytique vis-à-vis de la cellule cible. L'helveticine J produite par *Lactobacillus helveticus* et la *Streptococcine A-M57* produite par *Streptococcus pyogenes* font partie de cette sous classe (HENG *et al.*, 2007).

2-2-4 Classe IV

Les bactériocines de cette classe sont caractérisées par une structure cyclique, elles sont synthétisées par voie ribosomales et subissent des modifications post-traductionnelle comme la création d'une liaison entre le premier et le dernier acide aminé. La bactériocine type de cette classe est l'enterocine AS-48 produite par *Enterococcus faecalis ssp liquefaciens* S 48. D'autres bactériocines à structure cyclique font également partie de cette classe comme la reuterine 6 produite par *Lactobacillus reuteri* (GALVEZ *et al.*, 1985 ; HENG *et al.*, 2007).

2-3 Les bactériocines des *Lactococcus* :

Les bactériocines produites par les espèces du genre *Lactococcus* sont toutes de classe I et II, les autres bactériocines ne sont pas classées vu le manque de caractérisation. Aucune bactériocine de classe III ou IV n'a été décrite. La mieux étudiée et caractérisée est la nisine qui est une bactériocine de la classe I (lantibiotique).

2-3-1 Bactériocines de classe I

2-3-1-1 Nisine

La nisine est un lantibiotique produit par les souches de *Lactococcus lactis ssp lactis* et qui est classée dans le type AI. Il existe cinq variantes de la nisine : nisine A, nisine Z et nisine Q produites par *Lactococcus lactis* et nisine U et U2 produites par *Streptococcus uberis* (LUBELSKI *et al.*, 2008). La nisine A est composée de 34 résidus d'acides aminés, sa masse moléculaire est 3353 Da tandis que la nisine Z est composée de 34 résidus d'acide aminés

également mais sa masse moléculaire est de 3330 Da. La nisine présente une excellente stabilité et thermo résistance aux pH acides.

A pH 2, elle résiste pendant 20 minutes à 121°C. Elle n'est pas active à pH physiologique, à ce pH elle est inactivée irréversiblement. Sa structure est représentée dans la figure 7 (HURST, 1981 ; KLAENHAMMER, 1993).

La nisine est sensible à l' α -chymotrypsine, pancréatine, pronase E et à la nisinase. Elle est par contre résistante à la trypsine, pepsine et à l'élastase. Son spectre d'action est très large, elle inhibe les Actinomycète, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Clostridium*, *Leuconostoc*, *Pneumococcus*, *Corynebacterium*, *Listeria* et *Staphylococcus* (SAHL et BIERBAUM, 1998 ; DACOSTA, 2000).

2-3-1-2 La lacticine 3147

C'est une bactériocine hétérodimérique, lantibiotique à deux peptides (lantibiotique type C) composée de deux peptides A1 et A2. La masse moléculaire du peptide A1 est de 3322 Da tandis que celle du peptide A2 est de 2847 Da. Elle est produite par *Lactococcus lactis ssp lactis* DPC 3147. La lacticine 3147 résiste uniquement 5 min à 100°C mais présente une très bonne stabilité aux pH acides. Sa structure est représentée dans la figure 8 (RYAN *et al.*, 1996).

La lacticine 3147 est inactivée par l' α -chymotrypsine, la protéinase K, trypsine et la pronase E. Son spectre d'action est très étendu, elle inhibe les *Lactococcus*, les *Lactobacillus*, les *Enterococcus*, les *Leuconostoc*, les *Pediococcus*, les *Streptococcus thermophilus* et à un degré moindre les *Staphylococcus* et les *Bacillus* (GALVIN *et al.*, 1999 ; DACOSTA, 2000).

2-3-1-3 La lacticine 481

Classée dans le type AII des lantibiotiques, la lacticine 481 est une bactériocine produite par *Lactococcus lactis ssp lactis* CNRZ 481. Elle est composée de 27 résidus d'acides aminés. Sa masse moléculaire est de 2901 Da. La lacticine 481 est stable aux pH physiologiques et basiques. Elle résiste 1h à 100°C et à pH 4 (PIARD *et al.*, 1990). Elle est inactivée par la protéinase K, l' α -chymotrypsine, la pronase et la présure. Son spectre d'action est moins large que celui de la nisine, elle inhibe la plupart des *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus thermophilus*, *Staphylococcus carnosus* et *Clostridium tyrobutyricum*. Sa structure est représentée dans la figure 9 (PIARD *et al.*, 1992 ; DACOSTA, 2000).

2-3-2 Bactériocines de classe II

2-3-2-1 La lactococcine A

La lactococcine A est produite par *Lactococcus lactis ssp cremoris* LMG 2130, elle est composée de 54 résidus d'acides aminés et sa masse moléculaire est 5778 Da. Elle est classée dans la sous classe IIc, son spectre d'action est limité aux lactocoques et les enzymes qui l'inactivent sont la trypsine, la pronase et l'endoprotéase (HOLO *et al.*, 1991).

2-3-2-2 La lactococcine B

Cette bactériocine est composée de 47 résidus d'acides aminés et sa masse moléculaire est de 5300Da. La lactococcine B est produite par *Lactococcus lactis ssp cremoris* LMG 2130 et est classée dans la sous classe IIc (VENEMA *et al.*, 1995).

2-3-2-3 La lactococcine M

Cette bactériocine est classée dans la sous classe IIb car elle nécessite la présence de deux peptides pour accomplir son activité. En effet, cette dernière est composée de deux sous unités α et β . Sa masse moléculaire est 4300 Da, la sous unité α est composée de 69 résidus d'acides aminés tandis que la sous unité β est composée de 77 résidus d'acides aminés (VAN BELKUM *et al.*, 1991 ; VENEMA *et al.*, 1995).

2-3-2-4 La lactococcine G

La lactococcine G est produite par *Lactococcus lactis* LMG 2081, son effet repose sur l'intervention complémentaire de deux peptides (α et β) qui créent des pores dans la paroi des cellules cibles ; le peptide α contient 39 résidus d'acides aminés et a une masse moléculaire de 4,3 kDa, contre 4,1 kDa et 34 résidus d'acides aminés pour le peptide β (NISSEN-MEYER *et al.*, 1992). La bactériocine est active à pH 5 ou plus tandis qu'à pH inférieur à 5, son activité est presque nulle. Elle est classée dans la sous classe IIb (HAUGE *et al.*, 1998).

2-3-2-5 La lactococcine 972

Cette bactériocine est un homodimère, elle est composée de 66 résidus d'acides aminés et la masse moléculaire de ses sous unités est de 15k Da. Elle est produite par *Lactococcus lactis* ssp *lactis* IPLA 972 et classée dans la sous classe IIc. La lactococcine 972 présente une meilleure activité qui est observée dans un intervalle de pH compris entre 4 et 9. Elle n'est pas thermorésistante (elle résiste uniquement 15 min à 55°C). Elle est digérée uniquement par la pronase E, elle résiste à la protéinase K, l' α -chymotrypsine, trypsine et l' α amylase (MARTINEZ *et al.*, 1995 ; MARTINEZ *et al.*, 1996 ; MARTINEZ *et al.*, 1999).

2-3-2-6 La bactériocine J 46

Composée de 27 résidus d'acides aminés, elle a une masse moléculaire est de 2986 Da, produite par *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* J46 isolée à partir du lait fermenté. Elle est classée dans la sous classe IIa. Cette bactériocine est digérée par la pronase E, la trypsine et l' α -chymotrypsine. Son activité est maximale entre pH 3 et 9 et résiste à 100°C pendant 1 heure à pH 4.5-6.5 (HUOT *et al.*, 1996).

2-3-3 Bactériocines non classées produites par *Lactococcus*

Certaines bactériocines qui sont synthétisées par les lactocoques sont en attente de caractérisation fine et de classification, c'est le cas de la dricine, la bactériocine S50, la bactéricine WM4, la lactococcine R, la lacticine RM, la lactocine G13, la lacticine BH-5, la lactococcine 140 et la bactéricine H-559 (DACOSTA, 2000).

D'autres bactériocines synthétisées par *Lactococcus* ont été également décrites comme la lactococcine MN produite par *Lactococcus lactis* 9B4 isolée par l'équipe de Van Belkum en 1991, cette bactériocine est classée dans la sous classe IIb, la lactococcine MMFII produite par *Lactococcus lactis* MMFII isolée par FERCHICHI *et al* (2001), la lactococcine Q produite par *Lactococcus lactis* QU4 isolée par ZENDO *et al* (2006) et la lactocycline Q, bactériocine cyclique produite par *Lactococcus* sp QU12 et isolée par SAWA *et al* (2009).

2-3-2 Mécanisme de production et de régulation

Différentes protéines sont impliquées dans les processus de biosynthèse et de régulation des bactériocines. Ces dernières sont produites sous forme d'un pré-peptide non biologiquement actif et qui vont subir plusieurs modifications post-traductionnelles pour aboutir aux peptides actifs. La régulation de la production de la bactériocine se fait selon un mécanisme permettant l'expression d'un certain nombre de gènes en fonction de la densité cellulaire dans le milieu : c'est le mécanisme *Quorum Sensing* (DORTU et THONART, 2009).

2-3-2-1 Bactériocine de classe I

La nisine est synthétisée par *Lactococcus lactis*, c'est le lantibiotique le mieux caractérisé et son mécanisme de biosynthèse et de régulation sont très bien élucidés.

Les gènes responsables des processus de biosynthèse, de maturation, de transport, d'immunité et ceux de la régulation sont portés par un opéron situé sur le transposon du sucrose (RA *et al.*, 1996). Ces gènes sont en nombre de onze : *nis A/Z* code pour la biosynthèse de la pré-nisine qui est composée de 57 résidus d'acides aminés (34 résidus pour la nisine active et 23 résidus pour le peptide leader) ; *nis B* et *C* codent pour deux enzymes qui vont accomplir les modifications post-traductionnelles, l'enzyme B est une deshydratase et l'enzyme C une cyclase ; *nis T* code pour le transporteur ABC ; *nis P* code pour une protéase subtilisine-like qui a pour fonction l'élimination du peptide leader ; *nis I* code pour une lipoprotéine responsable de l'immunité ; *nis FEG* code pour le système de transport ABC responsable également de l'immunité ; *nis R* code pour la synthèse du régulateur de réponse et *nis K* qui code pour une histidine kinase. Les gènes *nis A/Z*, *nis B*, *nis T*, *nis C*, *nis I*, *nis P*, *nis F*, *nis E* et *nis G* sont inductible tandis que les gènes *nis R* et *nis K* sont constitutifs. (CHEIGH et PYUN, 2005).

La première étape de la biosynthèse de la nisine est la synthèse du pré-peptide (pré-nisine) par le gène *nis A/Z*, ce dernier est composé d'un peptide leader de 23 résidus d'acides aminés et de la nisine active (34 résidus d'acides aminés). Ensuite, cette pré-nisine va subir différentes modifications post-traductionnelles à savoir la deshydratation de la sérine et de la thréonine par une deshydratase pour former la dehydroalanine et la dehydrobutyrine. Les différentes modifications sont représentées dans les figures 10 et 11 (NAGAO *et al.*, 2006 ; DORTU et THONART, 2009).

La deuxième modification post-traductionnelle est la formation de ponts thioethers entre les résidus déshydratés et les cystéines de la nisine par une cyclase et une deshydratase. Cette modification est accomplie par deux enzymes Lan B et Lan C pour les lantibiotiques de type AI et uniquement par un seul enzyme, la Lan M, pour les lantibiotiques du type AII et C (DIEP et NES, 2002 ; ASADUZZAMAN et SONOMOTO, 2009).

Une fois que cet ensemble de modifications sont effectuées, le pré-peptide va être exporté vers le milieu extracellulaire. Le peptide leader va être clivé par le domaine protéasique du transporteur ABC (Lan T) ou par une protéase (protéase like-subtilisine Lan P) (PATTON *et al.*, 2005 ; LORRAINE *et al.*, 2008). L'excrétion du peptide se fait par l'intermédiaire du transporteur ABC (Lan T), qui est constitué par deux domaines, l'un a pour fonction la reconnaissance du pré-peptide et l'autre l'hydrolyse de l'ATP pour fournir l'énergie nécessaire à la translocation. (HIGGINS, 1992).

Pour les lantibiotiques du type AI, le peptide leader est clivé par Lan P avant ou après l'excrétion tandis que pour les lantibiotiques type AII, le peptide est clivé au moment même de sa sécrétion ou de son transport (MEYER *et al.*, 1995).

La production des antibiotiques est sous le control d'un système ou d'un mécanisme de régulation à deux composants basé sur le *Quorum Sensing*. Une histidine kinase réagira à un stimulus extérieur et s'autophosphoryle et induira à son tour la phosphorylation du régulateur de réponse. Ce dernier va permettre l'activation des gènes inductibles de l'opéron (DORTU et THONART, 2009).

Le stimulus extérieur est la bactériocine elle-même qui se présente à très faible concentration au début de la croissance bactérienne, une fois que sa concentration dépasse un certain seuil, elle stimule l'histidine kinase qui à son tour va provoquer la phosphorylation du régulateur de réponse. Les étapes de biosynthèse et de régulation sont représentées dans la figure 12 (PATTON *et al.*, 2005).

2-3-2-1 Bactériocine de classe II

Les bactériocines de classe II sont des peptides qui sont synthétisés presque sans modification post-traductionnelle des résidus d'acides aminés, la seule modification post-traductionnelle est la formation de deux ponts disulfures nécessaires à leur activité (DRIDER *et al.*, 2006). Les gènes codant pour la biosynthèse des bactériocines sont généralement organisés en trois opérons, le premier comporte les gènes de structure et d'immunité, le second contient les gènes codant pour l'exportation de la bactériocine (transporteur ABC ou système *sec-dependant*), le troisième codant pour le système de régulation à trois composants (DIEP et NES, 2002 ; DRIDER *et al.*, 2006).

Cinq gènes organisés en opérons sont responsables de la biosynthèse de la lactococcine G. Les gènes **Lag A** et **Lag B** codent pour les peptides A et B (ou α ou β), le gène **Lag C** code pour la protéine d'immunité et les gènes **Lag D** et **Lag E** codent pour le système de transport de la bactériocine (MOLL *et al.*, 1998).

Les bactériocines de classe II sont caractérisées au moment de leur biosynthèse par la présence d'une séquence leader (signale) d'une vingtaine d'acides aminés du coté N-terminal et qui est très conservée au cours de l'évolution. Cette séquence va être clivée au niveau de son extrémité Ct (motif double glycine) par le domaine protéasique du transporteur ABC au moment de l'excrétion vers le milieu extracellulaire (GARNEAU *et al.*, 2002 ; DRIDER *et al.*, 2006).

D'autres bactériocines de classe II, mais très peu, sont secrétées par un autre système, le système *sec-dependant*. Dans ce système, les pré-bactériocines sont secrétées par un pore aqueux composé de plusieurs protéines. Les peptides signaux de ces bactériocines ne contiennent pas de motif «double glycine» mais une séquence signale typique des protéines secrétées par ce système qui sera clivée par une peptidase durant le processus de translocation (EIJNSINK *et al.*, 2002 ; DRIDER *et al.*, 2006 ; OPPEGARD *et al.*, 2007).

La régulation de la biosynthèse des bactériocines de classe II est sous le contrôle d'un système *Quorum Sensing* basé sur trois composants, le premier est le peptide d'induction qui est identique à la bactériocine mais avec une très faible activité, le deuxième est l'histidine kinase et le troisième et le régulateur de réponse (EIJNSINK *et al.*, 2002).

A une certaine concentration du peptide d'induction, l'histidine kinase s'autophosphoryle et induit à son tour la phosphorylation du régulateur de réponse. Ce dernier va ensuite activer l'expression des gènes inductibles de l'opéron. Les principales étapes de biosynthèse et de régulation des bactériocines de classe II sont représentées dans la figure 13 (DRIDER *et al.*, 2006).

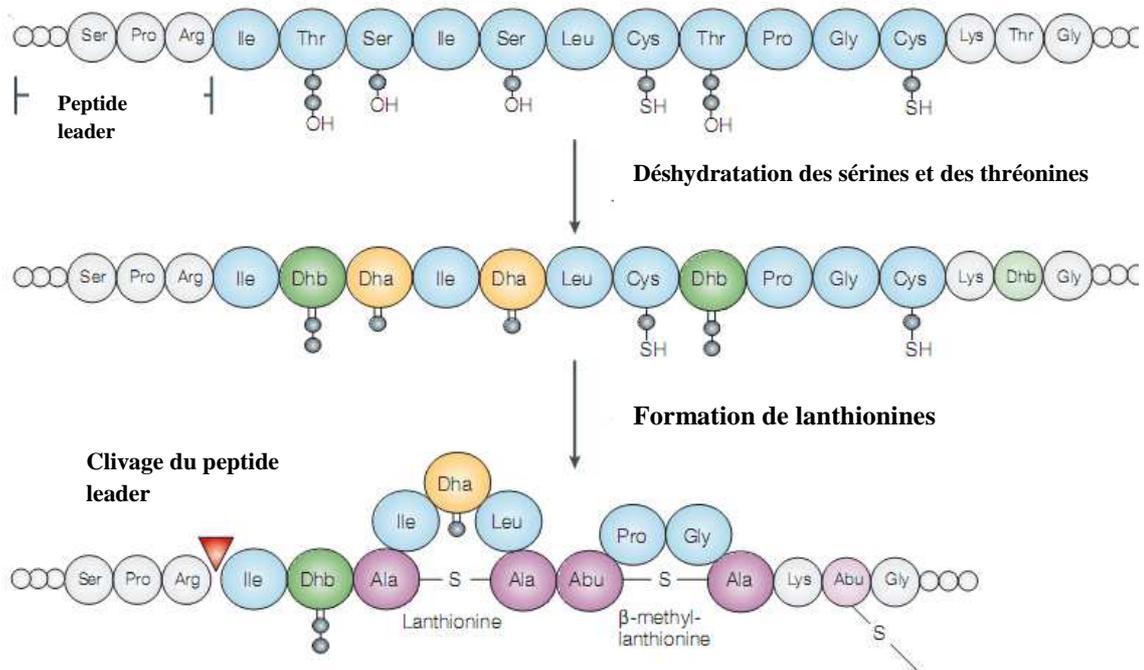


Figure 10 : Modification post-traductionnelles de la pré-nisine (COOTER *et al.*, 2005).

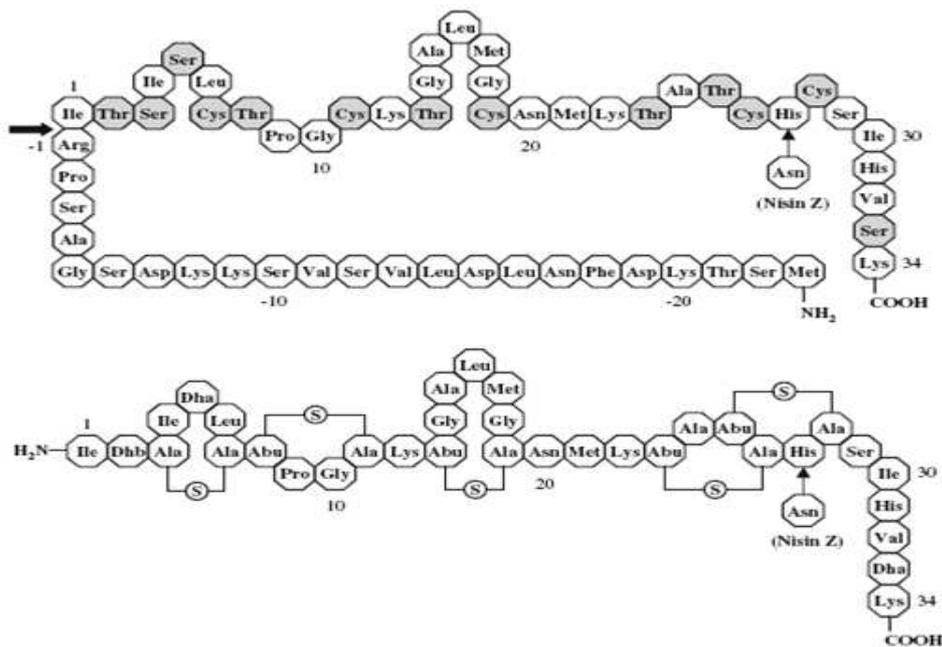


Figure 11 : Structure de la pré-nisine et de la nisine (CHEIGH et PYUN, 2005).

Les résidus d'acides aminés modifiés sont en gras, la flèche en gras indique le site de clivage du peptide leader ;
Dha : dehydroalanine ; **Dhb** : dehydrobutyrine ; **Ala-S-Ala** : lanthionine ; **Abu-S-Ala** : β -méthyl-lanthionine

2-3-3 Mode d'action

L'activité antimicrobienne des bactériocines des bactéries lactiques s'exerce essentiellement par deux principaux mécanismes : formation de pores à travers la membrane cytoplasmique et inhibition de la synthèse du peptidoglycane constituant principal de la paroi des bactéries Gram positif (ABEE, 1995 ; CHEN et HOOVER, 2003).

Le mode d'action des bactériocines est caractérisé par deux étapes fondamentales : adsorption de la bactériocine sur des récepteurs spécifiques au niveau de la paroi et formation de pores au niveau de la membrane plasmique qui vont aboutir à une perturbation profonde de sa perméabilité par dissipation d'une ou des deux composantes de la force proton motrice ($\Delta\psi$ et ΔpH), cette phase est complètement irréversible (DRIDER *et al.*, 2006 ; HENG, 2007).

2-3-3-1 Bactériocines de classe I

Les lantibiotiques interagissent avec la membrane de la cellule cible par des interactions électrostatiques ou par des liaisons spécifiques à des récepteurs de la paroi comme le lipide II (undecaprenyl-pyrophosphoryl-MurNac-pentapeptides-GluNAc) qui est un précurseur du peptidoglycane (TOWMEY *et al.*, 2002).

Des études récentes par résonance magnétique nucléaire (RMN) ont montré que la nisine interagit avec le groupement pyrophosphate du lipide II par ses deux anneaux A et B. Ces interactions sont de nature faible, ce sont des liaisons hydrogène (HSU *et al.*, 2004), alors que les anneaux C et D de la nisine sont impliqués dans la formation des pores au niveau de la membrane plasmique (DIEP et NES, 2002).

Les lantibiotiques du type A agissent par dissipation des deux composantes de la force proton motrice en créant des pores au niveau de la membrane plasmique. Ils peuvent également agir par l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane. La nisine possède ces deux modes d'action (BROTZ *et al.*, 1998 ; BREUKINK *et al.*, 2003). D'autres études montrées aussi un autre mode d'action de la nisine, il s'agit de l'inhibition du septum de division au cours de la division cellulaire. Les figures 14, 15 et 16 montrent le mode d'action de la nisine et les perturbations provoquées au cours de la formation du septum de division (HYDE *et al.*, 2006).

Les lantibiotiques de type B comme la lacticine 481 agissent par inhibition de la synthèse du peptidoglycane mais peuvent également entraîner la formation de pores à travers la membrane cytoplasmique (PATTON *et al.*, 2005 ; WILLEY et VAN DERDONK, 2007).

Les lantibiotiques à deux peptides comme la lacticine 3147 agissent par formation de pores à travers la membrane plasmique. Cette dernière est fixée aussi sur le lipide II, le peptide AI s'attache au lipide II tandis que le peptide AII est chargé de la reconnaissance du complexe lipide II-peptide AI et de former le pore (WEIDMANN *et al.*, 2006).

2-3-3-1 Bactériocines de classe II

Le mode d'action des bactériocines de classe II est très étudié, il ne diffère pas complètement de celui des bactériocines de classe I. Il existe cependant une différence au niveau de l'arrimage et la fixation de la bactériocine. En effet, les bactériocines de classe II exigent un récepteur très spécifique pour accomplir leur fonction. Leur mode d'action est montré par la figure 14 (DRIDER *et al.*, 2006).

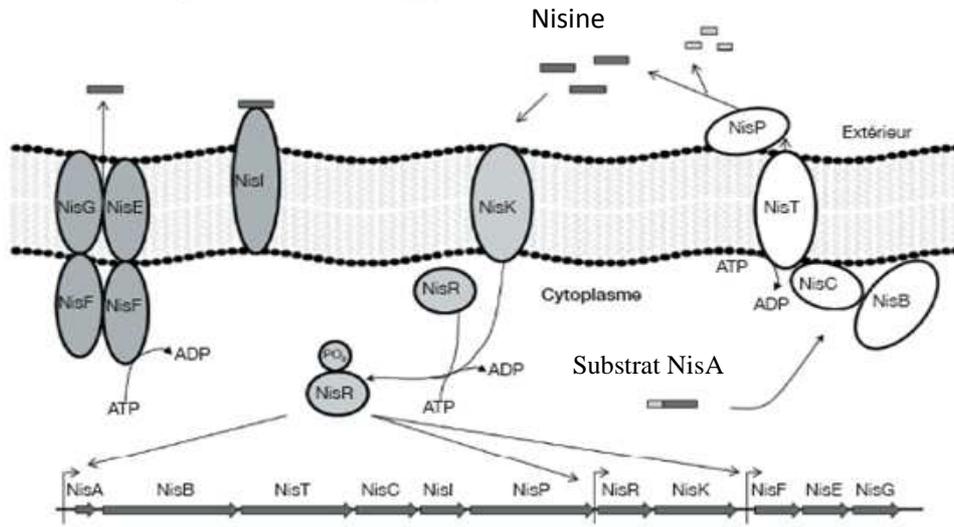


Figure 12: Biosynthèse et régulation de la nisine (PATTON *et al.*, 2005).

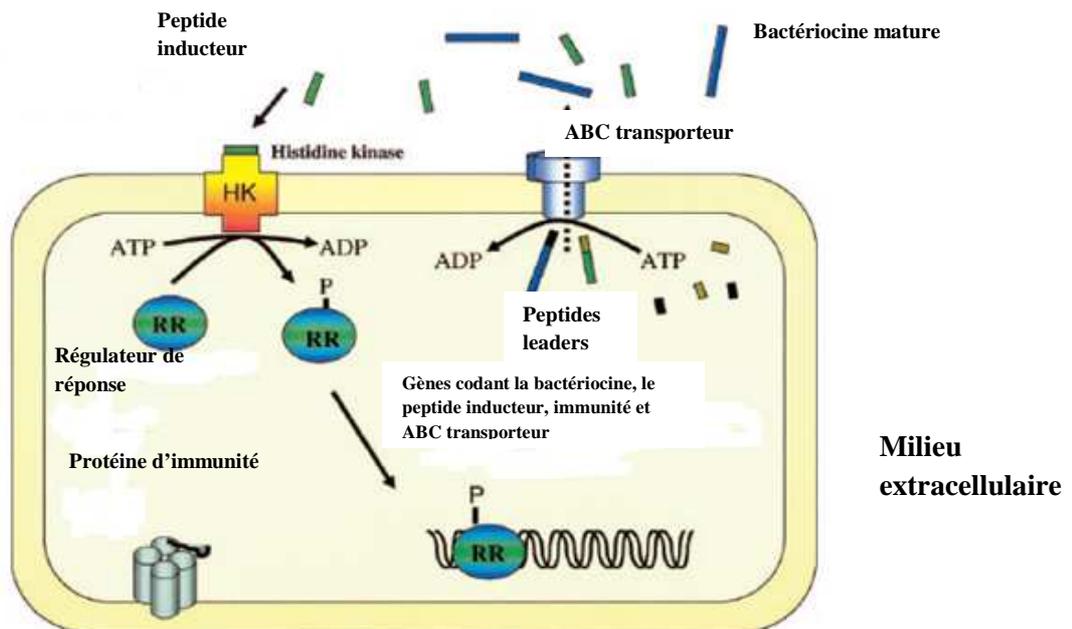


Figure 13 : Biosynthèse et régulation des bactériocines de classe II (DRIDER *et al.*, 2006).

Le récepteur chargé de fixer la bactériocine (classe IIa) est la composante EII_t mannose du système PTS mannose chargé du transport du mannose du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire de la cellule bactérienne (DRIDER *et al.*, 2006 ; DEEGAN *et al.*, 2006).

D'autres études ont montré également l'implication du facteur de transcription σ^{54} . Il est considéré par beaucoup de chercheurs comme une cible moléculaire des bactériocines de classe IIa. Le facteur σ^{54} est un activateur de transcription qui s'attache à l'ARN polymérase et active la transcription. Ce facteur est codé par le gène *rpoN*. La sensibilité de *Listéria monocytogenes* aux bactériocines de classe IIa notamment à la pediocine PA-1 est due en partie à l'inhibition du facteur σ^{54} (DRIDER *et al.*, 2006).

