

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Djillali Liabès de Sidi Bel Abbès



Faculté des sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

## **Mémoire de Master**

*Spécialité : Biotechnologie microbienne*

*Présentée par : Bounadoura Nadia Maroua*

### *Thème*

**« L'activité antibactérienne des espèces de *Leuconostoc* isolées du lait de chèvre vis-à-vis des bactéries indésirables (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) »**

### **Les membres du jury :**

Mme Chama Zouaouia	Docteur, Université de Sidi Bel Abbès	Encadreur
Mme Benabbou Amina	Docteur, Université de Sidi Bel Abbès	Présidente
Mme Zineddine Esma	Docteur, Université de Sidi Bel Abbès	Examinatrice

**2020-2021**

## **Remerciements**

Ce travail est le fruit de la combinaison d'efforts de plusieurs personnes. Je remercie tout d'abord le tout puissant qui, par sa grâce m'a permis d'arriver au bout de mes efforts en me donnant la santé, la force, le courage et en me faisant entourer de merveilleuses personnes dont je tiens à remercier.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué au succès de mon mémoire et qui m'ont aidée lors de la rédaction de ce mémoire.

Je voudrais dans un premier temps remercier, ma directrice de mémoire Madame Chama Zouaouia docteur à l'université de Sidi Bel Abbes, pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter ma réflexion.

Je remercie également tous mes professeurs de l'université de Sidi Bel Abbes et les intervenants professionnels responsables de ma formation.

Je tiens à remercier sincèrement les membres du jury qui me font le grand honneur d'évaluer ce travail.

Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance aux personnes suivantes, pour leur aide dans la réalisation de ce mémoire :

Monsieur Mustapha technicien du Laboratoire de Microbiologie Générale pour toute l'aide qu'il m'a apportée.

Mes parents, pour leur soutien constant et leurs encouragements. Merci pour l'éducation et les valeurs que vous nous avez transmis à tous les neufs. Vous êtes des parents en or !

Mes Frères et sœurs pour leurs encouragements durant tout mon parcours.

Mes remerciements les plus chaleureux vont à tous mes camarades, amis et connaissances.

Tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à l'accomplissement de ce travail.

**« Il n'y a rien de plus précieux que de voir la fierté dans les yeux des gens qu'on aime. »**

## **Dédicace**

À ma directrice de Thèse Madame le Docteur Chama Zouaouia.

Pour m'avoir fait l'honneur de me confier et d'encadrer ce sujet de thèse. Merci de m'avoir guidée et accompagnée tout au long de ce travail. Votre expérience, vos conseils et votre disponibilité ont été des atouts précieux pour l'élaboration de ce mémoire. Je tiens également à vous témoigner ma profonde reconnaissance pour votre enseignement.

À ma Présidente de thèse Madame le Docteur Benabbou Amina

Vous me faites l'honneur d'accepter de soutenir ce travail. Soyez assuré de l'expression de ma profonde reconnaissance. Veuillez trouver ici l'expression de toute ma reconnaissance et de mon profond respect.

À mon examinatrice Madame le Docteur Zineddine Esma.

Je vous remercie d'avoir accepté de juger cette mémoire, et de l'intérêt que vous manifestez à l'égard de ce travail. Recevez ici le témoignage de ma plus profonde gratitude.

Vous me faites l'honneur