Les bactériocines de classe IIb agissent par perforation de la membrane cytoplasmique par formation de pores et dissipation des deux composantes de la force proton motrice $\Delta\psi$ et ΔpH . Les ions transportés de part et d'autre de la membrane plasmique sont très spécifiques de la bactériocine. la lactococcine G entraîne la fuite des ions Na⁺ et K⁺ mais pas des H⁺ ou des Mg²⁺ (MOLL *et al.*, 1998).

La lactococcine 972 (bactériocine classe IIc) agit par inhibition de la formation du septum tandis que la lactococcine A agit par formation de pores et dissipation d'un seul composant de la force proton motrice $\Delta\psi$ (VAN BELKUM *et al.*, 1991 ; MARTINEZ *et al.*, 1996).

2-3-3 Application des bactériocines des *Lactococcus*

Les lactococcus produisent beaucoup de bactériocines qui appartiennent à la classe I et II. Cependant toutes ces dernières ne trouvent pas une application industrielle en particulier dans le domaine agroalimentaire. Deux bactériocines produites par les espèces de *Lactococcus* sont utilisées actuellement pour la bio-préservation. La nisine est utilisée dans 48 pays du monde. Le tableau IV donne quelques applications de la nisine et de la lacticine 3147.

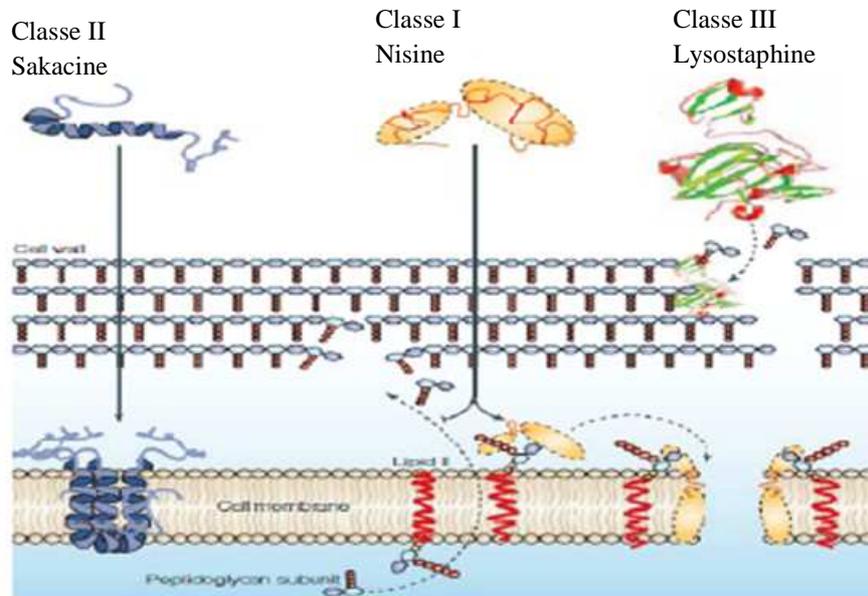


Figure 14 : Mode d'action des bactériocines de classe I , II et III (COTTER *et al.*,2005).

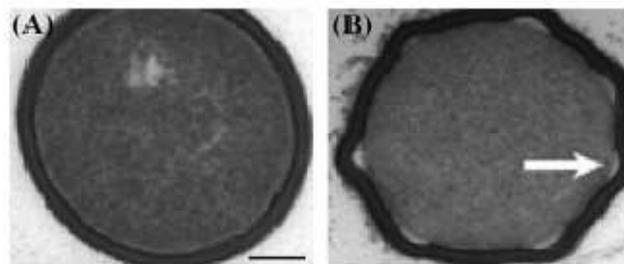


Figure 15 : Observation au microscope électronique à transmission de cellules de *Bacillus subtilis* traitées (B) ou non à la nisine (A) (Echelle : 100nm) (HYDE *et al.*, 2006).

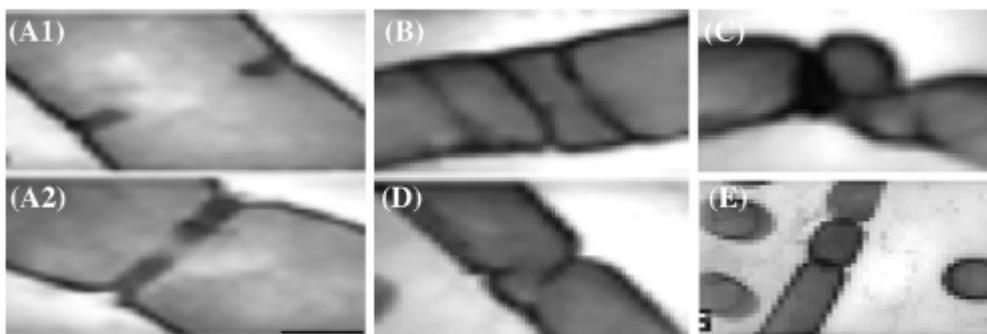


Figure 16 : Observation au microscope électronique à transmission de l'action de la nisine sur la formation du septum de division chez *Bacillus subtilis*. A1 et A2 : septum normaux ; B, C, D et E : aberration de la formation du septum (Echelle 200nm) (HYDE *et al.*, 2006).

Tableau IV : Quelques applications des bactériocines des *Lactococcus*.

Bactériocines	Procédés d'application	Aliment, microorganismes inhibés et autres applications	Auteurs
Nisine	- Nisine (400 à 800UI/ml) + 2% NaCl	Viande hachée du buffle. <i>Listeria monocytogenes</i> .	PAWAR <i>et al</i> (2000)
	- Nisine (1000 à 10000 UI/ml) + 100% CO2 ou 80% CO2 + 20% d'air.	Fillet du porc cuisiné. <i>Listeria monocytogenes</i> et <i>Pseudomonas fragi</i> .	FANG et LIN (1994).
	- Nisine + EDTA	Viande de bœuf. <i>Listeria monocytogenes</i> et <i>E.coli</i> O157 :H7	ZHANG et MUSTAPHA (1999).
	- Nisine produite <i>in-situ</i> par <i>Lactococcus lactis</i> W8.	Lait fermenté traditionnel de l'inde « Dahi ». <i>L.monocytogenes</i>	MITRA <i>et al</i> (2010).
	- Nisine produite <i>in-situ</i> par <i>Lactococcus lactis ss lactis</i> M.	Merguez. <i>Listeria monocytogenes</i>	BENKERROUM <i>et al</i> (2003).
	- Nisine encapsulée dans des vésicules de 140nm.	Lait cru. <i>Listeria monocytogenes</i> .	da SILVA MALHEIROS <i>et al</i> (2010).
	- Nisine à raison de 6,25µg/g.	Pomme de terre. <i>Bacillus</i> et <i>Clostridium sporogenes</i> .	THOMAS <i>et al</i> (2002).
	- Nisine incorporée dans un film de polyéthylène et de nitrocellulose.	Fromage. <i>Penicilium expansum</i> , <i>Fusarium culmorum</i> et <i>Listeria ivanovii</i> .	HANUŠOVÁ <i>et al</i> (2010).
	- Nisine incorporée dans un film de caséinate de sodium.	Fromage. <i>Listeria monocytogenes</i>	LAN <i>et al</i> (2010).
	- Nisin +EDTA incorporée dans un emballage bioactif.	Viande. <i>Brochoatrix thermosphacta</i> .	ERCOLINI <i>et al</i> (2010).
Lacticine 3147	- Lacticine 3147 sous forme lyophilisée.	Laits d'enfants, yaourt et fromage blanc. <i>Listeria monocytogenes</i> et <i>Staphylococcus aureus</i> .	MORGAN <i>et al</i> (2000).
	- Lacticine 3147 sous forme lyophilisée.	Fromage : stimulation de la maturation par lyse des cellules cibles et libération d'enzymes protéolytiques.	MARTINEZ-CUSTA <i>et al</i> (2003).

ETUDE
EXPERIMENTALE

1- MATERIELS ET METHODES

Notre étude est réalisée au niveau du laboratoire de Biochimie Analytique et Biotéchnologies (LABAB), Université MOULOUD MAMMARI, Tizi-ouzou. Une partie de l'étude est réalisée au niveau du Laboratoire Régional Vétérinaire de Drâa Ben Khedda, Tizi-ouzou.

1-1 Matériels

1-1-1 Matériel biologique : le matériel biologique utilisé est du lait fermenté traditionnel issu de différentes régions de la région de Tizi-Ouzou.

1-1-1-1 Le lait fermenté traditionnel « *Ighi* »

1-1-1-1-1 Préparation du lait fermenté traditionnel

Le lait fermenté traditionnel est préparé selon une méthodologie assez primitive. Le lait utilisé pour l'obtention de ce produit fermenté est le lait de vache, ce dernier est laissé abandonné à lui-même dans un récipient en plastique ou en métal à la température ambiante durant 18 à 24h jusqu'à coagulation.

On précise qu'aucun inoculum de souches lactiques n'est ajouté au lait cru de vache avant la fermentation. Ensuite le coagulum est transféré dans une citrouille pour la procédure du barattage, cette opération s'effectue manuellement et ceci en secouant énergiquement la citrouille avec les deux mains. À la fin du barattage, un certain volume d'eau est ajouté pour permettre le rassemblement des grains de beurre, ce dernier est soigneusement récupéré à la main. A la fin de toutes ces opérations le produit fini est prêt à la consommation.

1-1-1-1-2 Collecte des laits fermentés traditionnels

L'échantillonnage s'est effectué directement au niveau des particuliers ou des sites de production en prélevant une quantité de 200ml dans un flacon de 250 ml stérile. On note que la louche qui sert pour le prélèvement et les conditions environnantes sont stériles (utilisation de bougies).

Une fois que cette opération de prélèvement est achevée, les flacons sont transportés au laboratoire dans une glacière dans les plus brefs délais et ceci afin d'éviter d'éventuelles fluctuations de la microflore des laits fermentés traditionnels.

En totalité, 20 laits fermentés traditionnels ont été collectés et ce durant la période allant de juin 2007 à juin 2009. Ces laits proviennent des régions suivantes : Mekla, Bouzeguene, Ouaguenoune, Boghni, Tizi-ouzou, Tizi Rached, Michelet, Boudjimaï, Tigzirt, Azazga et Makouda.

1-1-1-2 Micro-organismes

La souche utilisée pour le screening de bactéries lactiques productrices de bactériocines est *Listeria innocua* F sensible aux bactériocines, (Ecole Agro-alimentaire, laboratoire de Microbiologie, INITIA), Nantes, FRANCE.

1-1-2 Milieux de culture

1-1-2-1 Milieux pour l'isolement et culture des isolats lactiques

- Gélose M17 additionnée de 0,5% de cycloheximides (Actidione);

- Bouillon et Gélose ELLIKER additionnée de 0,5% de cycloheximides

1-1-2-2 Milieux de culture pour la souche indicatrice

- Gélose nutritive à 1% glucose ;
- Gélose ELLIKER à 0,9%.

1-1-2-3 Milieux pour l'identification

- Bouillon rouge phénol ;
- Bouillon hypérsalé (2,5% , 4% , 6,5%) ;
- Bouillon nitraté ;
- Gélose mannitol mobilité ;
- Gélose semi-solide au lait citraté ;
- Lait de Sherman ;
- Lait tournesolé ;
- Milieu Clark et Lubs ;
- Milieu à la gélatine ;
- Milieu Moller (milieu ADH) ;
- Gélose Chapman

1-1-3 Réactifs et Colorants

- Disque oxydase ;
- Ampoule de sucre à 6%, 10 % et 20 % ;
- Bleu de méthylène ;
- Bleu de tournesol ;
- Eau oxygénée ;
- Ethanol à 90% ;
- Fuscine diluée à 1/10 ;
- HCL à 1N ;
- Huile de vaseline ;
- Lugol ;
- NaOH 1N ;
- Poudre de zinc ;
- Réactifs de Voges-Proskouer VP1 et VP2 ;
- Réactifs nitrates NR1 et NR2 ;
- Rouge de phénol ;
- Violet de gentiane.

1-1-4 Appareillage

- Autoclave (pb-INTERNATIONAL);
- Agitateur magnétique (GERHARDT);
- Bain marie (MAMMERT);
- Bec bensen ;
- Balance de précision (SARTORIUS) ;
- Centrifugeuse (SIGMA);
- Etuves à 30°C et 37°C(MAMMERT) ;
- pH mètre (METROHM);

- Réfrigérateur (ENIEM);
- Loupe binoculaire ;
- Microscope optique (CETI).

1-1-5 Verrerie et autres matériels

- Lames et lamelles ;
- Micropipettes
- Pipette PASTEUR ;
- Cloche de Durham ;
- Tubes à vis stériles ;
- Flacons en verre de 250ml ;
- Anse fil droit et à boucle ;
- Boîtes de Pétri 90mm.

1-2 Méthodes

1-2-1 Mesure du pH

Le pH est des laits fermentés traditionnels est pris avec un pH metre juste après son arrivée au laboratoire.

1-2-2 Numération des différents groupes microbiens

Avant toute numération d'un quelconque groupe microbien, il convient d'effectuer une série de dilutions décimales et ceci à partir de la solution mère. Le diluant utilisé est la tryptone sel. 10 ml de la solution mère sont ajouté et soigneusement mélangé avec 90 ml du diluant, ainsi la dilution 10^{-1} est réalisée et on procède de la même manière jusqu'à l'obtention de la dilution 10^{-9} .

1-2-2-1 Numération de la flore mésophile aérobie totale

On entend par flore mésophile totale, l'ensemble des micro-organismes aérobie et aéro-anaérobie facultatif, se développant sur gélose nutritive non sélective à 30°C pendant 72h d'incubation, temps au bout duquel ces germes apparaissent sur boîte de Pétri sous forme de colonies de taille et de forme différentes

Technique :

- Faire Fondre la gélose PCA à 100°C au bain marie puis la maintenir à 45°C ;
- Préparer une série de 3 boîtes de Pétri en 3 exemplaires ;
- Déposer 1ml de chaque dilution dans les boîtes de Pétri ensuite couler 15ml de la gélose PCA ; 3 séries de dilutions successives sontensemencées.
- Homogénéiser la gélose avec l'inoculum en effectuant des mouvements circulaires et laisser refroidir ;
- Incuber les boîtes retournées à 30°C pendant 72h.

Lecture et numération : Nous comptons les différentes colonies sur les boîtes. On tiendra compte que des boîtes dont le nombre de colonies sont comprises entre 30 et 300. Le résultat trouvé est multiplier par l'inverse de la dilution et exprimé ensuite en nombre d'UFC/ml (GUIRAUD et GALZY, 1980).

1-2-1-2 Numération de la flore lactique

Technique :

- Faire Fondre la gélose M17 et MRS à 100°C au bain marie puis la maintenir à 45°C ;
- Préparer une série de 3 boîtes de Pétri en 3 exemplaires ;
- Déposer 1ml de chaque dilution dans les boîtes de Pétri ensuite couler 15ml de la gélose M17 et MRS ; 3 séries de dilutions successives sont ensemencées.
- Homogénéiser la gélose avec l'inoculum en effectuant des mouvements circulaires et laisser refroidir ;
- Incuber les boîtes retournées à 37°C pendant 72h.

Lecture : Les bactéries lactiques poussent en profondeur en formant de petites colonies blanches et lenticulaires (LEVEAU *et al.*, 1991).

1-2-2-3 Coliformes totaux

Les coliformes appartiennent à la famille des *Entérobacteriaceae*. Ils sont Gram-, oxydase -, aéro-anaérobies facultatifs et incapable de sporuler. Leur présence dans un aliment traduit une contamination fécale et d'en apprécier le degré.

Technique :

- Faire Fondre la gélose désoxycholate à 100°C au bain marie puis la maintenir à 45°C ;
- Préparer une série de 3 boîtes de Pétri en 3 exemplaires ;
- Déposer 1ml de chaque dilution dans les boîtes de Pétri ensuite couler 15ml de la gélose désoxycholate ; 3 séries de dilutions successives sont ensemencées.
- Homogénéiser la gélose avec l'inoculum en effectuant des mouvements circulaires et laisser refroidir ;
- Ajouter une deuxième couche de gélose désoxycholate pour assurer l'anaérobiose
- Incuber les boîtes retournées à 30°C pendant 24h.

Lecture et numération : Compter les colonies rouges en tenant compte des boîtes ayant un nombre de colonies compris entre 30 et 300 (GUIRAUD, 2003).

1-2-2-4 Coliformes fécaux

Bactéries appartenant également à la famille des *Enterobacteriaceae*, dont certaines souches sont entéropathogènes et responsables d'intoxication alimentaires

Le principe de la numération est identique à celui des coliformes totaux mais la température d'incubation est de 44°C pendant 48h

Lecture et numération : La lecture se fait par le comptage des colonies rouges ayant un diamètre 0,5mm.

1-2-2-5 Levures et moisissures

Les levures et les moisissures sont des champignons microscopiques se présentant respectivement sous forme unicellulaire et filamenteux, qui peuvent provoquées des accidents de fabrication (altération de la texture, du gout dans le cas du fromage) lorsque leur nombre dans le produit dépasse un certain seuil. Ils se développent à des pH acides et à des températures avoisinant 20°C-25°C.

Technique :

- Faire Fondre la gélose OGA à 100°C au bain marie puis la maintenir à 45°C ;
- Préparer une série de 3 boîtes de Pétri en 3 exemplaires ;
- Verser 15ml dans chaque boîte et laisser refroidir ;
- Déposer 0,1ml de chaque dilution dans les boîtes de Pétri ; 3 séries de dilutions successives sontensemencées.
- Etaler avec un râteau l'inoculum à la surface de la gélose ;
- Incuber les boîtes retournées à 25°C pendant 5jours.

Lecture et numération : Nous comptons les différentes colonies sur les boîtes. On tiendra compte que des boîtes dont le nombre de colonies sont comprises entre 30 et 300 (BOUIX et LEVEAU, 1991 ; GUIRAUD 2003).

Le résultat trouvé est multiplié par l'inverse de la dilution et exprimé ensuite en nombre d'UFC/ml.

1-2-2-6 Recherche des germes pathogènes**1-2-2-6-1 Recherche de *Staphylococcus aureus***

Les staphylocoques appartiennent à la famille des *Micrococcaceae*, ce sont des cocci Gram positif, immobiles, non sporulés et aero-anaérobie facultatifs.

La recherche des staphylococcus s'effectue sur le milieu liquide Géolitti-Cantoni(GC) additionné d'un additif qui le Tellurite de potassium.

Technique :**• Test présumptif**

- Préparer des tubes de 15ml du milieu GC ;
- Inoculer les tubes par 1ml des dilutions du lait préalablement préparées ;
- Incuber 24 à 48h à 37°C.

Lecture : la présence d'un trouble noir et dépôt au fond des tubes signifie présence éventuelle de *Staphylococcus aureus*

• Isolement

- Isoler en stries à partir des tubes présentant un trouble sur gélose Chapman ;
- Incuber à 37°C pendant 24h.

Lecture : les *Staphylococcus aureus* donnent des colonies jaunâtres et provoquent le virement du milieu en jaune (GUIRAUD, 2003).

• Test de confirmation

- Réaliser une coloration de Gram et le test catalase sur les colonies isolées sur gélose Chapman ;
- Réaliser le test de la coagulation du plasma de lapin : les colonies bien caractéristiques sont prélevées et enrichie dans le bouillon BHIB. Après 18h d'incubation à 37°C, on mélange 0,5ml de plasma de lapin avec 0,5ml de la culture sur BHIB puis on incube les tubes à 37°C. Au cours de l'incubation, des observations sont effectuées chaque 2h.

Lecture : la confirmation de la présence de *Staphylococcus aureus* est obtenue par les résultats suivants : cocci Gram positif, en chaîne et grappe de raisin, catalase positive et coagulase positive (GUIRAUD, 2003).

1-2-2-6-2 Recherche des Salmonelles

Les bactéries du genre Salmonelles appartiennent à la des *Enterobacteriaceae*, ce sont des bacilles à Gram-, aéro-anaérobies facultatives, elles réduisent les nitrates en nitrites. Les toxi infections alimentaires causées par les salmonelles font suite à des erreurs permettant une croissance bactérienne importante. La recherche des salmonelles s'effectue en ces étapes successives suivantes :

1- Pré-enrichissement : il consiste à :

- Préparer un flacon contenant 90ml d'EPT ;
- Pipeter 10ml de la solution mère et les verser dans le flacon d'EPT, la dilution 10-1 est ainsi constituée ;
- Réaliser des dilutions successives de la même manière ;
- Incuber pendant 20h à 37°C.

2- Enrichissement :

- Préparer le milieu SFB (bouillon au sélénite de sodium) ;
- Verser 10ml des dilutions dans 100ml du milieu SFB ;
- Incuber à 37°C pendant 24h.

3- Isolement :

- Isoler sur milieu Hecktoen, en utilisant la technique d'étalement par épuisement en surface ;
- Incuber 24h à 37°C.

Lecture : Les salmonelles apparaissent sous forme de colonies transparentes avec un centre noir et absence de virement de la couleur du milieu.

4- Test de confirmation :

La galerie API est utilisée pour effectuer la confirmation de la présence des salmonelles (GLEDEL et CORBION, 1991).

1-2-3 Isolement et screening d'isolats de *Lactococcus* bactériocinogéniques

1-2-3-1 Isolement de souches de *Lactococcus*

Les bactéries lactiques sont des bactéries exigeantes sur le plan nutritionnelles et ces exigences varient d'une souche à une autre. Pour l'isolement de souches de *Lactococcus*, trois milieux sont utilisés : le milieu M17 (TERZAGHI et SANDINE, 1975) , le milieu ELLIKER(ELLIKER, ANDERSON et HANNESSON, 1956). Dans notre étude, nous avons utilisé le milieu ELLIKER avec la cycloheximide (Actidione) car d'après LARPENT et LARPENT, (1997) ce dernier représente le meilleur milieu d'isolement des lactocoques à partir du lait et des produits laitiers. L'ajout de l'actidione a pour but d'empêcher le développement des levures et des moisissures.

1-2-3-1-1 Isolement en surface

Technique :

- Réaliser une série de dilution décimales en double, le diluant est la tryptone-sel ;
- Faire fondre la gélose ELLIKER + Actidione et la faire couler sur boîte de Pétri, laisser solidifier ;
- Ensemencer en surface 100µl de chaque dilution puis étaler avec un râteau ;
- Incuber à 30°C pendant 72h en aérobiose.

Lecture : les *Lactococcus* apparaissent sous forme de colonies blanches laiteuses ou transparentes d'environ 2mm de diamètre (GUIRAUD, 2003).

1-2-3-1-2 Isolement en profondeur

- Réaliser une série de dilution décimales en double, le diluant est la tryptone-sel ;
- Faire fondre la gélose ELLIKER+ Actidione ;
- Déposer 1ml de chaque dilution au centre de la boîte de Pétri ;
- Ajouter 15 ml de gélose ELLIKER+ actidione maintenue à 45°C et homogénéiser par des mouvements circulaires et en huit ;
- Incuber à 30°C pendant 72h en aérobiose

Lecture : les *Lactococcus* poussent en profondeur en formant des colonies blanches et lenticulaires.

1-2-3-2 Purifications des isolats

Cette opération est très importante car elle permet l'obtention de souches pures. Avant de procéder à la purification, deux tests sont effectués pour s'assurer de l'appartenance de la souche aux bactéries lactiques. Ces tests sont la coloration de Gram, le test de la catalase et le test oxydase. La croissance à +45°C, à +10°C et le test de détermination du type fermentaire sont également effectués pour s'assurer de l'appartenance des isolats au genre *Lactococcus*.

● Protocole de la coloration de Gram

Réaliser un frottis sur une lame en verre propre et préalablement dégraissée ;

- Colorer le frottis avec du violet de gentiane durant 2 min ;
- Rejeter le colorant et ajouter le lugol 2× 45secondes ;
- Rincer à l'eau ;
- Décolorer à l'alcool 90° durant 30 secondes ;
- Rincer abondamment à l'eau ;
- Faire une contre-coloration avec de la fuschine diluée à 1/10 durant 2 min ;
- Rincer à l'eau et observer à l'immersion ×100.

Lecture : les cellules Gram+ vont apparaître violettes alors les Gram- apparaîtront roses (BOUIX et LEVEAU, 1991).

Les souches de *Lactococcus* sont Gram+ et se disposent en diplocoques et en chaînettes de 3 à 5 éléments.

• Protocol du test de la catalase

Préparer une lame dégraissée avec de l'éthanol et stérile ;

- Déposer 2 à 3 gouttes d'eau oxygénée à 10 volume sur la lame ;
- A l'aide d'une pipette stérile prélevé quelques cellules de la colonie ;
- Mélanger soigneusement les cellules avec de l'eau oxygénée.

Lecture : dégagement de gaz signifie que la souche est catalase +, l'absence de dégagement de gaz signifie que la souche est catalase- . Les souches de *Lactococcus* sont catalase - (LEVEAU *et al*, 1991).

• Protocol Test de l'oxydase

L'oxydase est une enzyme qui réagit directement avec l'oxygène pour lui transférer des électrons, il s'agit ici d'un cytochrome oxydase intervenant dans la chaîne respiratoire.

Technique :

- Prendre des disques oxydase prêts à l'emploi et stérils ;
- Déposer sur une lame de verre stérile le disque ;
- Imbiber le disque d'une goutte d'eau physiologique stérile ;
- Déposer au dessus un fragment d'une colonie à l'aide d'une pipette PASTEUR stérile.

Lecture :

- Bactéries oxydases + : apparition d'une coloration violette sur le disque ;
- Bactéries oxydases - : le disque reste incolore (BOUIX et LEVEAU, 1991)

Une fois que ces deux tests sont réalisés, les colonies Gram+ et catalase- sont prélevées et enrichie dans 5ml du bouillon Elliker durant 18 h à 30°C.

Un deuxième réisolement est réaliser sur gélose ELLIKER+ actidione et cette opération de repiquage successifs doit être répétée jusqu'à l'obtention d'un isolat pur.

Après cette étape de purification, deux tests sont effectués pour vérifier l'appartenance de l'isolat au genre *Lactococcus* : croissance à 10°C et 45°C et le test de fermentation.

• Croissance à 45°C

Technique :

- Ensemencer 2 à 3 colonies de l'isolat dans 5 ml du bouillon ELLIKER ;
- Incuber 24 à 48h à 45°C.

Lecture : une croissance se manifeste par la présence d'un trouble du milieu (GUIRAUD, 2003).

• Croissance à 10°C**Technique :**

- Ensemencer 2 à 3 colonies de l'isolat dans 5 ml du bouillon ELLIKER ;
- Incuber 10 jours à 10°C.

Lecture : une croissance se manifeste par la présence d'un trouble du milieu (GUIRAUD, 2003).

• Type fermentaire

C'est un test qui permet de séparer les espèces bactériennes homofermentaires des bactéries hétérofermentaires.

Technique :

Nous réaliserons la technique à la cloche de Durham, nous utiliserons le bouillon ELLIKER et nous procédons comme suite :

- Remplir des tubes à essai à vis renfermant la cloche de Durham de 10 ml du bouillon ELLIKER ;
- Ensemencer avec l'isolat correspondant et homogénéiser en évitant l'introduction de bulles d'air dans la cloche ;
- Incuber à 30°C pendant 5 jours.

Lecture :

- Bactéries homofermentaires : absence de bulles de gaz dans la cloche ;
- Bactéries hétérofermentaires : présence de bulles de gaz dans la cloche (LEVEAU *et al.*, 1991).

1-2-3-3 Conservation des isolats

La conservation à court terme des souches pures est effectuée sur milieu M17 solide en piqure centrale. Après croissance à température optimale, les cultures sont maintenues à + 4°C et le renouvellement des souches se fait par repiquage toutes les 4 semaines. La conservation à long terme des souches purifiées est réalisée dans le bouillon M17 additionné de 30% de glycérol stérile et stockées à -20°C (SAMELIS *et al.*, 1994 ; HERRERO *et al.*, 1996).

1-2-4 Screening d'isolats de *Lactococcus* bactériocinogéniques

Il existe deux méthodes de détection de l'activité bactériocinogénique : la méthode directe et la méthode indirecte. Le principe de ces méthodes est basé sur la diffusion de l'agent antimicrobien dans les milieux de cultures semi-solide pour inhiber la croissance d'un micro-organisme indicateur sensible. Dans notre étude, nous avons choisie deux variantes de la méthode indirecte (double couche et diffusion en puits) car elle offre plus de sensibilité comparativement à la méthode directe (TAGG *et al.*, 1976).

La souche indicatrice utilisée au cours de notre screening est *Listeria innocua* F sensible aux bactériocines(Ecole Agro-alimentaire,Laboratoire de Microbiologie INITIA, Nantes, France).

1-2-4-1 Vérification de la pureté de *Listeria innocua* F

- Faire un bouillon de *Listeria innocua* F sur ELLIKER ;
- Incuber 18h à 30°C ;
- Isoler en stries sur gélose nutritive enrichie ;
- Incuber à 30°C pendant 18h ;
- Réaliser la coloration de Gram et le test catalase.

Lecture : les listeria sont de petits bacilles Gram positif, asporulés et catalase positive.

1-2-4-2 Détermination du nombre d'UFC/ml en fonction de la DO à 625nm

- Isoler *Listeria innocua* F sur gélose nutritive enrichie ;
- Incuber 18h à 30°C ;
- Réaliser une suspension dans l'eau physiologique à 0,9% NaCl ;
- Réaliser des suspensions de 1ml à DO 0,08 ; 0,09 et 0,1 à 625nm ;
- Réaliser des dilutions décimales ;
- Ensemencer 0,1ml de chaque dilution en surface sur gélose nutritive enrichie ;
- Etaler avec un râteau ;
- Incuber à 30°C pendant 18h ;
- Dénombrer le nombre d'UFC/ml pour chaque DO.

1-2-4-3 Méthode double couche

Technique :

- Faire une culture en surface de l'isolat lactique sur gélose M17 + Actidione ;
- Incuber 24h à 30°C en anaérobiose ;
- Ajouter 10 ml de gélose ELLIKER à 0,9% agar préalablement ensemencer par 100µl de la suspension de *Listeria innocua* F (DO = 0,08 à 625nm) ;
- Laisser solidifier à la paillasse ;
- Incuber 24h à 30°C.

Lecture : un isolat est qualifié de positif s'il provoque une inhibition de *Listeria innocua* F, mesurer la zone d'inhibition avec pied à coulisse (MORENO *et al.*, 1999).

1-2-4-4 Méthode diffusion en puits

Dans cette technique les deux souches bactériennes (souche teste et souche indicatrice) sont cultivées dans leurs conditions optimales de croissance (TAGG et McGIVEN, 1971). Son objectif est double : la recherche de la substance inhibitrice dans le milieu extracellulaire de l'isolat producteur et l'élimination de l'effet du pH et du H₂O₂ (GONZALEZ *et al.*, 2007).

1-2-4-4-1 Préparation du surnageant de l'isolat lactique

Technique :

- Isoler l'isolat lactique sur gélose ELLIKER + Actidione ;
- Incuber 18h à 30°C ;
- Ensemencer 10 ml du bouillon ELLIKER avec 4 colonies de l'isolat lactique ;

- Ajouter 2 ml de l'huile de vaseline stérile pour assurer l'anaérobiose ;
- Incuber 18h à 30°C ;
- Aspirer l'huile de vaseline avec une micropipette ;
- Centrifuger à 8000g / 30min à + 4°C ;
- Neutraliser le surnageant à pH 7 avec NaOH 1N.

1-2-4-4-2 Préparation de l'inoculum de la souche indicatrice

Technique :

- Réaliser une culture de *Listeria innocua* F sur gélose nutritive enrichie ;
- Incuber à 30°C pendant 18h ;
- Réaliser une suspension bactérienne d'une DO = 0,08 à 625nm ;
- Inoculer 15ml de gélose ELLIKER à 0,9% agar avec 15µl de la suspension de *Listeria innocua* F initialement préparée (DO = 0,08 à 625nm) ;
- Homogénéiser la gélose ;
- Couler sur boîte de Pétri et mettre à + 4°C pendant 30min pour solidification ;
- Creuser des puits de 6mm de diamètre dans la gélose avec le bout supérieur d'une pipette PASTEUR stérile.

● Réalisation du test :

- Charger les puits avec 70µl du surnageant neutralisé de l'isolat lactique ;
- Laisser diffuser à la paillasse durant 1h ;
- Incuber 16h à 30°C ;
- Un puits est effectué pour chaque isolat dans trois boîtes de Pétri différentes ;
- Charger trois autres puits au niveau de la même boîte avec 70µl de nisine pure à 10mg/ml (témoin positif), eau distillée stérile (témoin négatif) et bouillon ELLIKER à pH 7.

Lecture : La lecture se fait par la mesure du diamètre en mm avec pied à coulisse des zones d'inhibitions formées autour des puits (Zi). Un résultat est considéré positif si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieure à 2mm (YILDIRIM Z et YILDIRIM M, 2001). La mesure du diamètre d'inhibition se fait par la formule suivante :

$$Zi = \text{diamètre de la zone d'inhibition obtenue} - \text{diamètre du puits.}$$

1-2-4-5 Elimination de l'effet des bactériocines

Ce test a pour objectif d'éliminer et de dénaturer toutes les protéines du surnageant de l'isolat lactique et d'évaluer éventuellement l'effet du pH dans l'inhibition de *Listeria innocua* F.

Technique :

- Ensemencer 10 ml du bouillon ELLIKER par 4 colonies de l'isolat lactique ;
- Ajouter 2ml de l'huile de vaseline stérile pour assurer l'anaérobiose ;
- Incuber 18h à 30°C ;
- Centrifuger le bouillon à 8000g pendant 30min à +4°C ;
- Récupérer 5ml du surnageant dans un tube à essai à vis stérile ;
- Autoclaver le surnageant 30min à 121°C ;

- un deuxième tube de 5ml du surnageant récupéré à partir du même tube de centrifugation servira de témoin (non traité thermiquement);
- Charger les puits avec 70µl du surnageant traité thermiquement et du surnageant non traité ;
- Laisser 1h à la paillasse pour diffusion ;
- Incuber 16h à 30°C.

Lecture : observer la présence d'une zone d'inhibition et mesurer son diamètre avec pied à coulisse (METLEF et DILMI-BOURAS, 2009)

1-2-4-6 Démonstration de la nature protéique de la substance inhibitrice

Ce test vise à démontrer la nature protéique des substances inhibitrices. On utilise quatre enzymes protéolytiques : α -Chymotrypsine (EC 3.4.21.1) 350 U/mg, Trypsine (EC 3.4.21.4) 1645 U/mg, Pepsine (EC 3.4.23.1) 1436U/mg et la Protéinase K (EC 3.4.21.64) 30U/mg. Deux concentrations finales d'enzymes sont utilisées (1mg/ml et 0,1mg/ml). Deux méthodes sont également utilisées pour réaliser ce test enzymatique.

Méthode 1 : Utilisation des enzymes sous formes solubles (BENKERROUM *et al.*, 2000 ; MORENO *et al.*, 1999).

- Préparation des enzymes :

● α -Chymotrypsine et trypsine :

- Préparer tampon phosphate (0,1mol/l pH 6) ;
- Peser 20mg et 2mg/ml d'enzyme avec une balance de précision ;
- Dissoudre l'enzyme dans 10ml du tampon phosphate, 20mg pour préparer la solution à 2mg/ml et 2mg pour la solution à 0,2mg/ml ;
- Filtrer avec filtre 0,22µm ;
- Conserver à + 4°C.

● Pepsine :

- Préparer une solution HCL (0,02mol/l pH 2) ;
- Peser 20mg et 2mg/ml d'enzyme avec une balance de précision ;
- Dissoudre l'enzyme dans 10ml de la solution HCL, 20mg pour préparer la solution à 2mg/ml et 2mg pour la solution à 0,2mg/ml ;
- Filtrer avec filtre 0,22µm ;
- Conserver à +4°C.

● Protéinase K :

- Préparer le tampon Tris/HCL 20Mm pH 8 ;
- Peser 20mg et 2mg/ml d'enzyme avec une balance de précision ;
- Dissoudre l'enzyme dans 10ml du tampon Tris/HCL ; 20mg pour préparer la solution à 2mg/ml et 2mg pour la solution à 0,2mg/ml ;
- Filtrer avec filtre 0,22µm ;
- Conserver à +4°C.

- Technique :

- Mélanger 1ml du surnageant neutralisé à pH 7 avec 1 ml de la solution enzymatique (Rapport volumique 1 :1) pour avoir une concentration finale en enzymes de 1mg/ml et 0,1 mg/ml en enzyme ;
- Incuber 2h à 37°C dans un bain marie ;
- Charger les puits avec 70µl avec les solutions suivantes : tampon avec enzyme, milieu ELLIKER, surnageant avec tampon sans enzyme et surnageant avec enzyme ;
- Laisser diffuser 1h à la paillasse pour diffusion;
- Incuber 16h à 30°C.

Lecture : la lecture se fait par la recherche de zones d'inhibitions et la mesure de leurs diamètres.

Méthode 2 : Dans cette méthode, les enzymes sont utilisées sous forme de poudre (TOPISIROVIĆ *et al.*, 2006 ; TOPISIROVIĆ *et al.*, 2007 ; STRAHINIĆ *et al.*, 2007 ; NIKOLIC *et al.*, 2008).

Technique :

- Préparer et neutraliser les surnageant des isolats lactiques à pH 7 ;
- Charger les puits avec 70µl des solutions suivantes : surnageant neutralisé à pH 7 pour deux puits et tampon avec enzyme (concentration 1mg/ml) pour un puits ;
- Déposer 15mg d'enzyme avec une spatule stérile à proximité d'un deux puits chargé avec le surnageant neutralisé ;
- Incuber 3h à 37°C pour assurer une activité enzymatique maximale ;
- Incuber à 30°C pendant 16h.

Lecture : la lecture se fait par l'observation d'éventuelle déviation de la zone d'inhibition au niveau du site de dépôt de l'enzyme.

1-2-5 Identification :

L'identification des bactéries lactiques est basée sur la connaissance d'un certain nombre de caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques. Les caractères morphologiques sont mis en évidence par l'observation microscopique des cellules après une coloration simple ou coloration de Gram.

L'étude des autres caractères peut être réalisée soit par la galerie biochimique classique soit par les microméthodes (galerie API) qui ont le mérite d'être simples et rapides. Vu la non disponibilité des galeries API, nous avons utilisé la galerie biochimique classique.

1-2-5-1 Tests communs

1-2-5-1-1 Morphologie

L'étude de la morphologie se fait par la réalisation de la coloration de Gram, ce type de coloration permet de séparer les bactéries en deux grand groupes : les bactéries Gram+ et les bactéries Gram-, De plus, l'observation microscopique permet de distinguer la forme et l'agencement des cellules bactériennes.

Technique :

- Réaliser un frottis sur une lame en verre propre et préalablement dégraissée ;
- Colorer le frottis avec du violet de gentiane durant 2 min ;
- Rejeter le colorant et ajouter le lugol 2× 45secondes ;
- Rincer à l'eau
- Décolorer à l'alcool 90° durant 30 secondes ;
- Rincer abondamment à l'eau ;
- Faire une contre-coloration avec de la fuschine diluée à 1/10 durant 2 min ;
- Rincer à l'eau et observer à l'immersion ×100.

Lecture : les cellules Gram+ vont apparaitre violettes alors les Gram- apparaitront roses (BOUIX et LEVEAU, 1991).

1-2-5-1-2 Test à la catalase

La catalase est une enzyme retrouvée chez la plupart des bactéries aérobies strictes et aérobies facultatives. Elle empêche l'accumulation de l'eau oxygénée qui est un composé toxique pour la cellule. Elle catalyse la réaction suivante :



Technique :

- Préparer une lame propre et stérile ;
- Déposer 2 à 3 gouttes d'eau oxygénée à 10 volume sur la lame ;
- A l'aide d'une pipette stérile prélevé quelques cellules de la colonie ;
- Mélanger soigneusement les cellules avec de l'eau oxygénée.

Lecture : dégagement de gaz signifie que la souche est catalase +, l'absence de dégagement de gaz signifie que la souche est catalase negative (LEVEAU *et al.*, 1991 ; DELARAS, 2007).

1-2-5-1-3 Mobilité

C'est un test très important vu qu'il différencier et de caractériser les bactéries qui sont immobiles des bactéries mobiles

Technique :

Des tubes du milieu gélose mannitol mobilité sont ensemencés par piqure centrale à partir des différents tubes d'enrichissement, puis sont incubés à la température appropriée pendant 48h.

Lecture : Les bactéries immobiles se développent uniquement au long de la pique centrale tandis que les bactéries mobiles envahissent le tube de part et d'autre (GUIRAUD, 2003 ; LEVEAU *et al.*, 1991).

1-2-5-1-4 Types respiratoires Cette étude consiste à déterminer le type respiratoire des bactéries : aérobies, anaérobies ou anaérobies facultatives.

Technique : Des tubes contenant la gélose ELLIKER solidifié à une hauteur de 80 mm sont ensemencés par pique centrale par les isolats à tester et incubés 24h à 30°C (BOUIX et LEVEAU, 1991).

Lecture :

- Une croissance en surface : l'isolat est aérobie ;
- Une croissance dans le fond du tube mais absence de croissance dans la zone supérieur : isolat anaérobie ;
- Croissance dans tout le tube : l'isolat est aéro-anaérobie ;
- Croissance sur environ 1 cm dans une zone intermédiaire : microaérophile.

1-2-5-1-5 Type fermentaire

C'est un test qui permet de séparer les espèces bactériennes homofermentaires des bactéries hétérofermentaires.

Technique :

Nous réaliserons la technique à la cloche de Durham, nous utiliserons le bouillon ELLIKER et nous procédons comme suite :

- Remplir des tubes à essai à vis renfermant la cloche de Durham de 10 ml du bouillon ELLIKER ;
- Ensemencer avec l'isolat correspondant et homogénéiser en évitant l'introduction de bulles d'air dans la cloche ;
- Incuber à 30°C pendant 5 jours.

Lecture :

- Bactéries homofermentaires : absence de bulles de gaz dans la cloche ;
- Bactéries hétérofermentaires : présence de bulles de gaz dans la cloche (LEVEAU *et al.*, 1991).

1-2-5-1-6 Test nitrate réductase

Certaines bactéries ont la capacité de réduire les nitrates en nitrites selon la réaction suivante : $\text{NO}_3^- + 2(\text{H}^+, \text{e}^-) \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$ tandis que d'autres peuvent poursuivre cette réduction jusqu'au stade d'azote gazeux : $2 \text{NO}_2^- + 8(\text{H}^+, \text{e}^-) \rightarrow \text{N}_2 + 4 \text{H}_2\text{O}$

La première et la deuxième réaction sont catalysée par la nitrate réductase et la nitrite réductase respectivement. La mise en évidence de la nitrate réductase se base sur la recherche des nitrites formés en fin de réaction en utilisant les réactifs NR1 et NR2.

Technique :

- Introduire 1 ml de la culture bactérienne sur bouillon dans des tubes de bouillon nitraté ;
- Après incubation à 30°C pendant 48h, ajouter quelques gouttes du réactif NR1 et NR2

Réactif NR1 : 0,8 g d'acide sulfanique + 100ml d'acide acétique 5N

Réactif NR2 : 0,5 g d'alpha naphthylamine + 100ml d'acide acétique 5N

Lecture : la coloration rouge (après 1 minute) traduira la présence des nitrites et donc d'une nitrate réductase : NR+ (GUIRAUD, 2003 ; DELARAS, 2007).

Une réaction négative peut être interprétée soit par :

- La réduction des nitrates a été poursuivie au-delà du stade nitrate jusqu'au stade NH_3 ou de N_2
- Les nitrates n'ont pas été réduits : NR-

Le test est complété par l'épreuve de Zo-Bell. On ajoute alors un peu de poudre de zinc et on mélange et on laisse reposer. Si les nitrates n'ont pas été réduits, ils le seront par voie chimique et ceci par le zinc ce qui se traduira par la coloration rose : NR-. Si le milieu reste incolore, cela implique que les nitrates ont été complètement réduits au-delà du stade nitrites, c'est-à-dire au stade azote gazeux : NR+.

1-2-5-1- 7 Recherche de citratase

La citratase est la première enzyme qui catalyse la transformation du citrate en acétoïne et en diacétyle. Cette technique a pour but de mettre en évidence la citrate perméase chez certaines souches lactiques.

Le principe de cette technique consiste à placer la souche à tester dans un milieu pauvre renfermant comme seule source de carbone le citrate, seules les souches qui sont équipées de citrate perméase peuvent pousser.

Technique :

- Ensemencer chaque isolat dans la gélose semi solide au lait citraté
- Incuber à la température à 30°C pendant 24h.

Lecture : la présence de la citratase se manifeste par la production de gaz dans la masse du milieu ce qui provoque des fissures au niveau de ce dernier (LEVEAU *et al.*, 1991).

1-2-5-1- 8 Recherche de l'acétoïne

Ce test permet de distinguer les ferments acidifiants des ferments aromatisants, la réaction de Voges Proskauer permet de mettre en évidence la présence d'acétyl-méthyl-carbinol (AMC) généralement appelé acétoïne.

Technique :

- Le milieu Clark et Lubs est ensemencé par les isolats à tester ;
- Incuber pendant deux jours à 30°C pendant 18h ;
- Après incubation, prélever 1 ml de la culture en bouillon, ajouter 0,5 ml du réactif VP1 puis 0,5 ml du réactif VP2

VP1 : solution à 6 % d' α -naphthol dans de l'alcool à 90%

VP2 : solution aqueuse de potasse à 40 %

- Agiter fréquemment durant 15 min environ et observer

Lecture : la présence d'acétoïne se manifeste par l'apparition d'une couleur rose à la surface du milieu (LEVEAU *et al.*, 1991 ; DELARAS , 2007).

1-2-5-1- 9 Arginine dihydrolase

L'ADH est une enzyme qui permet la libération de l'ammoniac et de citruline à partir de l'arginine et elle n'est active qu'en anaérobiose et en milieu acide.

Technique :

- Pour chaque isolat, ensemencer deux tubes du milieu ADH qui ne renferment qu'une seule source de carbone, le glucose. L'un servira de témoin et l'autre en plus du glucose contient de l'arginine comme acide aminé. Les deux tubes renferment également un indicateur coloré ;
- Incuber à 30°C pendant 48h.

Lecture :

- Dans le tube témoin, après dégradation du glucose, le milieu virera au jaune traduisant ainsi le phénomène d'acidification.
- Dans le second tube, le milieu virera au jaune après acidification du milieu, les bactéries possédant l'ADH vont dégrader l'arginine ce qui va alcaliniser le milieu et par conséquence reviendra à sa couleur initiale (violet) (LEVEAU *et al.*, 1989 ; LEVEAU *et al.*, 1991 ; DELARAS, 2007).

1-2-5-1-10 Hydrolyse de la gélatine

L'hydrolyse de la gélatine donne un aperçu sur le système protéolytique des souches sachant que la gélatine est une macromolécule protéique.

Principe :

Cette technique se base sur le comportement de cette protéine vis-à-vis de la température .en effet, à des températures inférieures à 23°C, la gélatine se prend en masse et devient solide alors qu'à des températures supérieures à 25°C la gélatine se liquéfie.

Technique :

- Ensemencer le milieu à la gélatine en masse ;
- Incuber à 30°C pendant 7 jours ;
- Puis placer les tubes au réfrigérateur pendant quelques heures.

Lecture : si la liquéfaction persiste cela signifie que l'isolat a produit la gélatinase BOUIX et LEVEAU, 1991).

1-2-5-1-11 Thermorésistance à 63°C pendant 30 minutes**Technique**

- Pour chaque isolat, ensemercer un tube de bouillon ELLIKER ;
- Placer le tube dans un bain marie à 63°C pendant 30 min ;
- Refroidir immédiatement sous robinet et incuber à 30°C pendant 48h.

Lecture : l'apparition d'un trouble implique une thermorésistance de la souche (GUIRAUD, 2003).

1-2-5-1-12 Métabolisme des sucres

Il s'agit d'apprécier l'aptitude des souches à métaboliser diverses hydrates de carbones et de déterminer le profil biochimique de ces dernières ce qui facilite leur identification.

Technique :

- Ensemencer chaque isolat dans des tubes préalablement remplis avec un bouillon au rouge de phénol dans lequel la source de carbone est variable (13 sucres sont utilisés à une concentration de 0,5%)
- Incuber à 30°C pendant 24 à 72h

Lecture : un virage au jaune indique l'acidification du milieu et donc la dégradation du sucre par la souche testée (LEVEAU *et al.*, 1991 ; DELARAS, 2007).

1-2-5-2 Tests spécifiques**1-2-5-2-1 Croissance à différentes températures**

Ce test sépare les Streptocoques mésophiles des Stréptocoques thermophiles en utilisant le bouillon ELLIKER comme milieu de base.

Technique :

Chaque souche sera ensemencée dans quatre tubes de bouillon ELLIKER :

- Une série sera incubée à 10 °C pendant 10 jours
- Une série sera incubée à 37°C pendant 48h
- Une série sera incubée à 40 °C pendant 48h
- Une série sera incubée à 45°C pendant 48h

Lecture : la présence d'un trouble indique la croissance de la souche (LEVEAU *et al.*, 1989 ; LEVEAU *et al.*, 1991 ; GUIRAUD, 2003).

1-2-5-2-2 Croissance sur milieux hostiles

1-2-5-2-2-1 Croissance à différentes concentrations de NaCl

Technique :

- Pour chaque souche trois tubes de bouillon hypersalé de 2,5% NaCl, 4% NaCl et 6,5 % NaCl
- Ensemencer chaque souche dans chaque tube ;
- Incuber ensuite à 30°C pendant 18h.

Lecture : la présence de trouble indique la croissance bactérienne (LEVEAU *et al.*, 1989 ; LEVEAU *et al.*, 1991 ; GUIRAUD, 2003).

1-2-5-2-2-2 Croissance à pH 9,2

Technique :

- Ajuster le bouillon ELLIKER à pH 9,2 à l'aide d'une solution de soude 1N ;
- Ensemencer les différentes souches et incuber à 30°C pendant 48h

Lecture : la présence d'un trouble indique une croissance bactérienne (LEVEAU *et al.*, 1989 ; LEVEAU *et al.*, 1991 ; GUIRAUD, 2003).

1-2-5-2-2-3 Croissance sur lait de SHERMAN

Cette épreuve a pour but de mettre en évidence l'aptitude des souches à pousser en présence de 0,1% et 0,3% du bleu de méthylène et leur capacité à le réduire. Ce test démontre l'aptitude des souches lactiques à croître en présence du bleu de méthylène. Ce test est surtout intéressant pour différencier les streptocoques des *Lactococcus*. Ainsi, *Lactococcus lactis* est capable de pousser à 0,3% du bleu de méthylène. Les streptocoques fécaux se développent en présence de 0,1% du bleu de méthylène. Quant à *Streptococcus thermophilus*, il est très sensible au colorant.

Technique :

- Deux tubes de 10 ml du lait de SHERMAN à 0,1% et 0,3% sont ensemencés par l'isolat à tester ;
- Incuber à 30°C pendant 72h.

Lecture : la croissance des souches se traduit par une coagulation du lait, cependant la réduction du colorant par sa décoloration (LEVEAU *et al.*, 1989 ; LEVEAU *et al.*, 1991 ; GUIRAUD, 2003).

1-2-5-2-2-4 Croissance sur lait tournesolé

Cette épreuve a pour but la mise en évidence de l'enzyme réductase des souches capables de réduire le tournesol.

Technique :

- 10ml du lait tournesolé sontensemencés par l'isolat étudié ;
- Incuber à 30°C pendant 72h

Lecture : virage au rouge avec coagulation indique une acidification, alors qu'une décoloration de l'indicateur une réduction (LEVEAU *et al.*, 1989 ; LEVEAU *et al.*, 1991 ; GUIRAUD, 2003).

1-2-5-2-2-5 Croissance en présence du tellurite de potassium**Technique :**

- Additionner la gélose ELLIKER de 0,04% de téllurite de potassium ;
- Ensemencer et incuber à 30°C pendant 48h.

Lecture : les colonies résistantes seront de couleur noire tandis que les colonies sensibles seront petites et de couleur grise (LEVEAU *et al.*, 1989 ; LEVEAU *et al.*, 1991 ; GUIRAUD, 2003).

2- RESULTATS ET DISCUSSION

Au cours de notre étude, nous avons collecté 20 échantillons de lait fermenté traditionnel de différentes régions de la wilaya de Tizi-Ouzou. La collecte est réalisée dans des conditions stériles et dans des flacons de 250 ml.

L'origine, l'année et le mois de collecte ainsi que le temps de fermentation des sont donnés dans le tableau N° VI.

Une fois la collecte terminée, les laits sont acheminés directement au laboratoire dans une glacière afin d'éviter d'éventuelles fluctuations de la flore microbienne.

Nous avons procédé dans un premier temps à une numération des groupes microbiens suivants : flore mésophile aérobie totale, bactéries lactiques, coliforme totaux, coliformes fécaux, levures et moisissures. Une recherche est également effectuée pour les bactéries pathogènes suivantes : *Staphylococcus aureus* et les Salmonelles. Une mesure du pH est également effectuée pour tous les échantillons.

Dans un second temps, nous avons procédé à l'isolement et à la purification de 65 isolats lactiques sur ELLIKER + Actidione. Une fois purifiés, ces isolats sont analysés afin d'en sélectionner ceux qui produisent des bactériocines en utilisant *Listeria innocua* F comme souches sensibles aux bactériocines.

2-1 Mesure du pH

Le pH est un paramètre très important qui nous renseigne sur l'activité métabolique des bactéries lactiques. Sa diminution est due essentiellement à la dégradation partielle du lactose du lait en acide lactique. Les résultats sont donnés dans le tableau V.

On constate que la valeur du pH varie de 4,44 à 4,90 avec une moyenne de $4,40 \pm 0,29$. La valeur la plus élevée est celle du LFT 6 qui est de 4,90 et la valeur la plus faible est celle du LFT 17(4,44).

Ces résultats montrent que le pH de ces laits fermentés traditionnels est acide et on ne note pas de grande différence entre ces valeurs.

Avec sa teneur en lactose qui de 49g/l en moyenne, le lait représente un milieu très favorable pour le catabolisme glucidique. En effet d'après HUTKINS (2006) la croissance de *Lactococcus lactis ssp lactis* et *Lactococcus lactis ssp cremoris* est très rapide dans le lait et produisent une grande quantité d'acide lactique ce qui aboutit à un abaissement du pH considérable.

L'espèce *Lactococcus lactis* est considérée comme un agent acidifiant puissant du lait, cependant d'après DACOSTA (2000), *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* est également un agent acidifiant puissant du lait.

Néanmoins, selon nos résultats il semblerait que l'intervention des lactobacilles dans l'acidification des laits fermentés traditionnels est minime car ces bactéries d'après DACOSTA (2000) peuvent abaisser le pH du lait jusqu'à 3,5. Ceci pourrait être expliqué par la durée de fermentation des différents laits fermentés traditionnels. En effet, la durée du processus de fermentation de ces laits se situe entre 18h et 24h. Ce qui suppose que la fermentation du lait par les *Lactococcus* n'est pas suffisamment avancée pour permettre la croissance des lactobacilles qui supportent mieux l'acidité comparativement aux *Lactococcus* qui sont plus sensibles.

TABLEAU V : Origine, année et mois de collecte ainsi que le temps d'incubation des laits fermentés traditionnels collectés.

Laits fermentés traditionnels	Origine (région)	Année et mois de collecte	Temps de fermentation(h)
LFT1	OUAGUENOUN	Juin 2007	24
LFT2	OUAGUENOUN	Juin 2007	20
LFT3	BOUZEGUENE	Octobre 2007	24
LFT4	BOGHNI	Octobre 2007	24
LFT5	MEKLA	Octobre 2007	20
LFT6	MEKLA	Octobre 2007	22
LFT7	TIZI OUZOU	Octobre 2007	18
LFT8	TIZI OUZOU	Juin 2008	18
LFT9	TIZI RACHED	Juin 2008	22
LFT10	MEKLA	Juin 2008	20
LFT11	MICHELET	Avril 2009	20
LFT12	BOUDJIMAI	Avril 2009	20
LFT13	MICHELET	Mai 2009	24
LFT14	AZAZGA	Mai 2009	24
LFT15	TIGZIRT	Mai 2009	22
LFT16	TIGZIRT	Juin 2009	24
LFT17	MAKOUDA	Juin 2009	20
LFT18	MAKOUDA	Juin 2009	24
LFT19	MICHELET	Juin2009	20
LFT20	AZAZGA	Juin 2009	24

En effet certains types de lait fermenté traditionnel comme le *leben* algérien et la *Zabady* d’Egypte sont fermentés en majorité par des espèces de *Lactococcus* et de *Streptococcus*.

HARRATI (1974) a constaté que le *leben* Algérien frais est très pauvre en lactobacilles, de même que EL-BARADEI *et al* (2008) qui mentionne que *Lactococcus garvieae* et *Streptococcus thermophilus* sont les deux espèces lactiques responsables de la fermentation du *Zabady*.

L’abaissement du pH du lait au cours de la fermentation n’est pas le seul fait de l’acide lactique produit par les bactéries lactiques. En effet, d’après AXELESSON (2004), les bactéries lactiques peuvent faire adapter leur voies métaboliques plus particulièrement celle du pyruvate en fonction des conditions de culture et de produire d’autres types d’acides comme l’acide formique et l’acide acétique. Ces derniers contribuent également à faire baisser le pH du lait au cours de la fermentation.

Les valeurs du pH des différents laits fermentés traditionnels sont plus ou moins proches de celles trouvées par d’autres auteurs en analysant d’autres laits fermentés traditionnels des autres régions du monde. Ainsi le pH finale du *kurut* (lait fermenté traditionnel de chine), *kule naoto* (kenya), *Rob* (soudan), le *lben* marocain et celui de l’Afrique du sud sont de 4,17 ; 4,4 ; 4,58 ; 4,4 ; et 4,6 respectivement (ZHANG *et al.*, 2007 ; MATHARA *et al.*, 2004 ; ABDELGADIR *et al.*, 2002 ; TANTAOUI-ELARAKI *et al.*, 1983 ; BEUKES *et al.*, 2001).

Ces valeurs acides du représentent un avantage du point de vue hygiénique car il permet d’inhiber et de conférer une protection naturelle contre les espèces pathogènes.

2-2 Numération des différents groupes microbiens

2-2-1 Numération de la flore mésophile aérobie totale (FMAT)

La flore mésophile aérobie totale englobe tout les germes saprophytes qui peuvent incluent les germes pathogènes. Ils se multiplient très rapidement à l’air libre et à des températures comprises entre 20 et 40°C. Les résultats obtenus sont donnés par le tableau VI.

Les résultats d’analyse par le test statistique ANOVA à un facteur montre une différence significative entre les teneurs en flore mésophile aérobie totale des 20 laits fermentés traditionnels.

La teneur en flore mésophile aérobie totale des laits fermentés traditionnels analysés se situe entre $10,3.10^7$ UFC/ml ($8,01\text{Log}_{10}$ UFC/ml) et $313,85.10^7$ UFC/ml ($9,49 \text{Log}_{10}$ UFC/ml) avec une moyenne de $(127,98\pm 98)10^7$ UFC/ml [$(9,10\pm 0,33) \text{Log}_{10}$ UFC/ml].

L’échantillon le plus riche en flore aérobie mésophile totale est le LFT19, sa teneur atteint $313,85.10^7$ UFC/ml ($9,49\text{Log}_{10}$ UFC/ml). Ce dernier a été collecté durant le mois de mai 2009 (température en moyenne est de 35°C) ce qui explique cette forte charge microbienne.

Le lait fermenté traditionnel le moins riche est le LFT 3. Sa teneur est de $10,3.10^7$ UFC/ml ($8,01\text{Log}_{10}$ UFC/ml). Ce lait fermenté a été collecté durant le mois d’octobre 2007 où les températures n’excédaient pas généralement les 30°C.

La charge microbienne très élevée des 20 échantillons de laits fermentés traditionnels collectés pourrait s’expliquer par la méthode artisanale de fabrication de ces derniers. Ces laits ne subissent au faite aucun traitement thermique en amont ou en aval de la production.

D’après ROBINSON et TAMIME (2006) les laits fermentés traditionnels peuvent contenir toutes sortes de germes saprophytes qui peuvent provenir de l’animal lui-même, de l’équipement utilisé, de l’environnement et du personnel au cours du processus de fabrication.

De plus, NARVHUS et GADAGA (2003), souligne que les mauvaises conditions d'hygiène au cours de la fabrication des laits fermentés traditionnels provoquent de très fortes contaminations, la teneur en flore mésophile aérobie totale peut atteindre 10^9 UFC/ml du produit.

Ces teneurs élevées pourront être expliquées également par la composition qualitative et quantitative du lait cru. En effet, d'après GUIRAUD (2003) le lait constitue un milieu idéal pour la croissance et la multiplication des espèces microbiennes ne présentant pas d'exigences nutritionnelles particulières.

Nos résultats sont relativement proches de ceux obtenus par d'autres auteurs avec d'autres laits fermentés traditionnels d'autres régions du monde.

Ainsi, TANTAOUI-ELARAKI *et al* (1983) en analysant le *lben* marocain a dénombré 215.10^7 UFC/ml ($9,33\text{Log}_{10}$ UFC/ml). BEUKES *et al* (2001) a déterminé une teneur de $5,5.10^8$ UFC/ml ($8,74\text{Log}_{10}$ UFC/ml) en analysant le lait fermentés traditionnels d'Afrique du sud.

De même que les teneurs en flore mésophile aérobie totale du lait fermenté traditionnel *kule naoto* (Kenya) analysé par MATHARA *et al* (2004), *Rob* (Soudan) analysé par ABDELGADIR *et al* (2001) sont de $8,1\text{Log}_{10}$ UFC/ml et $6,05\text{Log}_{10}$ UFC/ml respectivement.

2-2-2 Numération des bactéries lactiques :

La numération des bactéries lactiques a été réalisée sur deux milieux de culture différents : MRS, milieu sélectif des *Lactobacillus* et M17, milieu sélectif des *Lactococcus*. Les résultats obtenus sont donnés par le tableau VI. Les résultats d'analyse par le test statistique ANOVA à un facteur montre une différence significative entre les teneurs en *Lactobacillus* des 20 laits fermentés traditionnels. Ce test montre également une différence significative entre les teneurs en *Lactococcus* de ces 20 laits fermentés traditionnels.

La teneur en *Lactobacillus* des laits fermentés traditionnels se situe entre $4,82.10^7$ UFC/ml ($7,68 \text{Log}_{10}$ UFC/ml) et $163,5.10^7$ UFC/ml ($9,21 \text{Log}_{10}$ UFC/ml) avec une moyenne de $(48,87 \pm 44,47)10^7$ UFC/ml [$(8,68 \pm 0,39) \text{Log}_{10}$ UFC/ml]. Cependant celle des *Lactococcus* se situe entre $53,9.10^7$ UFC/ml ($8,71 \text{Log}_{10}$ UFC/ml) et $957,7.10^7$ UFC/ml ($9,98 \text{Log}_{10}$ UFC/ml) avec une moyenne de $(498,65 \pm 305,4)10^7$ UFC/ml [$(9,69 \pm 0,39) \text{Log}_{10}$ UFC/ml].

Le lait fermenté traditionnel le plus riche en *Lactococcus* est le LFT 18, sa teneur est de $957,7.10^7$ UFC/ml ($9,98 \text{Log}_{10}$ UFC/ml), tandis que celle des *Lactobacillus* n'est que $32,5.10^7$ UFC/ml ($8,51 \text{Log}_{10}$ UFC/ml). Le lait fermenté traditionnel le plus riche en *Lactobacillus* est le LFT 2, sa teneur est de $163,5.10^7$ UFC/ml ($9,21 \text{Log}_{10}$ UFC/ml), tandis que celle des *Lactococcus* est de 800.10^7 UFC/ml ($9,90 \text{Log}_{10}$ UFC/ml).

Ces résultats montrent que les laits fermentés traditionnels analysés sont très riches en bactéries lactiques. On constate également que pour certains laits fermentés traditionnels, la teneur en bactéries lactiques est supérieure à celle de la flore mésophile aérobie totale.

Ce résultat pourrait s'expliquer par la présence initiale d'une certaine teneur en bactéries lactiques dans les laits crus et par leur capacité d'adaptation métabolique avant le début du processus de fermentation. En effet, d'après GUIRAUD (2003), le lait cru présente un certain nombre de bactéries lactiques (flore naturelle) à la traite même si toutes les conditions d'hygiène sont parfaitement respectées.

D'autre part, JUILLARD *et al* (1996) souligne que le lait cru ne constitue pas un milieu optimum pour la croissance des bactéries lactiques, connues pour leurs exigences nutritionnelles particulières, car ce dernier est très pauvre en matières azotées facilement assimilables tels que

les acides aminés libres. En effet, le lait n'apporte que 10 à 25 % de la quantité suffisante aux bactéries lactiques pour atteindre un développement maximum de 10^9 cellules/ml. D'après cet auteur, l'essentiel de la croissance des bactéries lactiques dans le lait dépend de l'utilisation des caséines du lait. Cette utilisation requiert l'intervention de la protéase de la paroi Prt qui hydrolyse spécifiquement les caséines du lait en peptides qui vont être hydrolysés à leur tour par des peptidases en acides aminés libres.

Les plus fortes teneurs en bactéries lactiques des laits fermentés traditionnels analysés s'expliqueraient par l'adaptation métabolique de ces dernières en fonction des sources d'azotes disponibles dans le lait.

Les différences de teneur en bactéries lactiques (*Lactococcus* et *Lactobacillus*) des 20 laits fermentés traditionnels pourraient s'expliquer par plusieurs facteurs comme la composition qualitative et quantitative des laits crus, les ustensiles utilisés, la durée de fermentation, les souches lactiques présentes à l'origine et probablement les conditions environnantes.

D'après, BEUKES (2001) et KURMANN (1994) les caractéristiques des laits fermentés traditionnels sont différentes d'une région à une autre mais dépendent aussi de la biochimie de la flore lactique initiale et des conditions hygiéniques au cours de la fabrication.

Nos résultats concernant les teneurs en flore lactique sont plus ou moins proches de ceux obtenus par d'autres auteurs en analysant d'autres laits fermentés traditionnels.

Ainsi, BEUKES *et al* (2001) en analysant le lait fermenté traditionnel d'Afrique du sud signale une teneur de $7,7.10^8$ UFC/ml de *Lactobacillus* et $7,05.10^7$ UFC/ml de *Lactococcus*, de même que les teneurs en *Lactobacillus* et en *Lactococcus* déterminées par ABDELGADIR *et al* (2001) en analysant le *Rob* (lait fermenté du Soudan) sont de $8,90\text{Log}_{10}$ UFC/ml et $8,84\text{Log}_{10}$ UFC/ml respectivement.

EL-BARADEI *et al* (2008) rapporte une teneur de $8,15\text{Log}_{10}$ UFC/ml de *Lactococcus* et uniquement $4,55\text{Log}_{10}$ UFC/ml de *Lactobacillus*.

La comparaison entre les teneurs en *Lactococcus* et en *Lactobacillus* des 20 laits fermentés traditionnels réalisée par le test statistique de Student montre une différence significative entre ces dernières.

En effet le nombre moyen des *Lactococcus* est de $498,64.10^7$ UFC/ml ($9,69 \text{Log}_{10}$ UFC/ml) tandis que celui des *Lactobacillus* est de $48,87.10^7$ UFC/ml ($8,68 \text{Log}_{10}$ UFC/ml).

Notre observation est similaire à celle faite par d'autres auteurs concernant d'autres types de laits fermentés traditionnels. HARRATI (1974) dénombre un nombre faible de *Lactobacillus* dans le lait fermenté traditionnel Algérien (le *leben*). TANTAOUI-ELARAKI *et al* (1983) ont également rapporté un très faible nombre de *Lactobacillus* dans le *lben* marocain de même que EL-BARADEI *et al* (2008) rapporte pour le *Zabady* une teneur de $8,15\text{Log}_{10}$ UFC/ml de *Lactococcus* et seulement $4,55\text{Log}_{10}$ UFC/ml de *Lactobacillus*.

Cette différence de teneur entre *Lactococcus* et *Lactobacillus* pourrait être expliquée par le métabolisme réalisé par les souches initiales du lait ainsi que par la durée de la fermentation.

En effet, d'après ABDELGADIR *et al* (2001) les *Lactobacillus* interviennent faiblement et tardivement dans la fermentation du lait au cours de la fabrication du lait fermenté traditionnel, de même que EL-BARADEI *et al* (2008) rapporte que le lait fermenté traditionnel d'Egypte « *Zabady* » est fermenté essentiellement par les souches de *Streptococcus* et de *Lactococcus*.

Tableau VI : Teneurs des laits fermentés traditionnels en flore mésophiles aérobie totale et en bactéries lactiques.

	LFT1	LFT2	LFT3	LFT4	LFT5	LFT6	LFT7	LFT8	LFT9	LFT10
FMAT (UFC/ml).10 ⁷	25.40	247	10.3	18.47	46.2	89	69.5	102.8	212.2	79.7
Log10 (UFC/ml)	8.40	9.39	8.01	8.26	8.66	8.94	8.84	9.01	9.32	8.90
Bactéries lactiques sur MRS (UFC/ml).10 ⁷	118.3	163.5	71	13.45	68.9	56.6	56.75	21	11.9	8.23
Log10 (UFC/ml)	9.07	9.21	8.85	8.12	8.83	8.81	8.75	8.32	8.07	7.91
Bactéries lactiques sur M17 (UFC/ml).10 ⁷	154	800	470	151	98.25	53.9	54.25	409.7	602.3	714.25
Log10 (UFC/ml)	9.18	9.90	8.67	8.18	8.99	8.71	8.73	8.61	9.77	9.85

Tableau VI : Teneurs des laits fermentés traditionnels en flore mésophiles aérobie totale et en bactéries lactiques (suite)

	LFT11	LFT12	LFT13	LFT14	LFT15	LFT16	LFT17	LFT18	LFT19	LFT20
FMAT (UFC/ml).10 ⁷	301.46	112.10	85.5	245	157.75	76.25	87.25	260.8	313.85	19.20
Log10 (UFC/ml)	9.47	9.04	8.93	9.38	9.19	8.88	9.94	9.41	9.49	8.28
Bactéries lactiques sur MRS (UFC/ml).10 ⁷	6.25	23.13	63.37	59.5	125.83	46.35	4.82	32.5	7.75	18.30
Log10 (UFC/ml)	7.79	8.36	8.80	8.77	9.09	8.66	7.68	8.51	7.88	8.26
Bactéries lactiques sur M17 (UFC/ml).10 ⁷	316.5	612.30	437.5	780.8	912.4	223.5	837.2	957.7	548.21	839.15
Log10 (UFC/ml)	9.50	9.78	9.64	9.89	9.96	9.34	9.92	9.98	9.73	9.92

2-2-3 Numération des coliformes totaux et fécaux

Les coliformes représentent un groupe de contaminants très important du lait et des produits laitiers comme les laits fermentés. Ce sont d'excellents indicateurs d'une contamination fécale ancienne ou récente.

Les coliformes totaux sont présents dans 12 échantillons de laits fermentés traditionnels analysés. Les teneurs de ces laits en coliformes totaux et fécaux sont données par le tableau N° VII. Les résultats d'analyse par le test statistique ANOVA à un facteur montre une différence significative entre les teneurs en coliformes totaux des 20 laits fermentés traditionnels.

On constate que le nombre de coliformes totaux dans les laits fermentés traditionnels varie de 7.10^2 UFC/ml ($2,84 \text{ Log}_{10}$ UFC/ml) à 1260.10^2 UFC/ml ($5,10 \text{ Log}_{10}$ UFC/ml) avec une moyenne de $(298 \pm 49,3)10^2$ UFC/ml [$(4,47 \pm 0,07) \text{ Log}_{10}$ UFC/ml].

Le LFT3 présente la teneur la plus élevée en coliformes totaux, sa teneur est de 1260.10^2 UFC/ml ($5,10 \text{ Log}_{10}$ UFC/ml) tandis que le LFT2 présente la teneur la plus faible, 7.10^2 UFC/ml ($2,84 \text{ Log}_{10}$ UFC/ml).

Cependant, les laits LFT5, LFT7, LFT8, LFT9, LFT10, LFT13, LFT16 et LFT17 ne renferment pas de coliformes totaux.

L'examen de ces résultats nous montre que la majorité des laits fermentés traditionnels analysés sont contaminés par les coliformes totaux.

Les coliformes fécaux sont présents uniquement dans quatre laits fermentés traditionnels (LFT3, LFT15, LFT19, LFT20). Leur teneur varie de $2,5.10^2$ UFC/ml ($2,39 \text{ Log}_{10}$ UFC/ml) à 46.10^2 UFC/ml ($3,66 \text{ Log}_{10}$ UFC/ml) avec une moyenne de $(18 \pm 2,03)10^2$ UFC/ml [$(2,97 \pm 0,04) \text{ Log}_{10}$ UFC/ml]. Les résultats obtenus sont donnés par le tableau VII.

Le LFT3 est le plus riche en coliforme fécaux, sa teneur est de 46.10^2 UFC/ml ($3,66 \text{ Log}_{10}$ UFC/ml) tandis que le LFT 20 présente la teneur la plus faible, $2,5.10^2$ UFC/ml ($2,39 \text{ Log}_{10}$ UFC/ml).

Les laits fermentés traditionnels LFT1, LFT2, LFT4, LFT5, LFT6, LFT7, LFT8, LFT9, LFT10, LFT11, LFT12, LFT13, LFT14, LFT16, LFT17, LFT18 ne renferment pas de coliformes fécaux.

La présence de coliformes dans les laits fermentés traditionnels analysés pourrait s'expliquer par plusieurs facteurs. D'après ROBINSON et TAMIME (2006) l'utilisation d'ustensiles non stérilisés, mauvaises conditions de fabrication, absence de traitement thermique des laits avant ou après la fermentation sont directement responsables de la contamination par les coliformes.

En effet, aucun des laits fermentés traditionnels analysés n'avait subi un traitement thermique en amont ou en aval de la fermentation.

D'après HAMAMA (1989) le nombre important des micro-organismes de contaminations fécales peut être la conséquence d'une multiplication rapide et massive de la flore fécale initialement présente dans le lait utilisé dans la préparation du produit fermenté.

La présence de coliformes dans les laits fermentés traditionnels analysés pourrait également être expliquée par le pH moins acide des ces derniers. En effet, le pH minimum de croissance d'*Escherichia coli* se situe entre 4.3 et 4.4 or la valeur du pH la plus élevée est 4.90, ce qui pourrait éventuellement expliquer la croissance des coliformes dans certains laits fermentés traditionnels.

Les laits fermentés traditionnels ne présentant pas de contamination par les coliformes sont caractérisés par des valeurs de pH un peu plus faibles. En effet la plus faible valeur de pH pour ces laits est de 4.02.

Nos résultats sont comparables à ceux obtenus par MATHARA *et al* (2004) en effet cet auteur a constaté que la présence d'entérobactéries dans les laits fermentés traditionnels est proportionnelle aux pH des laits, il note une absence totale de coliformes dans les laits qui ont un $\text{pH} < 4.5$.

La présence de coliformes fécaux dans les laits fermentés traditionnels LFT3, LFT15 LFT19 et LFT20 témoigne d'une contamination fécale récente. Leur présence d'après MARSHALL (1987) dans un lait fermenté traduit de mauvaises conditions d'hygiène au cours de la préparation et de la conservation.

Le LFT 5 et 7 ne présentent pas de teneur en coliformes totaux et fécaux malgré que leur pH soit de 4.48 et 4.72 respectivement. Ceci pourrait s'expliquer soit par un bon respect des conditions d'hygiène au cours de la préparation soit par leur inhibition par certaines substances produites par les bactéries lactiques telles que les bactériocines, le peroxyde d'hydrogène ou bien par les systèmes inhibiteurs présents naturellement dans le lait tels que le lysozyme ou le système lactoperoxydase.

Nos résultats sont assez comparables à ceux obtenus par d'autres auteurs avec d'autres laits fermentés traditionnels.

La teneur en Entérobactéries du lait fermenté traditionnel *Kule naoto* (Kenya) déterminée par MATHARA *et al* (2004) se situe entre 4.9Log_{10} et 9.4Log_{10} . Celle du *Iben* marocain déterminée par TANTAOUI-ELARAKI *et al* (1983) se situe entre 43.10^3 UFC/ml et 85.10^3 UFC/ml avec une moyenne de 50.10^3 UFC/ml.

De même que la teneur en coliformes totaux du lait fermenté traditionnel d'Afrique du sud déterminée par BEUKES *et al.*, (2001) se situe entre $1,5.10^6$ UFC/ml et $3,2.10^6$ UFC/ml tandis que celle des coliformes fécaux est de 4.10^3 , et 7.10^3 UFC/ml respectivement. L'absence de coliformes dans les huit laits fermentés traditionnels analysés pourrait être due à l'acidité qui représente un moyen de conservation à courte durée de ces laits produits fermenté traditionnels.

2-2-4 Numération des levures et moisissures

Les levures et les moisissures représentent un autre groupe de contamination du lait et des produits laitier tels que les laits fermentés traditionnels. Les teneurs en levures et moisissures sont données par le tableau VII. Les résultats d'analyse par le test statistique ANOVA à un facteur montre une différence significative entre les teneurs en levures et moisissures des 20 laits fermentés traditionnels.

Les levures et les moisissures sont présentes dans tous les laits fermentés traditionnels analysés. Leur taux se situe entre $11,6.10^7$ UFC/ml ($8,06 \text{Log}_{10}$ UFC/ml) et 225.10^7 UFC/ml ($9,35 \text{Log}_{10}$ UFC/ml) avec une moyenne de $(103,66 \pm 59,6)10^7$ UFC/ml [$(9,01 \pm 0,24) \text{Log}_{10}$ UFC/ml]. Le LFT18 présente la teneur la plus élevée en levures et moisissures, cette dernière est de 225.10^7 UFC/ml ($9,35 \text{Log}_{10}$ UFC/ml). Tandis que la teneur la plus faible est celle du LFT 1 qui est de $11,6.10^7$ UFC/ml ($8,06 \text{Log}_{10}$ UFC/ml).

D'après ces résultats, on constate que les laits fermentés traditionnels analysés sont très riches en levures et moisissures. Leur présence est due essentiellement à des accidents de fabrication et à diverses contaminations de ces derniers.

Tableau VII : Teneurs des laits fermentés traditionnels en coliformes totaux et fécaux et en levures et moisissures.

	LFT1	LFT2	LFT3	LFT4	LFT5	LFT6	LFT7	LFT8	LFT9	LFT10
Coliformes totaux (UFC/ml).10 ²	12	7	1260	780	0	1235	0	0	0	0
Log10 (UFC/ml)	3.07	2.84	5.10	4.90	0	5.09	0	0	0	0
Coliformes fécaux (UFC/ml).10 ²	0	0	46	0	0	0	0	0	0	0
Log10 (UFC/ml)	0	0	3.66	0	0	0	0	0	0	0
Levures et moisissures (UFC/ml).10 ⁷	11.6	193.6	23.3	30.75	93	123	95.7	97.15	129.3	19.25
Log10 (UFC/ml)	8.06	9.28	8.36	8.48	8.96	9.08	9.98	8.99	9.11	8.23
pH	4.60	4.80	4.76	4.51	4.48	4.90	4.72	4.14	4.29	4.31

Tableau N VII : Teneurs des laits fermentés traditionnels en coliformes totaux et fécaux et en levures et moisissures (suite)

	LFT11	LFT12	LFT13	LFT14	LFT15	LFT16	LFT17	LFT18	LFT19	LFT20
Coliformes totaux (UFC/ml).10 ²	9	13	0	120	19	0	0	35	74	16.3
Log10 (UFC/ml)	2.95	3.11	0	4.07	3.27	0	0	3.54	3.86	3.21
Coliformes fécaux (UFC/ml).10 ²	0	0	0	0	3.5	0	0	0	20	2.5
Log10 (UFC/ml)	0	0	0	0	2.54	0	0	0	3.30	2.39
Levures et moisissures (UFC/ml).10 ⁷	69.7	133.7	201.9	79.1	157	96.2	85	225.7	117	91.5
Log10 (UFC/ml)	8.84	9.12	9.30	8.90	9.19	8.98	8.92	9.35	9.06	8.96
pH	4.51	4.70	4.12	4.89	4.61	4.17	4.02	4.53	4.69	4.81

En effet, d'après FLEET (1990) la contamination des laits fermentés traditionnels par les levures et moisissures est due principalement aux contaminations par l'environnement, le matériel, l'équipement utilisé et le personnel lui-même.

D'après ROBINSON et TAMIME (2006) l'origine de ces contaminations est principalement le mode de fabrication qui est toujours primitif. En effet, nos laits fermentés traditionnels sont tous préparés suivant un mode primitif (absence de traitement thermique du lait ni en amont ni en aval de la transformation, très mauvaises conditions d'hygiène, etc...).

Les teneurs élevées en levures et moisissures pourraient s'expliquer par le fait que ces micro-organismes tolèrent bien l'acidité et ne présentent pas d'exigences nutritionnelles particulières comparativement aux bactéries lactiques.

Selon ROOSTITA et FLEET (1996) les levures et les moisissures croissent parfaitement dans le lait grâce à leur capacité à tolérer des pH acides, une faible activité de l'eau et également leur capacité à utiliser les constituants du lait comme les protéines, l'acide lactique et le citrate.

De plus, d'après NARVHUS et GADAGA (2003) beaucoup de souches de levures peuvent assimiler le galactose et le lactate issus du métabolisme de bactéries lactiques.

Nos résultats sont assez comparables à ceux obtenus par d'autres auteurs avec d'autres types de laits fermentés traditionnels.

La teneur en levures du lait fermenté traditionnel *Rob* (soudan) déterminée par ABDELGADIR *et al* (2001) se situe entre 7,19Log₁₀ et 7,64Log₁₀. Celle du *Amasi*, lait fermenté traditionnel du Zimbabwe rapportée par GADAGA *et al* (2001) se situe entre 2Log₁₀ et 8,08Log₁₀.

MATHARA *et al* (2004) rapportent également une teneur de 5,9Log₁₀ pour le lait fermenté traditionnel du Kenya, *Kule naoto* tandis que TANTAOUI-ELARAKI *et al* (1983) rapportent une teneur de 10,2.10² UFC/ml pour le *lben* marocain.

Les levures et les moisissures ainsi que les bactéries lactiques représentent les flores majoritaires des laits fermentés traditionnels analysés. Ces teneurs élevées pourraient supposer une éventuelle interaction positive entre ces deux groupes de micro-organismes.

En effet, d'après GADAGA et NARVHUS (2003) des interactions positives ou négatives peuvent se développer entre les levures et les bactéries lactiques au cours du processus de fermentation du lait.

De plus, GADAGA *et al* (2001) ont constaté que la croissance de certaines souches de *Lactobacillus* et de *Lactococcus* en co-culture avec cinq souches de levure dans le lait est meilleure. De même que la croissance de deux souches de *Lactococcus* en présence de *Candida kefir* 23 était meilleure sur le lait.

D'après NARVHUS et GADAGA (2003), l'interaction est de nature métabolique, les levures protéolytiques fournissent des acides aminés libres tels que la leucine, phénylalanine, lysine, arginine, glutamate et certains facteurs de croissance aux bactéries lactiques. Ces dernières quant à elles fournissent aux levures du CO₂, du lactate et du galactose, sucre facilement assimilables pour les souches Lac-.

La présence de levures et de moisissures en symbiose avec les bactéries lactiques dans les laits fermentés traditionnels est indispensable. En effet, d'après GUIRAUD et GALZY (1980) elles contribuent à déterminer les qualités organoleptiques spécifiques du produit telles la saveur, l'odeur et le goût.

2-2-5 Recherche de *Staphylococcus aureus* et des Salmonelles

Les germes pathogènes tels que *Staphylococcus aureus* et les Salmonelles sont parmi les germes le plus redoutables dans les produits alimentaires. Leur présence provoque une nette détérioration de la qualité sanitaire du produit et induit des risques majeurs pour le consommateur.

Les résultats de la recherche de *Staphylococcus aureus* et de Salmonelles sont représentés dans le tableau N°VIII. Ces derniers nous indiquent l'absence totale de Salmonelle dans tout les laits fermentés traditionnels analysés mais une présence de *Staphylococcus aureus* dans certain d'entre eux.

La présence de *Staphylococcus aureus* dans certains échantillons analysés pourrait s'expliquer par les conditions d'hygiène très médiocres et par le fait que le lait de départ constitue un milieu très favorable pour leur croissance et leur multiplication du fait que les Staphylocoques ne présentent pas d'exigences nutritionnelles particulières.

De plus, d'après GUIRRAUD (2003), *Staphylococcus aureus* présente une bonne capacité de développement dans différentes conditions de température et de pH.

Leur croissance pourrait également être expliquée par les valeurs de pH moins acides de ces laits fermentés traditionnels.

En effet, les laits fermentés traditionnel LFT1, LFT4, LFT5, LFT7, LFT10, LFT12, LFT14, LFT15, LFT18, LFT19 et LFT20 sont contaminés par *Staphylococcus aureus* et leur pH se situe entre 4,31 et 4,89.

D'après DACOSTA (2000), le pH minimum de croissance de *Staphylococcus aureus* est 4,3. Les valeurs du pH de ces laits fermentés traditionnels pourraient donc être favorables à la croissance et à la multiplication de *Staphylococcus aureus*.

L'absence de *Staphylococcus aureus* dans les autres laits fermentés traditionnels pourrait être expliquée par les valeurs du pH un peu plus acide.

Les laits fermentés traditionnels LFT8, LFT9, LFT16, LFT17, ne présentent pas de contamination par *Staphylococcus aureus*. Leur pH se situe entre une valeur minimale de 4,02 pour le LFT 17 et une valeur maximale de 4,29 pour le LFT 9. Ces valeurs de pH sont au dessous de la valeur du pH minimum de croissance de *Staphylococcus aureus*.

D'après DACOSTA (2000), les micro-organismes pathogènes cessent de croître et meurent éventuellement en dessous de leur pH minimum de croissance.

L'absence de *Staphylococcus aureus* dans les laits fermentés traditionnels LFT 2 LFT3, LFT6 et LFT11 pour lequel le pH est supérieur à 4,3 pourrait aussi être expliquée soit par une absence de contamination soit par une contamination suivie d'une inhibition de la croissance éventuellement par certains produits métaboliques des bactéries lactiques tels que les bactériocines ou le peroxyde d'hydrogène.

Nos résultats sont comparables à ceux rapportés par d'autres auteurs avec d'autres laits fermentés traditionnels. En effet, EL-BARADEI *et al* (2008) rapportent une teneur de 2Log_{10} de *Staphylococcus aureus* dans le lait fermenté traditionnel d'Egypte « ZABADY ». BEUKES (2001) signale également la présence de *Staphylococcus aureus* dans les laits fermentés traditionnels d'Afrique du sud.

De même que HAMAMA (1989) a mentionné une teneur de 70.10^3 UFC/ml de *Staphylococcus aureus* dans le fromage frais marocain, un produit laitier fermenté traditionnel.

Tableau VIII : Résultats de la recherche de *Staphylococcus aureus* et des Salmonelles dans les laits fermentés traditionnels.

Echantillons	<i>Staphylococcus aureus</i>	Salmonelles
LFT01	+	-
LFT02	-	-
LFT03	-	-
LFT04	+	-
LFT05	+	-
LFT06	-	-
LFT07	+	-
LFT08	-	-
LFT09	-	-
LFT10	+	-
LFT11	-	-
LFT12	+	-
LFT13	-	-
LFT14	+	-
LFT15	+	-
LFT16	-	-
LFT17	-	-
LFT18	+	-
LFT19	+	-
LFT20	+	-

Les Salmonelles sont absentes dans tous les échantillons analysés, ceci pourrait s'expliquer par les faibles valeurs du pH de ces derniers.

En effet, d'après DACOSTA (2000) et KHELEF *et al* (2006) le pH minimum de croissance et de multiplication des Salmonelles se situe autour de 4,5.

Cette absence pourrait être également expliquée par l'inhibition de leur croissance au cours du processus de fermentation par certaines substances à activité antimicrobienne des bactéries lactiques telles que les bactériocines ou le peroxyde d'hydrogène. D'autres facteurs peuvent également provoquer l'inhibition de ces bactéries Gram négatif, le système lactoperoxydase qui génère l'ion OSCN⁻ à partir du H₂O₂ et du thiocyanate. L'ion OSCN⁻ est un oxydant très sélectif et puissant, il endommage avec efficacité la paroi des bactéries Gram négatif en limitant par conséquent leur croissance et leur multiplication dans le lait.

Les résultats présentés dans cette étude sur la flore de contamination (coliforme totaux et fécaux, levures et moisissure ainsi que les germes pathogènes) montrent que les laits fermentés traditionnels analysés sont de mauvaise qualité microbiologique. Pour cela une utilisation d'un lait cru de très bonne qualité microbiologique (bonne hygiène de traite, traitement thermique et une réfrigération rapide et adéquate du lait après sa production jusqu'à sa transformation) dans la fabrication de ces laits fermentés traditionnels reste d'une grande importance.

2-3 Isolement et screening d'isolats de *Lactococcus* producteurs de bactériocines

2-3-1 Isolement

Au cours de notre étude, nous avons isolé, purifié et conservé 65 isolats lactiques appartenant préemptivement au genre *Lactococcus* à partir de 20 échantillons de lait fermenté traditionnel.

Nous avons utilisé deux méthodes d'isolement dans le souci d'avoir un maximum de souches différentes, la méthode d'ensemencement en surface et la méthode d'ensemencement en masse ou en profondeur.

L'isolement a été également réalisé sur le milieu ELLIKER + Actidione car ce dernier d'après LARPENT et LARPENT (1997) est très adapté pour la recherche et l'isolement des espèces du genre *Lactococcus* à partir du lait et des produits laitiers.

53 souches sont isolées en surface tandis que 12 sont isolées en profondeur. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que les espèces du genre *Lactococcus* tolèrent mieux la présence de l'oxygène comparativement aux autres espèces lactiques.

D'après DESMAZEAUD (1983), les espèces du genre *Lactococcus* se protègent mieux contre l'oxygène grâce à la superoxyde dismutase à manganèse qui est absente chez les *Lactobacillus* par exemple. Tous les isolats sont des cocci Gram positif, catalase négative, oxydase négative, peuvent croître à 10°C mais pas à 45°C et homofermentaires. Les principales caractéristiques des 65 isolats isolés à partir des 20 laits fermentés traditionnels sont données dans le tableau N°IX.

On constate d'après nos résultats une grande variabilité morphologique des colonies des différents isolats. Cette variabilité atteste de la variabilité des souches ayant donné naissance à ces colonies.

On constate également que pour certains isolats lactiques, l'aspect des colonies change au 2^{ème} isolement. Ceci pourrait s'expliquer par une (des) variation(s) de conditions d'environnement dans lequel évoluent ces cellules avant leur mise en culture sur milieu solide.

En effet, les colonies caractéristiques du premier isolement sont nées à partir des cellules repiquées directement à partir des laits fermentés traditionnels (présence d'un stress acide) tandis que les colonies caractéristiques du deuxième isolement sont nées à partir de cellules repiquées à partir du bouillon ELLIKER (environnement optimum pour la croissance des *Lactococcus*) et incubées dans de conditions optimales de croissance.

Sachant que les laits fermentés traditionnels ont des pH acides, les bactéries lactiques pourraient souffrir du stress causé par l'acidité du milieu.

D'après HARTCK *et al* (1996) des modifications morphologiques, physiologiques et métaboliques sont induites chez les souches de *Lactococcus* exposées au stress acide. Le catabolisme protéique est le plus touché, la synthèse de beaucoup de protéines est réprimée comparativement aux bactéries évoluant dans un environnement normal. Ces changements physiologiques provoqués par l'adaptation au stress acide pourraient induire des changements morphologiques des cellules et par conséquent l'aspect des colonies issues de ces dernières.

2-3-2 Screening d'isolats de *Lactococcus* producteurs de bactériocines

Au cours de notre étude de screening, nous avons utilisé deux variantes de la méthode indirecte de détection de souches lactiques productrices de bactériocines : la méthode double couche et la méthode diffusion en puits. Nous avons choisi cette méthode indirecte car d'après TAGG *et al* (1976) elle offre plus de sensibilité dans la détection de souches Bac+ que la méthode directe.

Nous avons également utilisé une souche sensible aux bactériocines : *Listeria innocua* F, cette souche nous a été procurée par l'école Agro-alimentaire de NANTE (INITIA), France. Cette souche est Gram +, catalase + et l'aspect microscopique montre de petits bacilles. La densité optique utilisée est 0,08 à 625nm et elle correspond à une concentration de 10^8 UFC/ml. Le milieu utilisé pour l'ensemencement en surface des isolats lactiques est le M17 car ce dernier contient dans sa composition un agent tampon du pH : le β -glycérophosphate de sodium.

2-3-2-1 Méthode double couche :

Au cours de la réalisation du screening par la méthode double couche, nous avons effectué l'incubation en anaérobiose des isolats lactiques ensemencés en surface sur M17 et ceci pour éviter toute possibilité de formation du peroxyde d'hydrogène.

Sur les 65 isolats lactiques testés par la méthode double couche, deux isolats, LFT26 et LFT61 ont présentés des inhibitions de *Listeria innocua* F. Les zones d'inhibition sont claires et uniformes. Leurs diamètres sont de $8 \pm 0,15$ mm pour l'isolat LFT26 et $6 \pm 0,21$ mm pour l'isolat LFT61. Les zones d'inhibition sont représentées au niveau des photos de la figure 17 pour l'isolat LFT26 et la figure 18 pour l'isolat LFT61.

Les souches lactiques au cours de leur évolution ont développées un pouvoir inhibiteur sur beaucoup d'autres souches du monde microbien. Cette inhibition est due à la sécrétion par ces dernières de substances inhibitrices telles que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène ou les bactériocines qui leurs confèrent un avantage sélectif considérable dans un écosystème microbien. Les inhibitions observées contre *Listeria innocua* F pourraient être dues aux bactériocines car l'effet du pH et du peroxyde d'hydrogène ont été éliminés. L'effet du pH est neutralisé par le β -glycérophosphate de sodium et l'effet du peroxyde d'hydrogène est également supprimé par l'incubation en anaérobiose des isolats lactiques.

Tableau IX : Principales caractéristiques des isolats isolés à partir des 20 laits fermentés traditionnels.

N° isolat et du LFT	Aspect de la colonie au 1 ^{er} isolement	Aspect de la colonie au 2 ^{ème} isolement	Gram et morphologie	Catalase	Oxydase
01 (1)	Très petites, rondes, blanches laiteuses, contour régulier	Petites, blanches laiteuses, rondes, contour régulier.	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments	-	-
02 (1)	Très petites, rondes, blanches laiteuses, contours régulier	Petites, blanches laiteuses, rondes contour régulier,.	+ coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 4 éléments	-	-
03 (1)	Très petites, lenticulaires ,blanches laiteuses, contour régulier	Petites, blanches laiteuses, rondes, contour régulier.	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments.	-	-
04 (1)	Très petites, blanches laiteuses, rondes, contour régulier.	Moyennes, opaques à contour translucide	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments.	-	-
05 (1)	Très petites, blanches laiteuses, convexes, contour régulier.	Moyennes, opaques à contour translucide, convexes	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments.	-	-
06 (2)	Très petites, plates, blanches laiteuses, rondes	moyennes, plates, blanches laiteuses, rondes	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments.	-	-
07 (2)	Très petites, lenticulaires, blanches laiteuses, contour régulier	Petites, blanches laiteuses, rondes, contour régulier	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments.	-	-
08 (2)	Très petites, rondes, blanches laiteuses, contour régulier	Petites, blanches laiteuses, rondes, contour régulier	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments.	-	-
09 (2)	Moyennes, blanches laiteuses, rondes contour régulier	Moyennes, blanches laiteuses, rondes convexes, contour régulier	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments.	-	-
10 (2)	Moyennes, blanches laiteuses, rondes contour régulier	Moyennes, blanches laiteuses, rondes convexes, contour régulier	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments.	-	-

Tableau IX : Principales caractéristiques des isolats isolés à partir des 20 laits fermentés traditionnels (suite)

N° isolat et du LFT	Aspect de la colonie au 1 ^{er} isolement	Aspect de la colonie au 2 ^{ème} isolement	Gram et morphologie	Catalase	Oxydase
11 (3)	Grandes, blanches laiteuses, rondes, contour régulier	Grandes, blanches laiteuses, rondes, contour régulier	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments.	-	-
12 (3)	Grandes, blanches laiteuses, rondes, contour régulier	Grandes, blanches laiteuses, rondes, contour régulier	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 4 éléments.	-	-
13 (3)	Très petites, lenticulaires, blanches laiteuses,, contour régulier	Petites , blanches laiteuses, convexes, rondes, contour régulier	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments.	-	-
14 (4)	Moyennes, blanches laiteuses, rondes contour régulier.	Moyennes, blanches laiteuses, rondes contour régulier.	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments.	-	-
15 (4)	Très petites, lenticulaires, blanches, contour régulier.	Petites, blanches laiteuses, rondes, bombées, contour régulier	+ , coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments	-	-
16 (4)	Petites, blanches laiteuses, rondes bombées, contour régulier	Moyenne, blanches laiteuses, rondes bombées, contour régulier	+ coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments	-	-
17 (4)	Petites, blanches laiteuses, rondes bombées, contour régulier	Moyenne, blanches laiteuses, rondes bombées, contour régulier	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments.	-	-
18 (5)	Grandes, blanches laiteuses, convexes, rondes, contour régulier	Grandes, blanches laiteuses, rondes contour régulier	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments.	-	-
19 (5)	Très petites, lenticulaires, blanches, contour régulier	Petites, blanches laiteuses, rondes contour régulier	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments.	-	-
20 (5)	Très petites, lenticulaires, blanches, contour régulier	Petites, blanches laiteuses, rondes contour régulier	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments.	-	-

Tableau IX : Principales caractéristiques des isolats isolés à partir des 20 laits fermentés traditionnels (suite).

N° isolat et du LFT	Aspect de la colonie au 1 ^{er} isolement	Aspect de la colonie au 2 ^{ème} isolement	Gram et morphologie	Catalase	Oxydase
21 (5)	Petites, opaques à contour translucide, rondes	Moyennes, blanche laiteuses, rondes à contour régulier	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 4 éléments.	-	-
22 (6)	Moyennes, blanches laiteuses, rondes contour régulier	Moyennes, blanches laiteuses, rondes convexes, contour régulier	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments.	-	-
23 (6)	Moyennes, blanches laiteuses, rondes contour régulier	Moyennes, blanches laiteuses, rondes convexes ,contour régulier	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments.	-	-
24 (6)	Petites, crèmes, rondes contour régulier	Petites, crèmes, rondes bombées, contour régulier	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments.	-	-
25 (6)	Très petites, lenticulaires, blanches, contour régulier	Petites, blanches laiteuses, rondes bombées, contour régulier	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments.	-	-
26 (7)	Grandes, blanches laiteuses, rondes, convexes, contour régulier	Grandes, blanches laiteuses, rondes convexes, contour régulier	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 4 éléments	-	-
28 (7)	Très petites, rondes, blanches laiteuses, contour régulier	Moyennes , blanches laiteuses, rondes, bombées, contour régulier	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments	-	-
29 (7)	Très petites, rondes, blanches laiteuses, contour régulier	Petites, blanches laiteuse, rondes, contour régulier	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments	-	-
30 (7)	Petites, crèmes, rondes contour régulier	Moyennes, crème, rondes, contour régulier	+ , coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments	-	-
31 (8)	Petites, lenticulaires, blanche, contour régulier	Petite, rondes, blanches laiteuses, contour régulier.	+ coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments	-	-

Tableau IX : Principales caractéristiques des isolats isolés à partir des 20 laits fermentés traditionnels (suite)

N° isolat et du LFT	Aspect de la colonie au 1 ^{er} isolement	Aspect de la colonie au 2 ^{ème} isolement	Gram et morphologie des cellules	Catalase	Oxydase
32 (8)	Petites, lenticulaires, blanche, contour régulier	Petite, rondes, bombées, blanches laiteuses, contour régulier	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à élément.	-	-
33 (8)	Grandes, blanches laiteuses, ronde, convexes, contour régulier	Grandes, blanches laiteuses, rondes contour régulier	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments.	-	-
34 (8)	Grandes, blanches laiteuses, ronde, convexes, contour régulier	Grandes, blanches laiteuses, rondes contour régulier	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments.	-	-
35 (9)	Très petites, blanches, rondes, contour régulier	Moyennes, blanches, rondes bombées, contour régulier	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments.	-	-
36 (9)	Petites, blanches laiteuses, contour régulier, rondes,.	Petites, blanches laiteuses, rondes bombées, contour régulier	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments.	-	-
37 (9)	Très petites, blanches, rondes, contour régulier	Moyennes, blanches, rondes, contour régulier	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 4 éléments.	-	-
38 (9)	Très petites, plates contour régulier, blanches	Petites, plates, blanches laiteuses, contour régulier	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments.	-	-
39 (10)	Grandes, blanches laiteuses, rondes, contour régulier	Grandes, blanches laiteuses, rondes bombées, contour réguliers	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 4 éléments	-	-
40 (10)	Très petites, lenticulaires, blanches contour régulier	Petites, blanches, rondes, contour régulier	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments.	-	-
41 (10)	Moyennes, blanches laiteuses, rondes contour régulier	Moyenne, blanches laiteuses, ronde, bombées, contour régulier	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments	-	-

Tableau IX : Principales caractéristiques des isolats isolés à partir des 20 laits fermentés traditionnels (suite).

N° isolat et du LFT	Aspect de la colonie au 1 ^{er} isolement	Aspect de la colonie au 2 ^{ème} isolement	Gram et morphologie des cellules	Catalase	Oxydase
42 (11)	Petite, crème, rondes, contour régulier	Moyennes, crèmes, rondes, contour régulier	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments	-	-
43 (11)	Très petites, blanches laiteuses, rondes, convexes, contour régulier	Petites, blanches laiteuses, rondes, convexes, contour régulier.	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments	-	-
44 (11)	Très petites, translucides, rondes, contour régulier	Petites, translucides, rondes bombées, contour régulier	+ , coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 4 éléments	-	-
45 (12)	Moyennes, blanches laiteuses, rondes, contour régulier	Moyennes, blanches laiteuses, rondes, bombées, contour régulier	+ coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments	-	-
46 (12)	Grandes, blanches laiteuses, rondes, contour régulier	Grandes, blanche laiteuses, rondes, contour régulier	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments.	-	-
47 (12)	Très petites, crème, rondes, contour régulier	Moyennes, crèmes, ronde, contour régulier	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments.	-	-
48 (13)	Petite, blanches laiteuses, rondes, convexes, contours régulier	Petite, blanches laiteuses, rondes bombées, contour régulier	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments.	-	-
49 (13)	Moyennes, blanches laiteuses, rondes, contour régulier	Moyennes, blanches laiteuses, rondes, bombées, contour régulier	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 4 éléments.	-	-
50 (14)	Petite, blanches laiteuses, plates, contour régulier	Moyennes, plates, blanches laiteuses, contours régulier	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments.	-	-
51 (14)	Petite, blanches laiteuses, plates, contour régulier	Moyennes, plates, blanches laiteuses, contour régulier	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments.	-	-

Tableau IX : Principales caractéristiques des isolats isolés à partir des 20 laits fermentés traditionnels (suite).

N° isolat et du LFT	Aspect de la colonie au 1 ^{er} isolement	Aspect de la colonie au 2 ^{ème} isolement	Gram et morphologie des cellules	Catalase	Oxydase
52 (14)	Grandes, crèmes, rondes, contour régulier	Grandes, crèmes, rondes bombées, contour régulier	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments.	-	-
53 (15)	Très petites, lenticulaires, blanche, contour régulier	Petite, rondes, blanches laiteuses, contour régulier	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments.	-	-
54 (15)	Très petite, blanches laiteuses, rondes, contour irrégulier	Petites, blanches laiteuses, rondes, bombées, contour régulier	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments.	-	-
55 (16)	Petite, lenticulaires, blanches, contour régulier	Moyenne, blanches laiteuses, rondes, contour régulier	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 4 éléments	-	-
56 (16)	moyennes, blanches laiteuses, rondes, contour régulier	Grandes, blanches laiteuses, rondes bombées, contour régulier	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments	-	-
57 (17)	Moyennes, crème, rondes, contour régulier	Grandes, crèmes, rondes bombée, contour régulier	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments	-	-
58 (18)	Très petites, Lenticulaires, blanches, contour régulier	Moyennes, blanches laiteuses, rondes, contour régulier	+ , coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 4 éléments	-	-
59 (18)	Moyennes, blanches, plates, contour régulier	Moyenne, blanches laiteuses, plates, contour régulier	+ coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments	-	-
60 (18)	Petite, blanche laiteuses, rondes, convexes, contour régulier	Moyennes, blanches laiteuses, rondes, convexes, contour régulier	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments.	-	-
61 (19)	Très petites, lenticulaires, blanches, contour régulier	Petites, blanches, rondes, contour régulier	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments.	-	-

Tableau IX : Principales caractéristiques des isolats isolés à partir des 20 laits fermentés traditionnels (suite).

N° isolat et du LFT	Aspect de la colonie au 1 ^{er} isolement	Aspect de la colonie au 2 ^{ème} isolement	Gram et morphologie des cellules	Catalase	Oxydase
62 (19)	petites, blanches laiteuses, rondes, contour régulier	Moyennes, blanches laiteuses, rondes, contour régulier	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 4 éléments.	-	-
63 (19)	Grandes, blanches laiteuses, rondes, contour régulier	Grandes, blanches laiteuses, rondes, bombées, contour régulier	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments.	-	-
64 (20)	Petites, lenticulaires, blanches, contour régulier	Petites, blanches, ronde, contour régulier	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 5 éléments.	-	-
65 (20)	Moyennes, blanches laiteuses, rondes, contour régulier	Moyennes, blanches laiteuses foncées au centre, rondes, contour régulier	+, coccis, diplocoques, chainettes de 3 à 4 éléments.	-	-

Cependant, les zones d'inhibition observées sont de faible diamètre, ceci pourrait s'expliquer par le fait que la concentration des substances inhibitrices est très faible autour de la colonie de l'isolat producteur et/ou par la composition du milieu dans lequel diffuse la substance inhibitrice.

En effet, d'après HOOVER *et al* (1989) le β -glycérophosphate de sodium inclus dans la composition du milieu M17 interfère négativement avec la diffusion des bactériocines. La diffusion de la bactériocine produite par *Pedococcus acidilactici* PO2 est fortement influencée par cet agent tampon.

Des cas d'inhibition par les bactéries du genre *Lactococcus* contre des espèces du genre *Listeria* ont été observées par plusieurs auteurs en utilisant la méthode double couche. GONZALEZ *et al* (2007) ont détecté six souches de *Lactococcus* isolées et cultivées sur M17 à partir du fromage traditionnel d'Espagne et qui présentent une activité inhibitrice contre *Listeria monocytogenes* CECT4031.

BENKERROUM *et al* (2000) ont détecté neuf souches de *Lactococcus lactis* isolées et cultivées sur M17 à partir du fromage traditionnel du Maroc « *jben* » et qui présentent des aptitudes d'inhibition contre *Listeria monocytogenes* ATCC7644.

De même que ELTOMANI *et al* (2002) ont isolé sur MRS quatre souches de *Lactococcus lactis* (R9/1, R9/2, R10/1 et R35) à partir du lait fermenté traditionnel du Maroc « *Raib* » et qui présentent également des propriétés inhibitrices contre *Listeria monocytogenes* LMAB 4d.

L'utilisation de cette méthode pour le screening de souches lactiques productrices de bactériocine a l'avantage d'être très simple sur le plan pratique. Cependant, les résultats de cette dernière doivent être impérativement vérifiés par la méthode de diffusion en puits, car d'après LEWUS *et al* (1991) beaucoup de souches qui s'avèrent positives avec la méthode double couche sont négatives en utilisant la méthode de diffusion en puits.

2-3-2-2 Méthode de diffusion en puits

Au cours de cette méthode, les surnageants des isolats lactiques à tester sont préparés puis ajustés à pH 7 avec du NaOH 1N.

Nous avons testés 65 isolats lactiques et les résultats obtenus montrent que 63 isolats ne présentent aucune zone d'inhibition tandis que deux isolats lactiques LFT26 et LFT61 ont continué à montrer des zones d'inhibition contre *Listeria innocua* F.

Les zones d'inhibition obtenues avec cette méthode sont supérieures à celles observées en utilisant la méthode double couche. Ces dernières sont de $14,5 \pm 0,85$ mm et $13,75 \pm 0,16$ mm pour les isolats LFT61 et LFT26 respectivement. Les zones d'inhibition sont représentées par les photos les figures 19 et 20.

Cette observation pourrait s'expliquer par le fait que la concentration des substances inhibitrices est supérieure comparativement à la méthode double couche car la croissance des isolats en milieu liquide est meilleure qu'en milieu solide.



Figure 17 : Photo montrant l'inhibition de *Listeria innocua* F par l'isolat lactique LFT 26 par la méthode double couche.



Figure 18 : Photo montrant l'inhibition de *Listeria innocua* F par l'isolat lactique LFT 61 par la méthode double couche.

On pourrait également expliquer cette différence de diamètre des zones d'inhibition par la concentration de *Listeria innocua* F. En effet, dans la méthode double couche la concentration est approximativement de 10^6 cellules/ml tandis que celle utilisée dans la méthode diffusion en puits n'est que de 10^5 cellule/ml.

D'après BENKERROUM *et al* (1993) la méthode diffusion en puits est préférable et plus recommandée que la méthode double couche car elle offre plus de sensibilité au cours du screening des souches lactique Bac+.

On constate également que la nisine utilisée comme témoin positif est active contre *Listeria innocua* F, en effet certains auteurs comme BENKERROUM *et al* (2000) ont rapporté que les souches du genre *Listeria* sont sensibles à la nisine.

Le milieu ELLIKER pH 7 ne provoque pas d'inhibition de *Listeria innocua* F ceci suppose que les constituants (peptides, sucres...etc.) du milieu ELLIKER pH 7 ne présente pas d'activité inhibitrice contre *Listeria innocua* F.

D'après ces observations, on pourrait dire que les substances inhibitrices de *Listeria innocua* F sont issues du métabolisme des isolats lactiques cultivés sur le milieu ELLIKER. L'ajustement du pH et l'incubation en anaérobiose des isolats LFT26 et LFT61 nous permettent de dire que l'inhibition n'est dû ni au pH ni au peroxyde d'hydrogène. Ces agents inhibiteurs pourraient être des bactériocines.

2-3-3 Elimination de l'effet des bactériocines

Les bactériocines sont connues pour être des peptides ou des protéines plus ou moins sensibles à la chaleur, cependant un traitement thermique de 30 min à 121°C permet de détruire complètement la protéine ou le peptide. Ce test nous a permis également de voir l'effet du pH acide sur *Listeria innocua* F.

Les surnageant non neutralisés des deux isolats lactiques ont subis l'action du traitement thermique de 121°C durant 30 min et les résultats montrent aucune inhibition contre *Listeria innocua* F tandis que les surnageants non neutralisés et non traités thermiquement continuent à montrer une inhibition. Les diamètres d'inhibition sont de $12,35 \pm 0,85$ mm pour l'isolat LFT 26 et $13,89 \pm 0,45$ mm. Ceci pourrait nous conduire à penser que les substances inhibitrices des isolats LFT26 et LFT61 pourrait être de nature protéique. Les résultats sont montrés par les figures 21 et 22.

La nisine est également sensible à ce traitement thermique, son activité disparaît totalement. Le pH acide des surnageant qui est de 4,22 pour l'isolat LFT26 ET 4,31 pour l'isolat LFT61 ne provoque pas d'inhibition de *Listeria innocua* F. ceci pourrait éventuellement s'expliquer par le type d'acide lactique produit par ces derniers.

D'après DUWAT *et al* (2001) les *Lactococcus* produisent majoritairement de l'acide lactique L(+), de plus les travaux de SUTRA *et al* (1998) confirment que l'inhibition de certaines espèces bactériennes par l'acide lactique ne dépend pas de la quantité d'acide lactique produit mais elle est intimement liée à la forme indissociée et au type L(-) et D(+) de cet acide.

Nos résultats sont concordent avec ceux obtenus par METLEF et DILMI-BOURAS (2009). En effet, ces auteurs ont également constaté l'absence d'inhibition contre certaines espèces pathogène comme *E.coli* et certaines souches de *Clostridium* par les surnageant non neutralisés de souches de *lactococcus* et traités thermiquement à 121°C durant 30min.

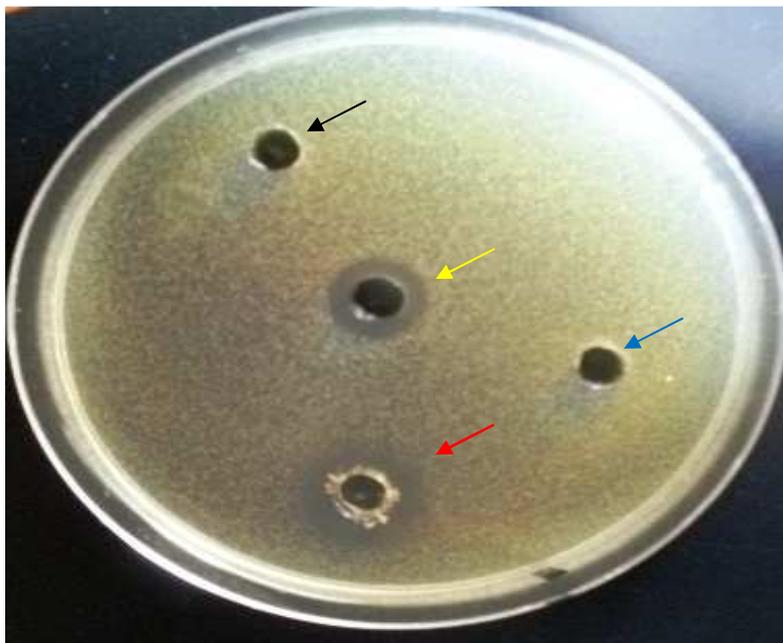


Figure 19 : Photo montrant l'inhibition de l'isolat LFT26 contre *Listeria innocua* F par la méthode de diffusion en puits.

Flèches : **noire:** Témoin négatif (eau distillée) ; **jaune :** nisine pure (témoin positif, 10mg /ml) ; **bleu :** milieu Elliker pH 7 ; **Rouge :** surnageant de l'isolat LFT26 neutralisé à pH 7.

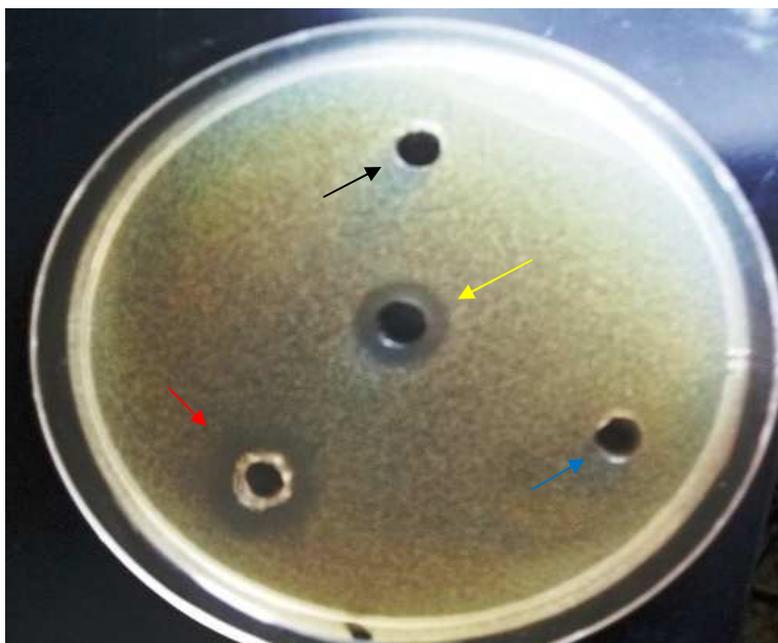


Figure 20 : Photo montrant l'inhibition de l'isolat LFT61 contre *Listeria innocua* F par la méthode de diffusion en puits.

Flèches : **noire:** témoin négatif (eau distillée stérile) ; **jaune :** nisine pure (témoin positif, 10mg /ml) ; **bleu :** milieu Elliker pH 7 ; **Rouge :** surnageant de l'isolat LFT 61 neutralisé à pH 7.

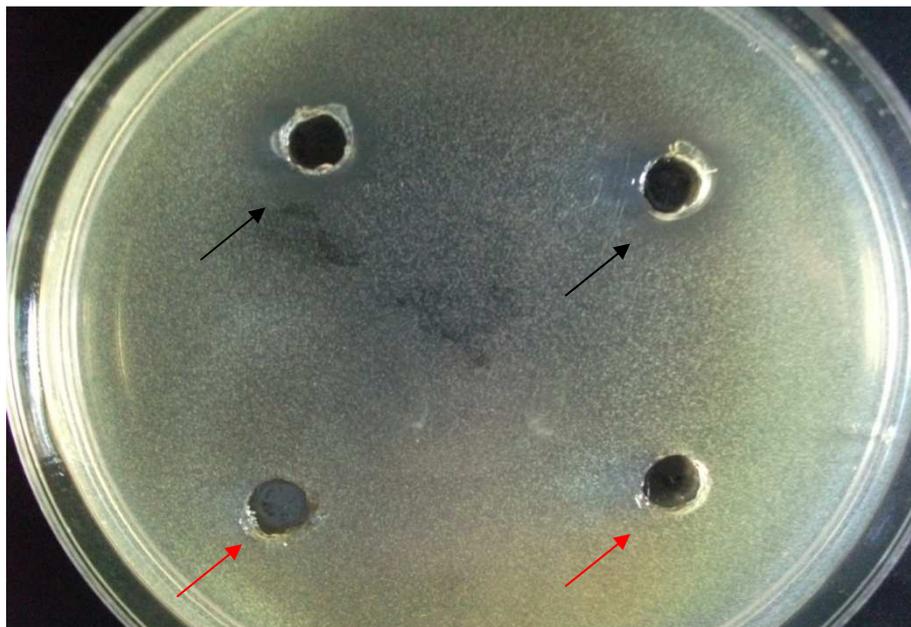


Figure 21: Photo montrant l'élimination de l'effet des bactériocines du surnageant de l'isolat lactique LFT26 par traitement thermique à 121°C pendant 30min testé contre *Listeria innocua* F.

Flèches : **noires** : surnageant non neutralisé et non traité thermiquement ; **rouges** : surnageant non neutralisé et traité thermiquement.

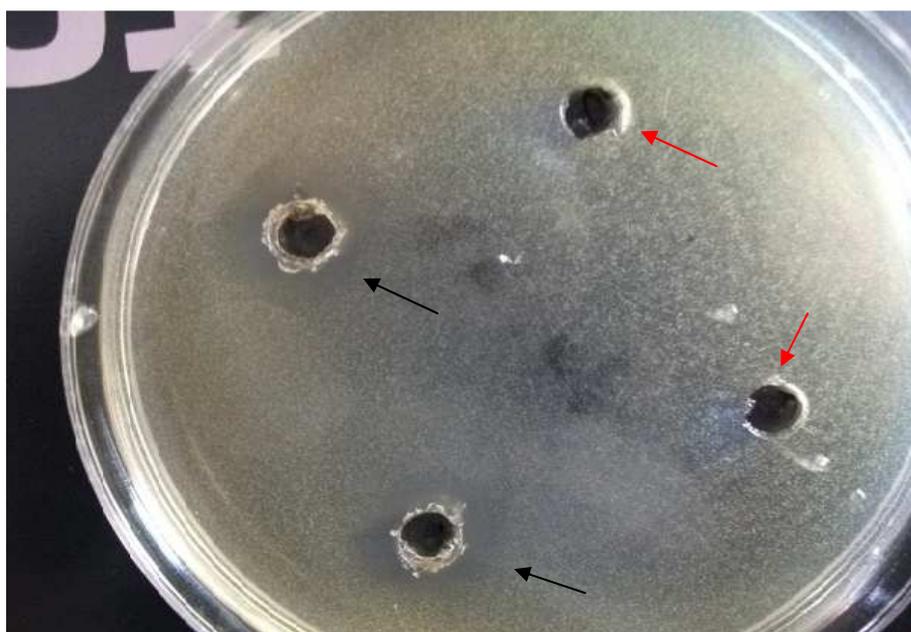


Figure 22 : Photo montrant l'élimination de l'effet des bactériocines du surnageant de l'isolat lactique LFT 61 par traitement thermique à 121°C pendant 30min testé contre *Listeria innocua* F.

Flèches : **noires** : surnageant non neutralisé et non traité thermiquement ; **rouges** : surnageant non neutralisé et traité thermiquement.

2-3-4 Démonstration de la nature protéique des substances inhibitrices

Les inhibitions observées sur les surnageant des isolats LFT26 et LFT61 ne sont dues ni aux acides organiques ni au peroxyde d'hydrogène. Le traitement thermique nous a montré que les zones d'inhibition de ces deux isolats disparaissent totalement après 30 min à 121°C, ce qui laisse penser que les substances inhibitrices pourraient être de nature protéiques. Cependant le traitement thermique n'est pas un facteur déterminant et décisif de la nature des substances inhibitrices.

Nous avons réalisé le traitement enzymatique en utilisant quatre enzymes protéolytiques : α -chymotrypsine, trypsine, pepsine et la protéinase K. Ce traitement enzymatique a été réalisé en utilisant deux méthodes : utilisation d'une solution enzymatique (enzyme soluble) et utilisation de l'enzyme en poudre.

Les résultats de l'étude enzymatique en utilisant la première méthode sont tous négatifs, on observe l'apparition de zones d'inhibition pour les deux surnageants traités avec les quatre enzymes avec deux concentration différentes (0,1mg/ml et 1mg/ml).

Les résultats de la deuxième méthode sont positifs pour la protéinase K mais négatifs pour les trois autres enzymes. La positivité du résultat s'exprime par la croissance de *Listeria innocua* F au niveau du site de dépôt de la protéinase K qui se manifeste par une déviation nette de la zone d'inhibition, tandis qu'un résultat négatif s'exprime par l'absence de croissance de *Listeria innocua* F au niveau du site de dépôt de l'enzyme et une absence de déviation de la zones d'inhibition, ces dernières sont claires et uniformes. Les figures 23 et 24 donnent les résultats de cette deuxième méthode.

La présence d'une croissance de *Listeria innocua* F au niveau du site de dépôt de la protéinase K s'explique par le fait que l'enzyme a diffusé dans la gélose et a digéré la substance inhibitrice qui se manifeste par une absence d'inhibition. La nisine est sensible à la protéinase K. D'après ces résultats, on pourrait conclure que les substances inhibitrices des deux isolats lactiques LFT26 et LFT61 sont des bactériocines.

L'absence de digestion protéolytique de ces bactériocines par l' α -chymotrypsine, la trypsine et la pepsine pourrait s'expliquer par la résistance de ces dernières vis-à-vis de ces enzymes. L'absence de digestion des bactériocines par la protéinase K en solution pourrait s'expliquer par l'inhibition de cette dernière par d'éventuelles molécules du surnageant comme les ions ou des peptides issus du métabolisme des isolats lactiques.

En effet, d'après ÖRSTAN et GAFNI (1991) l'activité de la protéinase K est inhibée par certains glucides phosphorylés comme le glucose-1-phosphate et le fructose 1,6 bis phosphate. De même qu'AJAY *et al* (1996) ont montrés l'inhibition de la protéinase K par certains peptides.

2-3-5 Identification des isolats

L'identification des isolats lactiques LFT26 et LFT61 a été effectuée par la méthode d'identification classique vu l'absence de galerie API système. Au cours de cette étude nous sommes intéressés à déterminer les principales caractéristiques physiologiques et biochimiques des souches isolés. Nous avons également effectué une comparaison de nos résultats avec ceux rapportés par LARPENT (1991) ; LEVEAU *et al.*, (1991) et TEUBER et GEIS (2006) sur les caractéristiques des espèces et des sous espèces de *Lactococcus*.

Les résultats d'identification en utilisant la méthode classique sont donnés dans le tableau N° X.

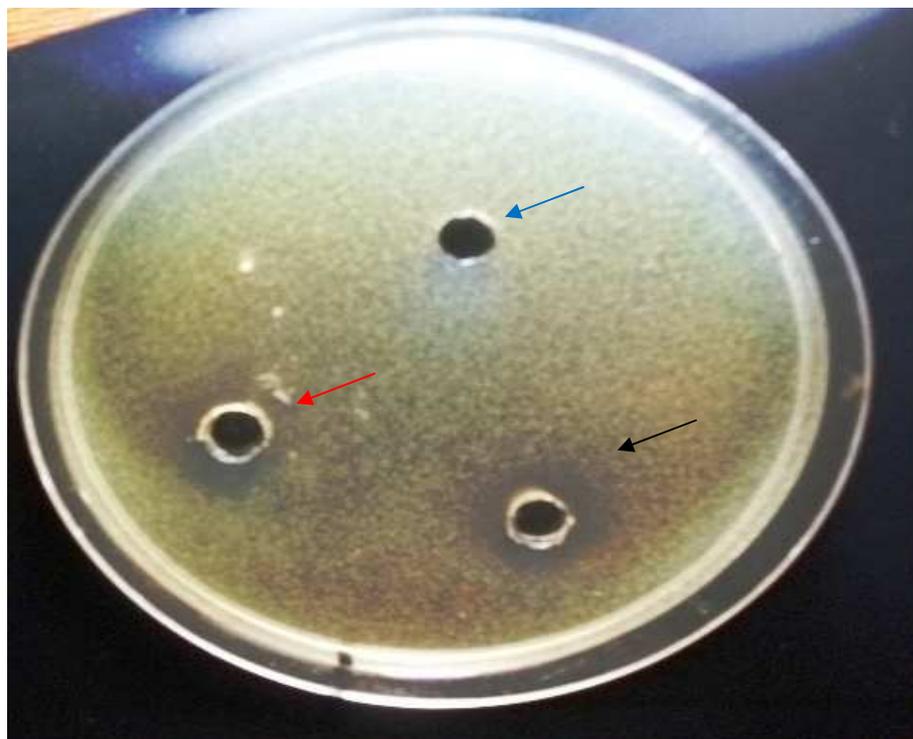


Figure 23 : Photo montrant l'action de la Protéinase K sur la substance inhibitrice de l'isolat LFT 26.

Flèches : **rouge** : montre le site de dépôt de 15mg de la Protéinase K pure ; **noire** : puits sans enzyme ; **bleu** : Protéinase K en solution à une concentration de 1mg/ml.

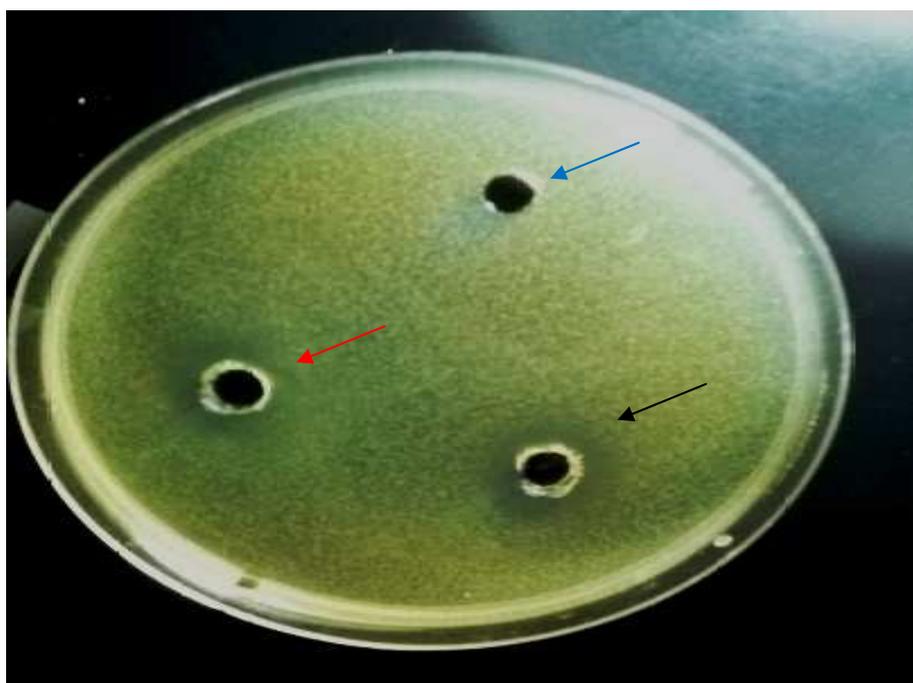


Figure 24 : Photo montrant l'action de la Protéinase K sur la substance inhibitrice de l'isolat LFT 61.

Flèches : **rouge** : montre le site de dépôt de 15mg de la Protéinase K pure ; **noire** : puits sans enzyme ; **bleu** : Protéinase K en solution à une concentration de 1mg/ml.

Les isolats lactiques LFT26 et LFT61 s'apparentent au genre *Lactococcus*. D'après ces résultats, nous constatons que les deux isolats ne s'apparentent pas à l'espèce *Lactococcus plantarum*, la différence se situe au niveau de l'aptitude à assimiler le lactose et à hydrolyser l'arginine. De même que ces isolats ne s'apparentent pas à *Lactococcus raffinolactis* car cette dernière ne se caractérise pas par une aptitude à croître à 40°C mais assimile le raffinose et le mélibiose.

Lactococcus lactis est subdivisé en trois sous espèces, en comparaison avec les sous espèces type, on constate que les deux souches de *Lactococcus lactis* LFT26 et LFT61 ne s'apparentent pas au deux sous espèce *Lactococcus lactis ssp cremoris* et *Lactococcus lactis ssp hordniae* car ces dernières sont ADH-, ne poussent ni à 40°C ni à 4% NaCl.

Une différence s'observe également entre ces deux souches de *Lactococcus lactis* LFT26 et LFT61 et *Lactococcus lactis ssp lactis biovar diacetylactis*. Le biovar *diacetylactis* est VP+ et citratase+.

En calculant le pourcentage de parenté avec les espèces et des sous espèces du genre *Lactococcus*, on en déduit que ces deux isolat LFT26 et LFT61 sont très fortement apparentés à l'espèce *Lactococcus lactis ssp lactis* avec des valeurs de 95 % et 97,5 % respectivement.

D'après l'analyse de ces résultats on pourra dire que ces souches de *Lactococcus lactis* sont donc des *Lactococcus lactis ssp lactis*.

Cependant, on observe d'après les résultats du tableau que *Lactococcus lactis ssp lactis* LFT26 et *Lactococcus lactis ssp lactis* LFT61 présentent des profils de fermentation des glucides légèrement différents, ces variations concernent la fermentation du saccharose et de l'arabinose.

Les mêmes observations ont été signalées par GHRAIRI *et al* (2004), STROYANOVA *et al* (2007) et ELTOMANI *et al* (2002) concernant la fermentation de ces glucides par les souches de *Lactococcus lactis ssp lactis*.

Ces variations métaboliques pourraient s'expliquer par une instabilité génétique intrinsèque de ces souches lactiques. En effet, d'après CAMPO *et al* (2002) les *Lactococcus* présentent une instabilité et une plasticité génétique importante. Ces variations génétiques résultent de mutations ponctuelles, de processus de conjugaison, de transformation ou de perte ou gain d'un ou de plusieurs plasmides.

Plusieurs souche de *Lactococcus lactis ssp lactis* productrices de bactériocines ont été isolées à partir de produits alimentaires plus particulièrement le lait et les produits laitiers (DIOP *et al.*, 2007). Quatre souches de *Lactococcus lactis ssp lactis* (R9/1, R9/2, R10/1 et R35) ont été isolées à partir du lait fermenté traditionnel du Maroc « Raïb » par ELTOMANI *et al* (2002). Ces dernières produisent des bactériocines actives contre *Listeria innocua* 11288 et *Listeria monocytogenes* LMAB 4d. Les diamètres d'inhibition déterminés par la méthode diffusion en puits varient de 5 à 6 mm pour *Listeria innocua* et de 5 à 13 mm pour *Listeria monocytogenes*.

BAYOUB *et al* (2006) ont également isolé quatre souches de *Lactococcus lactis* productrices de bactériocines à partir du lait fermenté traditionnel du Maroc « Raïb », ces bactériocines sont actives contre *Listeria monocytogenes*.

De même DIOP *et al.*, (2007) ont isolé deux souches de *Lactococcus lactis ssp lactis* (CWBI-B1410 et CWBI-B1411) à partir de produits fermentés traditionnel du Sénégal. Les bactériocines de ces souches exercent une inhibition sur *Listeria monocytogenes* (collection CWBI). Le diamètre d'inhibition est supérieur ou égale à 8mm.

Tableau X : Résultat d'identification des deux isolats lactiques LFT26 et LFT61.

Caractères	Isolat LFT26	Isolat LFT61
Gram et morphologie	+, cocci	+, cocci
Catalase	-	-
Oxydase	-	-
Type respiratoire	Aéro-anaérobie facultatif	Aéro-anaérobie facultatif
Type fermentaire	Homo	Homo
Citratase	-	-
VP	-	-
ADH	+	+
Gélatinase	-	-
Nitrate réductase	-	-
Résistance à 63°C/30min	-	-
Croissance à		
- 10°C	+	+
- 37°C	+	+
- 40°C	+	+
- 45°C	-	-
Croissance à pH 9,2	+	+
Lait de Sherman		
- 0,1%	R+/C+	R+/C+
- 0,3%	R-/C-	R+/C-
Croissance en présence de :		
- 2,5% NaCl	+	+
- 4% NaCl	+	+
- 6,5% NaCl	-	-
Lait tournesolé	R+/C+	R+/C+
Téllurite de Potassium	Sensible (colonies grise).	Sensible (colonies grise).
Galactose	+	+
Lactose	+	+
Maltose	+	+
Mellibiose	-	-
Mélicitose	-	-
Raffinose	-	-
Ribose	+	+
Salicine	+	+
Sorbitol	-	-
Saccharose	-	+
Tréhalose	+	+
Glucose	+	+
Arabinose	-	+

D'autres souches de *Lactococcus lactis ssp lactis* productrices de bactériocines ont été également isolées à partir de produit laitiers fermentés comme les fromages.

Ainsi, BENKERROUM *et al* (2000) ont isolé neuf souches de *Lactococcus lactis ssp lactis* productrices de bactériocines à partir du fromage traditionnel du Maroc « *Jben* ». Ces bactériocines exercent un effet inhibiteur contre *Listeria monocytogenes* ATCC7644.

Lactococcus lactis BFE 1500 est une souche isolée par OLASUPO *et al* (1999) à partir du fromage traditionnel « *wara* » du Nigéria. Cette souche produit une bactériocine qui est la nisine Z active contre *Listeria monocytogenes* W2250 et *Listeria innocua* WS2257.

De même GHRAIRI *et al* (2004) ont isolé sept souches de *Lactococcus lactis ssp lactis* à partir du fromage traditionnel « *Rigouta* » et productrices de bactériocines actives contre *Listeria monocytogenes* EGDe et *Listeria ivanovii* BUG496. Le diamètre d'inhibition varie de 12 à 15mm pour *Listeria ivanovii* et de 11 à 12mm pour *Listeria monocytogenes* respectivement.

Beaucoup de bactériocines produite par les souches de *Lactococcus lactis ssp lactis* décrites dans d'autres travaux présentent des profils de sensibilité différents vis-à-vis des enzymes protéolytiques.

RODRIGUEZ *et al* (2000) ont isolé deux souches de *Lactococcus lactis* (*Lactococcus lactis ssp lactis* TAB82 et *Lactococcus lactis ssp lactis biovar diacetylactis* TAB 87) à partir du lait cru et qui produisent des bactériocines résistantes à l'action protéolytique de l' α -chymotrypsine mais sensible à la protéinase K.

La bactériocine de la souche *Lactococcus lactis ssp lactis biovar diacetylactis* TAB 87 est également résistante à l'action protéolytique de la trypsine mais sensible à la protéinase K.

La lactococcine 972 produite par *Lactococcus lactis* IPLA 972 et caractérisée par MARTINEZ *et al* (1996) est résistante à la trypsine et l' α -chymotrypsine mais sensible à l'action de la protéinase K.

La bactériocine produite par la souche *Lactococcus lactis* 387 isolé par MORENO *et al.*, (2000) à partir du lait cru et résistante à l'action protéolytique de la trypsine mais sensible à la protéinase K.

De même OLASUPO *et al* (1999) ont détecté une bactériocine (nisine Z) produite par *Lactococcus lactis* BFE 1500 résistante à la trypsine et à la pepsine mais sensible à la protéinase K.

La lactococycline Q, une bactériocine cyclique récemment décrite par SAWA *et al* (2009) et produite par la souche *Lactococcus lactis* QU 12 est légèrement résistante à l'action protéolytique de la trypsine et de l' α -chymotrypsine mais très sensible à celle de la protéinase K.

La bozacine B14 est une bactériocine produite par *Lactococcus lactis ssp lactis* B14, cette dernière est caractérisée par IVANOVA *et al* (2000), elle est résistante à l'action protéolytique de la trypsine et de l' α -chymotrypsine mais sensible à la protéinase K.

CONCLUSION

Conclusion

Au terme de notre travail, nous avons réalisé l'étude de la microflore de 20 laits fermentés traditionnels (*Ighi*) issus de 11 régions de la wilaya de Tizi-Ouzou, nous avons également isolés et purifiés 65 isolats de bactérie lactique qui s'apparentent au genre *Lactococcus* à partir de ces 20 laits fermentés traditionnels suivi d'une étude d'antagonisme contre *Listeria innocua* F.

Les résultats obtenus de la numération des différents groupes nous montrent que ces laits fermentés traditionnels sont acides (pH $4,40 \pm 0,29$) et très riches en flore microbienne. Les microflores dominantes sont les suivantes : la microflore aérobie mésophile totale est présente avec une moyenne de $(127,98 \pm 98)10^7$ UFC/ml [$(9,10 \pm 0,33)$ Log₁₀ UFC/ml], les *Lactococcus* avec une moyenne $498,65 \pm 305,4)10^7$ UFC/ml [$(9,69 \pm 0,39)$ Log₁₀ UFC/ml] sur M17 et $(48,87 \pm 44,47)10^7$ UFC/ml [$(8,68 \pm 0,39)$ Log₁₀ UFC/ml] pour *Lactobacillus* sur MRS et les levures et les moisissures avec une moyenne de $(103,66 \pm 59,6)10^7$ UFC/ml [$(9,01 \pm 0,24)$ Log₁₀ UFC/ml]. Nos résultats montrent également que ces laits fermentés traditionnels sont fortement contaminés par les germes de contamination fécale et les germes pathogènes. La valeur moyenne des coliformes totaux est de $(298 \pm 49,3)10^2$ UFC/ml [$(4,47 \pm 0,07)$ Log₁₀ UFC/ml] tandis que celle des coliformes fécaux est de $(18 \pm 2,03)10^2$ UFC/ml [$(2,97 \pm 0,04)$ Log₁₀ UFC/ml].

La présence de cette flore de contamination dans ces laits atteste des mauvaises conditions d'hygiène au cours de leurs fabrication et font de ces derniers des produits alimentaire de mauvaise qualité microbiologique ce qui peut entraîner des dangers majeurs sur la santé des consommateurs.

Les résultats de l'étude de l'antagonisme par la méthode double couche et la méthode diffusion en puits montrent que deux souches de isolats lactiques LFT26 et LFT61 produisent des substances inhibitrices de *Listeria innocua* F. avec la méthode double couche, les diamètres d'inhibition obtenus sont de $8 \pm 0,15$ mm et $6 \pm 0,21$ mm pour l'isolat LFT26 et LFT61 respectivement.

Les diamètres d'inhibitions obtenus avec la méthode diffusion en puits se révèlent plus intéressants, ils sont de $13,75 \pm 0,16$ mm et $14,5 \pm 0,85$ mm pour l'isolat LFT26 et LFT61 respectivement.

Le traitement enzymatique avec la protéinase K a permis d'annihiler l'activité inhibitrice des deux isolats lactiques, ce qui suppose que les substances inhibitrices sont de nature protéique ou des bactériocines.

Les résultats d'identification des deux isolats lactiques LFT26 et LFT61 montrent qu'un pourcentage de parenté de 95 % et 97,5 % avec l'espèce *Lactococcus lactis ssp lactis* respectivement.

Ces résultats montrent que les laits fermentés traditionnels analysés sont de mauvaise qualité microbiologique et que ces derniers constituent une source naturelle pour la recherche et

l'isolement de nouvelles souches de bactéries lactiques sauvages productrices de bactériocines présentant une activité inhibitrice considérable contre les souches microbiennes pathogènes.

A la fin, il serait très intéressant de poursuivre et de compléter ce travail initiale par :

- Une étude plus approfondie de la diversité microbiologique en identifiant les principaux genres microbiens du lait fermenté traditionnel « *Ighi* » ;
- Une caractérisation physico-chimique et biochimique de ces bactériocines (étude de l'effet du traitement thermique, du pH, des surfactant, détermination du pHi, de la structure et du mode d'action) ;
- Une étude sur le déterminisme génétique des ces bactériocines ;
- Une application dans la bioconservation de ces laits fermentés traditionnels.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUE

ABDELGADIR W. S., HAMAD S.H., MOLLER P.L. and JACOBSEN M. (2001). Characteristics of the dominant microbiota of Sudanese fermented milk Rob. *Int. dairy J.*, **11**, 63-70.

ABEE T. (1995). Pore-forming bacteriocins of Gram positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms. *FEMS Microbiol. Lett.*, **129**, 1-9.

AJAY K.S., TEJ P.S., KLAUS P., SIEGFRIED F. and BETZEL C. (1996). Strategy to design peptide inhibition: structure of a complex of Proteinase K with a designed octapeptide inhibitor N-Ac-Pro-Ala-Ala-Pro-Phe-DAla-Ala-Ala-NH₂ at 2,5 Å resolution. *Protein Sci.*, **5**, 2453-2458.

AMMOR M. S. (2004). Ecosystème microbien d'un atelier de salaison: identification et propriétés des bactéries lactiques. Thèse Doctorat, Agro-Campus, Université de Rennes, France.

ARTHUR C.O. and SATU V. (2004). Antimicrobial components from lactic and Bacteria ; in : «lactic acid bacteria, microbiological and functional aspects». Marcel Dekker, 3^{ème} Ed., New-York.

ASADUZZAMAN M. S. et SONOMOTO K. (2009). Lantibiotics: Diverse activities and unique modes of action. *J. biosci. Bioeng.*, **107 (05)**, 475-487.

AXELSSON L. (2004). Lactic Acid bacteria, classification and physiology ; in : «lactic acid bacteria microbiological and functional aspects». Marcel Dekker, 3^{ème} Ed., New-York.

BADIS A., LAOUBDIA-SELLAMI N., GUETARNI D., KIHAL M. et OUZROUT R. (2005). Caractérisation phénotypiques des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales *arabia* et Kabyles. *Sci. Technol.*, **23**, 30-37.

BALCÁZA J.L., VENDRELL D., de BLAS I., RUIZ-ZARZUEL I., GIRONES O. and MUZQUIZ L.J. (2007). *In-vitro* competition adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens. *Vet. Microbiol.*, **122 (3-4)**, 373-380.

BAYOUB K., ELOTMANI F., OSSOBHEI O., JAOUA S et SOUKRI A. (2006). Contribution à l'étude des bactériocines produites par des souches isolés de lait fermenté traditionnel « *Raib* ». Biochimie, Substances Naturelles et Environnement. Congrès International de Biochimie, Agadir, 09-12 Mai 2006.

BEN AMOR K., CORNELIEUS C., MAHJOUB A. et THONART P. (1998). Identification de la flore lactique du lait fermenté traditionnel tunisien *Iben* et évaluation des composés aromatisants, Éd., Association Africaine de Microbiologie et d'Hygiène Alimentaire. Sousse-Tunisie.

BENKERROUM N., GHOUATI Y., SANDINE W.E and TANTAOUI-ELARAKI A. (1993). Methods to demonstrate the bactericidal activity of bacteriocins. *Lett. Appl. Microbiol.*, **17**, 78-81.

- BENKERROUM N., OUBEL H., ZAHAR M., DLLA S. and FILALI- MALTOU F.(2000).** Isolation of a bacterocin producing *Lactococcus lactis subsp lactis* and application to control *Listeria monocytogenes* in Moroccan Jben. *J. Appl. Microbiol.*, **89**, 960-966.
- BENKERROUM N., BAOUDI A. and KAMAL M.(2003).** Behavior of *Listeria manocytogenes* in raw sausages « Merguez » in presence of bacteriocin producing *Lactococcus* strain as a protective culture. *Meat Sci.*, **63**, 479-484.
- BEUKES E.M., BESTER B.M. and MOSTERT J. F. (2001).** The microbiology of South African traditional fermented milk. *Int. J. Food Microbiol.*, **63**, 189-197.
- BOLOTIN A., WINCKER P., MANGER S., JAILLON O., MALARME K., BANCK J.W.J., EHRLICH D. and SOROKIN A. (2001).** The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp *lactis* II 1403. *Genome Res.*, **11**, 751-753.
- BOUCHER I., VADEBONCOEUR C. and MOINEAU S. (2003).** Characterization of Genes involved in the metabolism of α -galactosides by *Lactococcus raffinolactis*. *Appl. Environ. Microb.*, **69** (7), 4049-4056.
- BOUIX M. et LEVEAU J-Y. (1991).** Techniques d'Analyses et de Contrôle dans les Industries Agro-alimentaires. Technique et Documentation, 3^{ème} Ed., Lavoisier, Paris.
- BREUKINK E., VAN HENSDEN H. E., VOLLMERHAUS P. J., SWIEZEWSKA E., BRUNNER L., WALKER S., HECK A. J. R. and DE KRUIJFF B. (2003).** Lipid II is an intrinsic component of the pore induced by nisin in bacterial membrane. *J. Biol. chem.*, **278**, 19898 - 19903.
- BROTZ H., BIERBAUM G., REYNOLDS P.E. and SAHL H.G.(1998).** The Lantibiotic meiscidin inhibits peptidoglycan biosynthesis at the level of transglycosylation. *Eur. J. Biochem.*, **246**, 193-199.
- CAMPO N., DIAS J.M., MIGUEL J.D., DEVERAN-MINGOT M.L., RITZENTHALER P. and LE BOURGEOIS P.(2002).** Genome plasticity in *Lactococcus lactis*. *A. Van. Leeuw.*, **82**, 123-132.
- CASALTA E. and MONTEL M.C. (2008).** Safety assessment of dairy micro-organisms, the *Lactococcus* genus. *Int. J. Food Microbiol.*, **126**, 271-273.
- CHARLIER C., EVEN S., GAUTIER M. and LE LOIR Y. (2008).** Acidification is not involved in the early inhibition of *Staphylococcus aureus* growth by *Lactococcus lactis* in milk. *Int. Dairy J.*, **18** (2), 197-203.
- CHEIGH C.I. and PYUN Y.R. (2005).** Nisin biosynthesis and its properties. *Biotechnol. Lett.*, **27**, 1641-1648.
- CHEN H. and HOOVER D.G. (2003).** Bacteriocins and their food application. *Compr. Rev. Food Sci. S.*, **2**, 82-100.

CHO S-L., NAM S-W., YOON J-H., LEE J. S., SUKHOO A. and KIM W. (2008). *Lactococcus chungangensis* sp nov, a lactic acid bacterium isolated from activated sludge foam. *Int. J. Syst. Evol. Micr.*, **58**, 1844-1849.

CINTAS L.M., CASAUS P., HERRANZ C., HANERSTEIN L.S., HOLO H., HERMANDEZ P.E. and NES I.F. (2000). Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces Enterocins L50A and L50 B, the sec dependent Enterocin P, and a novel Bacteriocin Secreted Without an N-Terminal extension termed enterocin Q. *J. Bacteriol.*, **182**, 6806-6814.

COLLINS D., SAMELIS J., METAXOPOULUS J. and WALLBANKS S. (1993). Taxonomic studies on some *Leuconostoc*-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J. Appl. Bacteriol.*, **75**, 595-603.

COTTER P.D., HILL C. and ROSS R.P. (2005). Bacteriocins : developing innate immunity for food. *Nature Rev.Microbiol.*, **3**, 777-788.

COLLINS M. D., ASH C., FARROW J. A. E., WALLBRANKS S. and WILLIAMS A. M. (1989). 16S ribosomal ribonucleic acid sequence analyses of lactococci and related taxa. Description of *Vagococcus fluvialis* gen nov.sp. nov. *Appl. Bacteriol.*, **67**, 453-460.

Da SILVA MALHEIROS P., DAROIT J. D., da SILVEIRA P. N. and BRANDELLI A. (2010). Effect of nanovesicle-encapsulated nisin on growth of *Listeria monocytogenes* in milk. *Food Microbiol.*, **27**, 175-178.

DACOSTA Y. (2000). La bioprotection des aliments: l'antagonisme microbien au service de la sécurité et de la qualité microbiologique des aliments. Ed. YVES DACOSTA. Paris.

DALY C, SANDINE W. E and ELLIKER P.R. (1972). Interactions of food starter cultures and food-borne pathogens: *streptococcus diacetylactis* versus food pathogens. *J.milk. Food Technol.*, **35**, 349-357.

DELARAS C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Ed. Technique et Documentation, Lavoisier, Paris.

DEEGAN L.H., CASSER D.P., HILL C. and ROSS P.(2006). Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Rev. Int. Dairy J.*, **16**, 1058-1071.

DELBES-PAUS C., DORCHIES G., CHAABNA Z., CALLON C. and MONTEL M-C. (2010). Contribution of hydrogen peroxide to the inhibition of *Staphylococcus aureus* by *Lactococcus garvieae* in interaction with raw milk microbial community. *Food Microbiol.*, **27 (7)**, 924-932.

DELLAGLIO F., de ROISSART H., TORRIANI S., CURK M.C. et JANSSEUS D. (1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques ; in : « Bactéries lactiques ». Vol 1. Ed. Loriga, Uriage.

DESMAZEAUD M.(1983). L'état des connaissances en matière de nutrition des bactéries lactiques. *Lait*, **63**, 267-316.

DIEP D. and NES R. I. (2002). Ribosomally synthesized Antibacterial peptides in Gram position Bacteria. *Curr. Drug Targ.*, **3**, 107-122.

DIEP D.B., MYHRE R., JOHNSBORG O., AAKRA A. and NES I.F.(2003). Inducible bacterocin production in *Lactobacillus* is regulated by differential expression of pln operons and by two antagonist reponse regulators, the activity of which is enhanced upon phosphorylation. *Mol. Microbiol.*, **45**, 483-494.

DIOP M.B., DUBOIS-DAUPHIN R., TINE E., NGOM A., DESTAIN J. and THONART P.(2007). Bacterocin producers from traditionnal food products. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **11 (4)**, 275-281.

DORTU C et THONART P.(2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêt pour la biopreservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **13 (1)**, 143-154.

DRIDER D., FIMLAND H.Y., MCMULLEN L. and PREVOST H. (2006). The continuing story of class IIa bacterocin. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **32**, 101-107.

DUWAT P., SOURICE S., CESSÉLIN B., LAMBERT G., VIDO K., GAUDU F., LELOIR Y., VIOLET F., LOUBIERE P. and GRUSS A.(2001). Respiration capacity of the fermenting Bacterium *Lactococcus lactis* and positive effects on Growth and Survival. *J. bacterial.*, **183 (15)**, 4509-4516.

EIJSINK V.G., AXELSSON L., DIEP D. B., LEIV S. H., HOLO H. and NES I. F. (2002). Production of class II bacterocins by Lactic acid bacteria, an example of biological warfare communication. *A. Van. Leeuw.*, **81**, 639-654.

EIJSINK V.G., SHEIE M., MIDDELHOVEN H.P., BRURBERG M.B. and NES I.F. (1998). Comparative studies of classe IIa bacteriocins of Lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microb.*, **64**, 3275-3281.

EL-BARADEI G., BUCHET D. A. and ORGIER J. C. (2008). Bacterial Biodiversity of traditional *Zabady* fermented milk. *Int. J. Food Microbiol.*, **121**, 295-301.

ELLIKER P.R., ANDERSON A.W. and HANNESSON G. (1956). Agar culture medium for lactic acid streptococci and lactobacilli. *J. dairy sci*, **39**, 11-16.

ELOTMANI F., REVOL-JUNELLES A. M., ASSOBHEI O. and MILLIÈRE J. B. (2002). Characterization of anti-Listeria monocytogenes Bacterocins from *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* and *Lactococcus lactis* strains isolated from *Raib*, a moroccan traditional fermented milk. *Curr. Microbiol.*, **44**, 10-17.

ERCOLINI D., FERROCINO L., LASTORIA A., MAURIELLO G., GIGLI S., MASI P. and VILLANI F. (2010): Development of spoilage microbiota in beef stored in nisin activated packaging. *Food Microbiol.*, **27**, 137-143.

FANG J. and LIN I.W.(1994). Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fragi* on cooked pork in a modified atmosphere packing/nisin combinaison system. *J. Food Pro.*, **57**, 479-485.

FEREHICHI M., JACQUES F., MABROUK K. and MANAI M. (2001). Lactococin MMFII, a novel class IIa bacterocin produced by *Lactococcus lactis* MMFII isolated from a Tunisian dairy product. *FEMS Microbiol. Lett.*, **205**, 49-55.

FERMANDEZ-ESPLA M.O., GARAUULT P., MONNET V. and RUL F.(2000). *Streptococcus thermophilus* cell mal-anchored proteinase: release, purification, Biochemical and genetic characterization. *Appl. Environ. Microb.*, **66**, 4742-4778.

FIHMAN V., RASKINE L., BARROU Z., KIFFEL C., RIAHI J., BERÇOT B. and SANGON M. J. (2006). *Lactococcus garvieae* and endocarditis: identification by 16S rRNA and Soda Sequence analysis. *J. infect.*, **52**, 03-06.

FIMLAND G. L., JOHNSEN L., AXELSSON L., BOURBERG M. B., NES I. F., EIJSINK V. A. H. and MAYER J. N. (2000). A C-terminal disulfide bridge in pediocin like bacterocins renders bacterocin activity less temperature dependant and is a major determinant of the antimicrobial spectrum. *J. bacteriol.*, **182**, 2643-2648.

FLEET G. H. (1990). Yeast in dairy products: a review. *J. Appl. Bacter.*, **68**, 199-211.

FUGELSANG K.C. and EDWARDS C.G.(2007). Lactic and Bacteria in Wine microbiology: practical and applications procedure. 2^{ème} Ed., Springer, New-York, USA.

GADAGA T. H., MUTUKUMIRA A. N. and NARVHUS J. A. (2001). Interaction of yeasts and Lactic and bacteria isolated from Zimbabwe naturally fermented in UHT milk. *Int. J. Food Microbiol.*, **68**, 21-32.

GALVEZ A., VALDIVIA E., MAQUENDA M. and MONTOYA E.(1985). Production of bacterocin like substances by group D strobotococci of human origin. *Microbiol.*, **43 (1765)**, 223-232.

GALVIN M., HILL C. and ROSS R. P. (1999). Lacticin 3147 displays activity in buffer against gram-positive bacteria pathogens which insensitive in standard plate assays. *Lett. Appl. Microbiol.*, **28 (5)**, 355-358.

GARCIA-QUINTANS N., MAGNI C., DE MENDEZA D. and LOREZ P. (1998). The citrate transport system of *Lactococcus lactis subsp lactis biovar diacetylactis* is induced by acid stress. *Appl. Environ. Microb.*, **64**, 850-857.

GARNEAU S., MARTIN N. I. and VENDERAS J.C.(2002). Two peptide bacterocins produced by Lactic acid bacteria. *Biochimie*, **84**, 577-592.

GARRITY G.M., TIMOTHY G.L., JAMES R.C., SCOTT H.H., EUZEBY J. and TINDALL B.J. (2007). Taxonomic Outline of Bacteria and Archeae. Part 9- The Bacteria : phylum "Firmicutes": class "Bacilli". Release 7.7 march 6.

GHRAIRI T., MANAI M., BERJEAUD J.M. and FRERE J.(2004). Anti-listerial activity of Lactic acid bacteria isolated from *rigouta*, a traditional Tunisian cheese. *J. Appl. Microbiol.*, **97**, 621-628.

GLEDEL J. et CORBION B.(1991). Le genre *Salmonella* ; in : Techniques d'Analyses et de Contrôle dans les Industries Agro-alimentaires. Technique et Documentation, 3^{ème} Ed., Lavoisier, Paris.

GONFA A., FASTER A.H. and HOLZAPFEL W.M.(2001). Field survey and literature review on traditional fermented milk products of Ethiopia, *Int. J. Food Microbiol.*, **68**, 173-186.

GONZALEZ L., SANDOVAL H., SACRISTAN N., CASTRO J.M., FRESUO J.M. and TORNADIJO M.E.(2007). Identification of Lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. *Food control.*, **18**, 716-722.

GUINANE C.M., COTTER P.D., HILL C. and ROSS P.(2005). A review: microbial solutions to microbial problems: lactococcal bacterocin for the control of undesirable biota of food. *J. Appl. Microbiol.*, **98**, 1316-1325.

GUIRAUD J. P et GALZY P.(1980). Analyses microbiologiques dans les Industries Agro-alimentaires, Ed de L'usine Nouvelle, 2^{ème} Ed., Paris.

GUIRAUD J. P. (2003). Microbiologie Alimentaire, 2^{ème} Ed., Dunod. Paris.

HAGTING A., KUNJI E., LEENHOUTS K., POOLMAN B. and KONINGS W. (1995). The di.-Tripeptide transport protein of *Lactococcus lactis*. A New type bacterial peptide transporter. *J. Biol. Chem.*, **269**, 11391-11399.

HALE J.D.F., TING Y-T., JACK R.W., TAGG J.R. and HENG N.C.K.(2005). Bacterocin (mutacin) production by *Streptococcus mutans*, genome sequence reference strain UA 159. Elucidation of antimicrobial repertoire by genetic dissection. *Appl. Environ. Microb.*, **71**, 7613-7617.

HAMAMA A.(1989). Qualité bactériologiques des fromages frais marocains. CIHEAM, Options Méditerranéennes, série séminaire n°6.

HAMMES P.W and HERTEL C.(2006). The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium* ; in : "Prokaryotes", **4**, Bacteria, Firmicutes, cyanobacteria. 3^{ème} Ed., Springer, New York, USA.

HANUŠOVÁ K., ŠTASTANÁ M., VOTAVOVÁ L., KLAUDISOVÁ K., DOBIÁŠ M.V. and MAREK M.(2010). Polymer films releasing nisin and/or natamycin from polyvinylidene chloride lacquer coating : nisin and natamycin migration, efficiency in cheese packaging. *J. Food Eng.*, **99**, 491-496.

HARDIE J.M et WHILEY R.D.(2006). The genus *Streptococcus-Oral* ; in : “Prokaryotes”, **4**, Bacteria, Firmicutes, cyanobacteria. 3^{ème} Ed., Springer, New York, USA.

HARRATI E. (1974). Recherche sur le *leben* Algérien. Laboratoire de Microbiologie I.N.A. EL-HARRACH. ALGER.

HARRATI E. (1974). Les bactéries lactiques locales, Laboratoire de Microbiologie, I.N.A. EL-HARRACH. ALGER.

HARTKE A., BOUCHE S., GIARD J.C., BENACHOUR A., BOUTIBONNES P. and AUFRAY Y.(1996). The Lactic acid stress responses of *Lactococcus lactis subsp lactis*. *Curr. Microbiol.*, **33** , 194-199.

HAUGE H.H., NISSEN-MEYER J., NES I.F. and EIJSINK V.G.H.(1998). Amphiphilic α -helices are important structural motifs in the α and β peptide that constitute the bacterocin lactococcin G, Enhancement of helix formation upon α - β interaction. *Eur. J. Biochim.*, **251**, 565-572.

HENG N.C.K., WESCOMBE P.A., BURTON J. P., JACK R.W. and TAGG J.R. (2007). The diversity of bacterocins in Gram positive bacteria; in : “Bacteriocins: ecology and evolution”. Ed Springer, Verlag, Berlin, Heidelberg.

HERRERO M., MAYO B., GONZALEZ B. and SUAREZ J. E. (1996). Evaluation of technologically important traits in lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentation. *J. Appl. Bacteriol.*, **81**, 565-570.

HIGGINS C.F.(1992). ABC transporters from micro-organisms to human. *Annu. Rev. cell. Biol.*, **8**, 67-113.

HOLO H., NISSEN O. and NES I.F.(1991). Lactococin A a new bacterocin from *Lactococcus lactis subsp cremoris*, isolation and characterization of protein and its gene. *J. Bacteriol.*, **173 (12)**, 3879-3887.

HOLT J.G, KRIEG N.R, SNEAT H., STALEY J.T. and WILLIAMS S.T.(1994). Bergey’s manual of determinative bacteriology. 9^{ème} Ed., WILLIAMS ANP, WILKINS. USA.

HOLZAPFEL W.H., FRANZ C.M.A., LUDWIG W., BACK W. and DICKS L.M. T. (2006).The genera *Pediococcus* and *Tetragenococcus*; in : “Prokaryotes”, **4**, Bacteria, Firmicutes, cyanobacteria. 3^{ème} Ed., Springer, New York, USA.

HOLZAPFEL W.H., HABERER P., GEISEN R., BJORKROTH J. and SHILLINGES U.(2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutri.*, **73**, 265-373.

HOOVER D.G., DISHART K.J. and HERMES M.A. (1989). Antagonistic effect of *Pediococcus ssp* against *Listeria monocytogenes*. *Food Biotechnol.*, **3**, 183-196.

HSU S-T.D., BREUKINK E., TISCHENKO E., LUTTERS M. A., de KRUIJFF B., KAPTEIN R., BOVIN A.M. and VAN NULAND N.A. (2004). The nisin-lipidII complex reveals a pyrophosphate cage that provides a blueprint for novel antibiotics. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 963-967.

HUGENHOLTZ J.(1993). Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, **12**, 165-178.

HUOT E., BARRENA-GANZALEZ C. and PETITDEMANGE H.(1996). Tween 80 effet on bacteriocin synthesis by *Lactococcus subsp cremoris* J46. *Lett. Appl. Microbiol.*, **22 (4)**, 307-310.

HURST A. (1981). Nisin. *Adv. App. Microbiol.*, **21**, 85-123.

HUTKINS R. W. (2006). Microbiology and Technology of Fermented Foods. First edition. Blackwell Publishing.

HYDE A.J., PARISOT J., MCNICHOL A. and BONEV B.(2006). “Nisin-induced changes in *Bacillus* morphology suggest a paradigm of antibiotic action. *Proc. Natl Acad. Sue.*, **103**, 19896-19901.

IVANOVA I., KAHENDJOVA P., PANTEV A., DANOVA S. and DOUSSET X. (2000). Detection, purification and partial characterization of a novel bacteriocin substance produced by *Lactococcus lactis subsp lactis* B14 isolated from BOZA-BULGARIAN traditional cereal beverage. *Biocata. Fund. Appl.*, **41 (06)**, 47-53.

JACK R. W., BIERBAUM C., HIEDRICH C and SAHL H. G. (1995). The genetic of lantibiotic biosynthesis. *Bioassays*, **17**, 193-802.

JOHANNA B and HOLZAPFEL W.(2006). The genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella* ; in : “Prokaryotes”, **4**, Bacteria, Firmicutes, cyanobacteria. 3^{ème} Ed., Springer, New York, USA.

JUILLARD V., FOUCAUD C., DESMAZEAUD M. et RICHARD J.(1996). Utilisation des sources azotées du lait par *Lactococcus lactis*. *Lait*, **76**, 13-24.

JUILLARD V., SPINLER H.E., DESMAZEAUD M.J. et BOQUIEN C.Y. (1987). Phénomènes de coopération et d’inhibition entre les bactéries lactiques utilisées en industries laitière. *Lait*, **67**, 149-172.

KALETA C. and ENTIAN K.D.(1991). Nisin, a peptide antibiotic: cloning and sequencing of the nisA gene and posttranslational processing of its peptide product. *J. Bacteriol.*, **171 (3)**, 1597-1601.

KHELEF N., LECUIT M., BUCHRIESER C., CABANES D., DUSSURGET O. and COSSART P. (2006). *Listeria monocytogenes* and the Genus *Listeria* ; in : “Prokaryotes”, **4**, Bacteria, Firmicutes, cyanobacteria. 3^{ème} Ed., Springer, New York, USA.

KILPPER-BÄLZ R., FISCHER G. and SCHLEIFER K.H.(1982). Cité par **STILES M. E. and HOLZAPFEL W. H. (1997).** Lactic acid bacteria of food and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.*, **36**, 1-39.

KLAENHAMMER T.R.(1993). Genetic of bacterocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, **12 (1-3)**, 39-85.

KLAENHAMMER T.R.(1988). Bacterocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, **70**, 337-349.

KLEIN G., PACK A.C. and RENTER G.(1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, **41**,103-185.

KONINGS W.N., POOLMAN B. and DRIESSEN A.J.(1989). Bioenergetics and solute transport in lactococci. *Crit. Rev. Microbio.*, **16**, 419-476.

KUNJI E.R.S., SMID E.J., PLAPP R., POOLMAN B. and KONINGS W. N. (1996). Di-Tri peptide and oligopeptide are taken up via distinct mechanisms in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.*, **175**, 2052-2059.

KURMAN J. A. (1994). The production of fermented milk in the world. Aspect of the production of fermented milk. *Int. Dairy Feder. Bull.*, **179**, 16-26.

LABIOUI H., ELMOUALDI L., EL YACHIOUI M. et OUHSSINE M. (2005). Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bull. soc. Phar.*, **144**, 237-250.

LAN C.H., CHAINE A., GRÉGOIRE L. and WACHE Y.(2010). Potential of nisin incorporated sodium caseinate films to control *Listeria* in artificially contaminated cheese. *Food Microbiol.*, **27**, 940-944.

LANCEFIEL R.C.(1933).Cité par **STILES M. E. and HOLZAPFEL W. H. (1997).** Lactic acid bacteria of food and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.*, **36**, 1-39.

LARPENT J.P et LARPENT C.(1997). Microbiologie alimentaire : technique de laboratoire. Technique et Documentation, Lavoisier, Paris.

LARRENT J.P(1991). Les ferments microbiens dans les Industries Agro-Alimentaires : produits laitiers et carnés. Technique et Documentation, Lavoisier, Paris.

LETORT C., NARDI M., GARAUULT F., MONNET V. and JUILLARD V. (2002). Casein utilization by *Streptococcus thermophilus* results in a diauxic growth in milk. *App. Eur. Microbiol.*, **68**, 3162-3165.

LEVEAU J.Y., BOUIX M. et de ROISSART H.(1991). La Flore lactique ; in : « Techniques d'Analyses et de Contrôle dans les Industries Agro-alimentaires ». Technique et Documentation, 3^{eme} Ed., Lavoisier, Paris.

- LEVEAU J.Y., BOUIX M. et De ROISSART H.(1989).** Guide Pratique d'analyse microbiologiques des laits et produits laitiers. Technique et Documentation, Lavoisier, Paris.
- LEWUS C.B., KAISER A. and MONVILLE T.J.(1991).** Inhibition of Food-borne pathogens by bacteriocin from lactic acid bacteria isolated from meat. *Appl. Environ. Microb.*, **57(6)**, 1683-1688.
- LISTER J. (1873).** Cité par **STILES M. E. and HOLZAPFEL W. H. (1997).** Lactic acid bacteria of food and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.*, **36**, 1-39.
- LORRAINE A., DRAPPER R., PAUL R., COLIN H. and COTTER P.D.(2008).** Lantibiotic immunity. *Curr. Protein. Pept. Sci.*, **9**, 39-49.
- LUBELSKI J., RINK R., KHUSAINOV R., MOLL G.N. and KUIPPERS O.P. (2008).** Biosynthesis, immunity, regulation, mode of action and engineering of the model lantibiotic nisin. *Cell. Mol. Life. Scien.*, **65**, 455-476.
- LUKAÇ Y., SAMARŽIJA D. and ANTUNAC N.(2001).** Taxonomy, physiology and growth of *Lactococcus lactis* : a review. *Mljekarstvo*, **51 (1)**, 35-48.
- MAGNI C., DE MENDROZA D., KONINGS W.N. and LOLKEMA J.S.(1999).** Mechanism of citrate metabolism in *Lactococcus lactis*: resistance against lactate toxicity at low pH. *J. Bacteriol.*, **181**, 1451-1457.
- MARCISSET O., JERONIMUS STRATINGH M.C., MALET B. and POOLMAN B. (1997).** Thermophilin 13, a non-typical antilisterial poration complex bacteriocin, that function without receptor. *J. Bio. Chem.*, **272**, 14277-14284.
- MARSHALL V.M.(1987).** Fermented milks and their future trends: I. microbiological aspect. *J. Dairy Res.*, **54**, 559-574.
- MARTINEZ B., SUAREZ J.E. and RODRIGUEZ A.(1996).** Lactococcin 972, a homodimeric Lactococcal bacteriocin whose primary target is not the plasma membrane. *Microbiology*, **142**, 2393-2398.
- MARTINEZ B., FERNAUDEZ M., SUAREZ J.E. and RODRIGUEZ A.(1999).** Synthesis of Lactococcin (972), a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* IPLA 972, Depend on one expression of a plasmid encoded biscistronic operon. *Microbiology*, **145**, 3155-3161.
- MARTINEZ B., SAUREZ J.E. and RODRINGUEZ A.(1995).** Antimicrobials produced by wild lactococcal strains isolated from homemade cheeses. *J. Food Pro.*, **58 (10)**, 1118-1123.
- MARTINEZ-CUESTA C., PELAEZ C. and REQUEN A.(2003).** Lacticin 3147 favours isoleucine transamination by *Lactococcus lactis* IFLP359 in cheese-model system. *Biotechnol. lett.*, **25**, 599-602.

MATHARA J.M., SCHEILLINGER U., KUTIMA P.H., MBUGUA S.K. and HOLZAPFEL W.M.(2004). Isolation, identification and characterization of the dominant microorganisms of *Kule naoto*: The Maasai traditional fermented milk in Kenya. *Int. J. Food Microbiol.*, **94**, 269-278.

MATHIESSEN G., HUCHNE K., KROECHEL L., AXELSSON L. and EIJSINK V.G.(2005). Characterization of a new bacteriocin operon in sakacin P Producing *Lactobacillus Sakei*, showing strong translational coupling between the bacteriocin and immunity genes. *Appl. Environ. Microb.*, **71**, 3565-3574.

METLEF S. et DILMI-BOURAS A.(2009). Effet antagoniste de *Lactococcus lactis*, souchs extrémophiles locales sur des espèces de la flore intestinale résidente. *Rev. Nat. Technol.*, **01**, 33-44.

MEYER C., BIERBAUM G., HEIDRICH C., REIS M., SULIN G. and IGLESIAS-WIND M.I.(1995). Nucleotide sequences the lantibiotic Rep5 biosynthesis gene cluster and functional analysis of Pep5 and PepC in thioether formation. *Eur. J. Biochem.*, **232**, 478-489.

MITRA S., PRAN K.C. and SWADESH R.B.(2010). Potential production and preservation of dahi by *Lactococcus lactis* W8, a nisin-producing strain. *Food Sci. Technol.*, **43**, 337-342.

MOLL G., HILDENG-HAUGE H., NISSEN-MEYER J., NES I.F., KONINGS W. N. and DRISENS A.J.(1998). Mechanistic proprieties of the two peptides bacteriocins lactococcin G. *J. Bacteriol.*, **180** (1), 96-99.

MOLL G.N., KONINGS W.L. and DRIESSEN J.M.A.(2002). Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *A. Van Leeuw.*, **76**, 185-188.

MONNET V. et CRIPON J.C.(1994). Métabolisme azote des bactéries lactiques ; in : « Bactéries lactiques », Vol I. Ed. Lorrea, Uriage, France.

MORENO I., ALDA L.S., de FREITAS L. and MAURO F.(1999). Detection and characterization of bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* strains. *Rev. Microbiol.*, **30**, 130-136.

MORGAN S.M., ROSS R.P., BERESFORD T. and HILL C.(2000). Combinaison of hydrostatic pressure and lacticin 3147 causes increased killing of *Staphylococcus* and *Listeria*. *App. Microbiol.*, **88**, 414-420.

MORISSET D., BERJEAUD J.M., FRERE J. et HECHARD Y.(2005). Bactériocines des bactéries lactiques et probiotiques. Technique et Documentation, Lavoisier, Paris.

MUFANDAEDZA J., VILJOEN B.C., FERESU S.B. and GADAGA T.H.(2006). Antimicrobial proprieties of lactic acid bacteria and yeast LAB cultures isolated from traditional fermented milk against pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* strains. *Int. J. food Microbiol.*, **108**, 147-152.

NAGAO J.I., ASADUZZAMAN M. S., ASO Y., OKUDA K.I., NAKAYAMA J. and SONOMOTO K.(2006). Lantibiotics: insight and Foresight for new paradigm. *J. Biotechnol. Bioeng.*, **102 (3)**, 139-149.

NARVHUS J.A. and GADAGA H.T.(2003). The role of interaction between yeasts and lactic acid bacteria in African fermented milks: a review. *Int. J. Food Microbiol.*, **86**, 51-60.

NEVES A.R., POOL W.A., KOK J., KUIPERS O.P. and SANTOS H.(2005). Overview on sugar metabolism and its control in *Lactococcus lactis* the input from in vivo NMR. *FEMS Microbiol. Rev.*, **29**, 531-554.

NICOLIC M., TERZIC-VIDOJEVIC A., JOVCIC B., BEGOVIC J., GOLIC N. and TOPISIROVIĆ L.(2008). Characterization of lactic acid bacteria from Bulkuljac, a homemade goat's milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, **122**, 162-170.

NILSSON U. and RADSTROM P.(2001). Genetic localization and regulation of the maltose phosphorylase gene, *mal P* in *Lactococcus lactis*. *Microbiology*, **147**, 1565-1573.

NISSEN-MEYER J., HOLO H., HARVASTEIN L.S., SLETTEN K. and NES I.F. (1992). A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J.Bacterol.*, **174**, 5686-5692.

OGIER J.C. and SERROR P.(2007). The *Enterococcus* Genus. *Int. J. Food Microbiol.*, doi : 10, 1016/jjfoodmicro.2007.08.0.17

OLASUPO N.A., SCHILLINGER U., NARBAD A., DODD H. and HOLZAPFEL W. H.(1999). Occurrence of nisin Z production in *Lactococcus lactis* BFE1500 isolated from *wara*, a traditional Nigerian cheese product. *Int. J. Food Microbiol.*, **53**, 141-152.

OPPEGARD C., FILMAND G., THORBAK I. and NISSEN MEYER J.(2007). Analysis of the two peptides bacteriocins Lactococcin G and Enterocin 1071 by site directed mutagenesis. *Appl. Environ. Microb.*, **73**, 2931-2938.

ORLA-JENSEN S.(1924). Cité par **STILES M. E. and HOLZAPFEL W. H. (1997).** Lactic acid bacteria of food and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.*, **36**, 1-39.

ÖRSTAN A. and GAFNI A.(1991). Inhibition of Proteinase K by phosphorylated sugars. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **25 (4)**, 657-662.

PATTON G.C. and VAN DER DOUK W.A. (2005). New development in Lantibiotic biosynthesis and mode of action. *Curr. Opin. Microbiol.*, **8**, 543-551.

PAWAR D.D., MALIK S.V.S., BHILEGAONKAR K.N. and BARBUDDHE S.B. (2000). Effect of nisine and its combination with sodium chloride on the survival of *Listeria monocytogenes* added to raw buffalo meat mince. *Meat Sci.*, **56**, 215-219.

- PELMONT J. (1995).** Bactéries et environnement : adaptation physiologique, volume II, collection Grenoble science, Ed. Office de Publication Universitaire.
- PETROV K., URSHEV Z. et PETROVA P.(2008).** L (+) lactic acid production from starch by a novel amylolytic *Lactococcus lactis subsp lactis* B 84. *Food Microbiol.*, **25**, 550-557.
- PIARD J.C and DESMAZEAUD M.(1991).** Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria.1- Oxygen metabolites and catabolism ends products. *Lait.*, **71**, 525-541.
- PIARD J.C., DELORME F., GIRAFFA C.J., COMMISSAIRE J. et DESMAZEAUD M. J.(1990).** Evidence for a Bacteriocin produced by *Lactococcus Lactis* CNRZ 481. *Neth. Milk. Dairy J.*, **44**, 143-158.
- PIARD J.C., MURIANA P.M., DESMAZEAUD M. J. and KLAENHAMMER T.R. (1992).** Purification and partial characterization of lacticin 481, a lantionin- containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis subsp lactis* CNRZ 481. *App. Eur. Microbiol.*, **58 (1)**, 279-284.
- PICCON A., GARCIA-CASADO M.A. and NUÑEZ A. (2010).** Proteolytic activities, peptides utilization and oligopeptide transport systems of wild *Lactococcus lactis* Strains. *Int. Dairy J.*, **20**, 156-162.
- PILET M. F., MAGRAS C. et PEDERIGHI M. (1998).** Bactéries lactiques ; in : « Manuel de Bactériologie Alimentaire ». Ed. POLYTECHNICA.
- POOLMAN B.(2002).** Transporters and their roles in lactic acid bacteria. *A. Van. Leeuw.*, **82**, 147-164.
- POOLMAN B. and KONINGS W.N.(1988).** Relation of growth of *Lactococcus lactis* and *streptococcus cremoris* to amino acid transport. *J. Bacteriol.*, **170**, 700-707.
- POSTMA P.W., LENGETER J.W. and JACOBSON G.R.(1993).** Phosphoenolpyruvate : carbohydrate phosphotransferase systeme of bacteria. *Microbiol. Rev.*, **57**, 543-594.
- POT B. (2008).** The taxonomy of lactic acid Bactéria ; in : « Bactéris lactiques, de la génétique aux ferments ». Technique et Documentation, Lavoisier, Paris.
- QI F., CHEN P. and CAUFIELD P.W.(2001).** The groupe I strain of *streptococcus mutans* UA 140, produced both the Lantibiotic mutacin I non lantibiotic bacteriocin, mutacin IV. *Appl. Environ. Microb.*, **67**, 15-21.
- QUIAN N., STANLUY G.A., BUNTE A. and RADSTROM P.(1997).** Product formation and phosphoglucomutase activities in *Lactococcus lactis*. Cloning and characterization of a novel phosphoglucomutase gene. *Microbiology*, **143**, 855-865.

RA R., QIAO M., IMMOVEN T., PUJANA I. and SARIS P.E.J.(1996). Genes responsible for nisin synthesis, regulation and immunity form a regulon of two operons and are induced by nisin in *Lactococcus lactis* N8. *Microbiology*, **142**, 1282-1288.

RAYNAUD S.(2006). Régulation métabolique et transcriptionnelle de l'autoacidification chez *Lactococcus lactis*. Thèse Doctorat, Université Paul Sabatien, Toulouse, France.

REID J.R., COOLBEAR T., PILLILGE C.J. and PRITCHARD G.G.(1994). Specificity of hydrolysis of bovine κ -casein by cell-envelope associated proteinase from *Lactococcus lactis* strains. *Appl. Environ. Microb.*, **60**, 801-806.

RICHARD C., CANON R., NAGHMOUCHI K., BERTRAND D., PRÉVAST H. and DRIDER D.(2006). Evidence on correlation between number of disulfids bridge and foxicity of class II bacteriocins. *Food Microbiol.*, **23**, 175-183.

RIGAUX P.(2008). Evaluation des propriétés immuno-modulatrices de la bactérie lactique *Lactobacillus plantarum* NCI MB8826 dans le cadre de l'allergie aux acariens. Thèse de Doctorat, Université libre de Bruxelles, Ecole Interfacultaire de Bioingénierie, Laboratoire d'Allergologie Expérimentale.

ROBINSON R.K. and TAMIME A.Y.(2006). Types of Fermented ; in: " Fermented Milks". First edition. Blackwell science, Ltd, 9600 Garsington Road, Oxford OXO 2D9, UK.

RODRIGUEZ J.M., GONZALEZ B., GAYA P., NUÑEZ M. and MEDINA M. (2000). Diversity of bacteriocins produced by Lactic acid bacteria isolated from Raw Milk. *Int. Dairy J.*, **10**, 7-15.

RODRIGUEZ J.M., MARTINEZ M.I. and KOK J.(2002). Pediocin PA-1 a wide spectrum bacterocin from lactic and bacteria. *Cri. Rev. Food Sci.*, **42**, 91-121.

ROOSTITA R. and FLEET G.H.(1996). The occurrence and growth of yeasts in cambert and blue veined cheese. *Int.J. food microbial.*, **28**, 179-185.

ROSENBACH F. J.(1884). Cité par **STILES M. E. and HOLZAPFEL W. H. (1997).** Lactic acid bacteria of food and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.*, **36**, 1-39.

RYAN M.P., REA M.C., HILL C. and ROSS R.P.(1996). An application in cheddar cheese manufacture for strain of *Lactococcus Lactis* producing a novel broad spectrum bacterocin, Lacticin 3174. *Appl. Environ. Microb.*, **64**, 612-619.

SAHL H.G. and BIERBAUM G.(1998). Lantibiotics Biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram positive bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*, **52**, 41-56.

SAMELIS J., MAUROGENAKIS F. and METAXOPOULOS J.(1994). Characterization of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami. *Int. J. Food Microbiol.*, **23**, 179-196.

SAWA N., TAKESHI Z., JUNKO K., KOJI F., KOHEI H., JIRO N. and KENJI S. (2009). Identification and characterization of Lactocycdin Q, a novel cyclic Bacterocin Produced by *Lactococcus* sp strain QU12. *Appl. Environ. Microb.*, **75** (6), 1552-1558.

SCHLEIFER K.H., KRAUS J., DVORAK C., KILPPER-BÄLZ R., COLLINS M.D and FISCHER W.(1985). Transfere of *Streptococcus lactis* and related Streptococci to the genus *Lactococcus* gen.nov. *Syst. Appl. Microbiol.*, **6**, 183-195.

STACKE-BRANDT E. and TEUBER M.(1988). Cité par **STILES M. E. and HOLZAPFEL W. H. (1997).** Lactic acid bacteria of food and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.*, **36**, 1-39.

STAHINIČ I., BUSARCEVIČ M., PAVLICA A., MILASIN J., GOLIC N. and TOPISIROVIČ L. (2007). Molecular and biochemical characterization of human oral Lactobacilli as putative probiotic candidates. *Oral. Microbiol. Immun.*, **22** (02), 111-117.

STILES M. E et HOLZAPFEL W. H. (1997). Lactic acid bacteria of food and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.*, **36**, 1-39.

STROYANOVA L.G., EGOROVA N.S., FEDOROVAB G.B., KATRUKAB G.S. and NETRUSOVA A.I. (2007). A comparison of the proprieties of bacteriocins formed by *Lactococcus lactis subsp lactis* strains of diversés origin. *Appl. Biochem. Micro.*, **43**, 604-610.

SUTRA L., FEDERIGHI M. et JOUVE J.L. (1998). Manuel de bactériologie Alimentaire. Ed POLYTECHNICA. Paris.

TAGG J.R and McGIVEN A.R. (1971). Assay for bacteriocins. *App. Microbiol.*, **21**(5), 943.

TAGG J.R., DAJANI A.S. and WANNAMAKER L.W. (1976). Bacteriocins of gram positive bacteria. *Bacteriol. Rev.*, **40**, 722-756.

TAMIME A. Y. (2006). Fermented Milks. First edition., Blackwell science, Ltd, 9600 Garsington Road, Oxford OXO 2D9, UK.

TAMIME A. Y., SKRIVER A. et NILSSON L. E. (2006). Starter cultures; in : "Fermented milks". First edition., Blackwell science, Ltd, 9600 Garsington Road, Oxford OXO 2D9, UK.

TANTAOUI-ELARAKI A., BERRADA M., EL MARRAKCHI A. et BERRAMOU A. (1983). Etude sur le *lben* marocain. *Lait*, **63**, 230-245.

TERZAGHI B.E and SANDINE W.E. (1975). Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophage. *Appl. Microbiol.*, **29**, 807-813.

TEUBER M. and GEIS A. (2006). The genus *Lactococcus*. in : "Prokaryotes", **4**, Bacteria, Firmicutes, cyanobacteria. 3^{eme} Ed., Springer, New York, USA.

THOMAS L.V., INGRAM R.E., DAVIES E.A., MILNE C.F. and DELVES-BROUGHTON N. (2002). Effectiveness of nisin to control *Bacillus* and *Clostridium* spoilage of a Pasteurized mashed potato product. *J. Food Prot.*, **65**, 1580-1585.

THOMAS T.D and MILLS O.E. (1981). Proteolytic enzymes of starter bacteria. *Neth. Milk. Dairy J.*, **35**, 255-273.

THOMPSON J. (1979). Lactose metabolism in *Streptococcus lactis*: phosphorylation of galactose and glucose moieties in-vivo. *J. Bacteriol.*, **140**, 774-785.

THOMPSON J. (1987). Sugar transport in the lactic acid bacteria *in* sugar transport and metabolism in gram-positive bacteria. Ed Reizer.J. peterkofsky.A. Ellis Howood, Lid, Chichester. Royaume-Uni.

TOPISIROVIČ L., KOJIČ M., FIRA D., GOLIC N., STAHINIČ I. and LOZO J. (2006). Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, **112**, 230-235.

TOPISIROVIČ L., VELJOVIČ K., TERZIČ A., STAHINIČ I. and KOJIČ M. (2007). Comparative analysis of antimicrobial and proteolytic activity of lactic acid bacteria isolated from zlatar cheese. *Genetika*, **39 (02)**, 125-138.

TWOMEY D., RYAN M., MEANEY B. and HILL C. (2002). Lantibiotics produced by Lactic acid bacteria : structure, function, and applications. *A. Van leeuw.*, **82**, 165-185.

VAN BELKUM M.J., KOK J., VENEMA G., HOLO H., NES I.F., KOINGS W.N. and ABEE T. (1991). The bacteriocin Lactococcin A specifically increases permeability of Lactococcal cytoplasmic membranes in a voltage dependent, protein mediated manner. *J. Bacteriol.*, **173**, 7934-7941.

VAUGHAN A., EIJSINK V.G.H., O'SULLIVAN T.F., O'HANLON K. and VAN SINDERSEN D. (2003). An analysis of bacteriocin produced by Lactic acid bacteria isolated from malted barley. *J. Appl. Microbiol.*, **91**, 131-138.

VENDRELL D., BALCAZAR J.L., ZARZUELA I.R., DE BLAS I., GIRONES O. and MUZQUIZ J.L. (2006). *Lactococcus Garvieae* in fish : A Review . *Comp. immunol. Microb.*, **29**, 77-198.

VENEMA K., VENEMA G. and KOK J. (1995). Lactococcal bacteriocins: mode of action and immunity. *Trends Microbiol.*, **8**, 299-307.

VERNOUX J.P., BEMARDEAU M., HENRI-DUBERNET S. and GUÉGUEN M. (2007). *Lactobacillus* genus. *Int. J. Food Microbiol*, Doi : 10.1016/j.j food Micro 2007.08.015.

WEIDEMANN I., BREUKINK E., VAN KRAAIJ C., KUIPERS O.P., BIERBAUM G. and DE KRUIJFF B. (2001). Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *J. Bio. Chem.*, **276**, 1772-1779.

WIEDEMANN I., BOTRIGER T., BONELLI R.R., SIVEN A.W., HAGGE O., GUTSMANN T., SEYDEL U., DEEGAN L., HILL C., ROSS P. and SAHL H.G. (2006). The mode of action of the lantibiotic lactacin 3147- a complex mechanism involving specific interaction of two peptides and the cell wall precursor lipid II. *Mol. Microbiol.*, **61**, 285-297.

WIJAYA A., NEUDEKER C., HOLZAPFEL W. and FRANZ C. (2006). Influence of bacteriocin-producing *Enterococcus faecalis* BFE1071 on *Lactobacillus* spp in the rat gastrointestinal tract. *Proc. Food Microbiol.*, **124**, 324-333.

WILLEY J.M and VAN DERDONK W.A. (2007). Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Annu. Rev. Microbiol.*, **61**, 477-501.

YILDIRIM Z. and YILDIRIM M. (2001). Characterization of buchnericin lb produced by *Lactobacillus buchneri* LB. *Turk. J. Biol.*, **25**, 73-82.

ZENDO T., KOGA S., SHIGERI Y., NAKAYAMA J. and SOMOMOTO K. (2006). Lactococin Q produced by *Lactococcus lactis* QU4. *Appl. Environ. Microb.*, **72**, 3383-3889.

ZHANG H., XU J., WANG J., MENGHEBILIG E., SUN T., LI H. and GUO M. (2007). A Survey on chemical and microbiological composition of *kurut*, naturally fermented yak milk from Qinghai in China. *Food Control.*, doi:10.1016/j.foodcont.2007.06.010

ZHANG S and MUSTAPHA A. (1999). Reduction of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* 0157: H7 numbers on vacuum packaged fresh beef treated with nisin or nisin combined with EDTA. *J. Food Prot.*, **62**, 1123-1127.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Composition des milieux de cultures utilisés

▪ **Bouillon rouge phénol (milieu pour l'étude du catabolisme glucidique)** (DELLARAS, 2007) :

Composition en g/l

Peptone de caséine 05
 Peptone de viande 05
 Chlorure de sodium 05
 Rouge de phénol 0.018
 pH $7,2 \pm 0,2$ à 25°C

Stérilisation : 15min à 121°C

Répartir le milieu dans des tubes stériles, puis incorporer dans chaque tube une solution stérile du sucre à étudié à une concentration finale de 5g/l.

▪ **Bouillon Elliker** : (LEVEAU *et al.*, 1991).

Composition en g/l

Tryptone 20
 Extrait de levure 05
 Gélatine 2.5
 Lactose 05
 Saccharose 05
 Glucose 05
 Acetate de sodium 1.5
 Chlorure de sodium 04
 Acide ascorbique 0,5
 Eau distillée qsp 1000ml
 pH finale $6,8 \pm 0,2$

Sterilisation 121°C pendant 15min

▪ **Bouillon nitraté** : (GUIRAUD, 2003).

Composition en g/l

Bouillon nutritif 1000ml
 Nitrate de potassium 1g

Ajuster le pH à 7 et répartir en tubes à essais (7 à 10 ml) puis autoclaver 15min à 121°C .

▪ **Bouillon hypersalé** : (LEVEAU *et al.*, 1991).

Composition en g/l

Bouillon nutritif 1000ml
 Glucose 05
 Extrait de viande 05
 Peptone 15
 NaCl 65
 Eau distillée 1000ml

pH final 7,5

Stériliser 20min à 121°C pour les bouillons hypersalés 2,5%, 4% et 6,5%, peser respectivement 25 g et 40 g au lieu de 65 g.

▪ **Bouillon SFB (Sélénite)** : (GUIRAUD, 2003).

Composition en g/l

Peptone	05
Lactose	04
Phosphate disodique	10
Sélénite acide de sodium	04

pH 7, stériliser par ébullition 10min.

▪ **Gélose désoxycholate** : (GUIRAUD, 2003).

Composition en g/l

Peptone	10
Lactose	10
Désoxycholate de sodium	0,5
Chlorure de sodium	05
Rouge neutre	0,03
Agar	12
Eau distillée	1000ml

Ajuster le pH à 7,1 puis stériliser à 115°C pendant 20min.

▪ **Gélose Elliker** : (LEVEAU *et al.*, 1991).

Composition en g/l

Tryptone	20
Extrait de levure	05
Gélatine	2.5
Lactose	05
Saccharose	05
Glucose	05
Acétate de sodium	1.5
Chlorure de sodium	04
Acide ascorbique	0,5
Agar	20
Actidione	0,05
Eau distillée qsp	1000ml

pH finale 6,8±0,2

Sterilisation 121°C pendant 15min.

▪ **Gélose Hektoen** : (GUIRAUD, 2003).

Composition en g/l

Eau distillée	1000ml
Protéose-peptone	12
Extrait de levure	03
Chlorure de sodium	05

Thiosulfate de sodium	05
Sels biliaries	09
Citrate de fer ammoniacal	1,5
Salicine	02
Lactose	12
Saccharose	12
Fuschine acide	0,01
Bleu de bromothymol	0,065
Agar	13
Eau distillée	1000ml

Ajuster le pH à 7,6 puis stériliser 5min à ébullition.

▪ **Gélose au lait citraté** : (GUIRAUD, 2003).

Répartir du lait en tubes à essais (10,5 ml par tube) et stériliser par tyndallisation 3 fois à 100°C 30min à des intervalles de 24h, ajouter aseptiquement dans chaque tube 0,5 ml d'une solution de citrate de sodium à 10%. Autoclaver 20min à 120°C puis solidifier en culot.

▪ **Gélose nutritive enrichie**: (GUIRAUD, 2003)

Composition en g/l

Peptone	10
Extrait de viande	05
Glucose	10
Chlorure de sodium	05
Agar	15
Eau distillée qsp	1000ml

Ajuster le pH 7,2 puis stériliser à 120°C pendant 20min.

▪ **Gélose Chapman** : (GUIRAUD, 2003).

Composition en g/l

Extrait de viande	01
Peptone	10
Chlorure de sodium	05
Mannitol	10
Rouge de phénol	0,025
Agar	15
Eau distillée qsp	1000ml

pH 7,4, stériliser 15min à 120°C.

▪ **Gélose PCA** : (GUIRAUD, 2003).

Composition en g/l

Peptone	05
Extrait de levure	2,5
Glucose	01

pH 7,2
Stériliser 20min à 120°C.

▪ **Gélose OGA** (GUIRAUD, 2003).

Composition en g/l

Extrait de levure	05
Glucose	20
Agar	16

pH 7

Stériliser 20 min à 115°C. ajouter avant l'emploi en surfusion, 100ml d'oxytetracycline à 1mg/ml et répartir en boîtes de Pétri.

▪ **Lait tournesolé** : (GUIRAUD, 2003).

Composition

Teinture de tournesol à 4%	10ml
Lait écrémé	1000ml

Répartir dans des tubes à essais.

Stériliser 5min à 110°C.

▪ **Lait SHERMAN** : (LEVEAU *et al.*, 1991).

Composition

Lait stérilisé 9ml

Bleu de méthylène à 1% stérilisé 20min à 120°C 1ml

Au moment de l'emploi, mélanger le lait avec le bleu de méthylène pour avoir du lait à 1% (procéder de la même manière pour avoir du lait à 3%).

▪ **Milieu MRS** : (GUIRAUD, 2003).

Composition en g/l

Peptone	10
Extrait de viande	10
Extrait de levure	05
Glucose	20
Tween 80	1ml
Phosphate dipotassique	02
Acetate de sodium	05
Citrate triammonique	02
Sulfate de magnésium	0,2
Sulfate de manganèse	0,05

Ajuster le pH 6,8

Stériliser 15min à 120°C.

▪ **Milieu Giolitti et Cantoni** : (GUIRAUD, 2003).

Composition en g/l

Tryptone	10
Extrait de viande	05
Extrait de levure	05
Chlorure de lithium	05

Mannitol	20
Chlorure de sodium	05
Glycine	1,2
Pyruvate de sodium	03

Ajuster à pH 6,9

Répartir en tubes à essais (10ml) ou en erlenmeyers. Autoclaver 20min à 115°C. Avant l'emploi ajouter à chaque tube de milieu 0,1 ml d'une solution de tellurite de potassium à 0,5% stérilisée par filtration.

▪ **Milieu ADH** (milieu de base pour la recherche de l'arginine dihydrolase) (LEVEAU *et al.*, 1991) :

Composition en g/l

Peptone	05
Extrait de viande	05
Pyridoxale	0,005
Solution aqueuse de pourpre de bromocrésol à 2%	5ml
Glucose	0,5
Eau distillée	1000ml
Arginine	10

Ajuster le pH à 6,4 puis stériliser 5 min à 120°C.

▪ **Milieu à la gélatine** : (GUIRAUD, 2003).

Composition en g/l

Peptone	10
Extrait de viande	04
NaCl	2,5
Gélatine	120
Eau distillée	1000ml

Ajuster le pH à 6,8 puis répartir en tubes, stériliser 25min à 121°C.

▪ **Milieu M17** : (TEUBER et GEIS, 2006).

Composition en g/l

Peptone trypsique de caséine	2,5
Peptone pepsique de viande	2,5
Peptone papainique de soja	05
Extrait de levure	05
Extrait de viande	2,5
D(+) lactose	05
B-glycérophosphate de sodium	19
Sulfate de magnésium (MgSO ₄ , 7 H ₂ O)	0,25
Acide ascorbique	0,5
Actidione	0,05
Agar	10
Eau distillée qsp	1000ml

Ajuster le pH à 7,2 puis autoclaver 15min à 121°C.

▪ Milieu Mannitol-mobilité : (GUIRAUD, 2003)**Composition en g/l**

Peptone	20
Nitrate de potassium	01
Mannitol	02
Rouge de phénol	0,04
Agar	04
Eau distillée qsp	100ml

Ajuster le pH à 7,2 puis stériliser 15 min à 120°C.

▪ Milieu Clark et Lubs : (DELLARAS, 2007).**Composition en g/l**

Peptone de viande	07
D(+) glucose	05
Tampon phosphate	0,005ml
Eau distillée	1000ml

Ajuster le pH à 6,9 puis autoclaver 15min à 121°C.

Annexe 2 : Composition des tampons (GUIRAUD, 2003).**▪ Tampon phosphate 0,1M (pH 7) :****Composition en g/100ml**

KH_2PO_4	0,9073
NA_2HPO_4	1,187

Mélanger 88,9ml de la solution KH_2PO_4 avec 11,1ml de la solution NA_2HPO_4 .
Stériliser par filtration.

▪ Tampon Tris/HCl 0,02M (pH 8):**Composition en g/100ml**

Mélanger 25ml d'une solution de Tris à 0,2M avec 27,9ml d'une solution HCl à 0,1N, ajuster avec de l'eau distillée jusqu'à 100ml.
Stériliser par filtration

▪ Solution HCl 0,02 M (pH 2) :**Composition en g/100ml**

Diluer 0,1ml d'une solution HCl à 12N dans 59,9ml d'eau distillée.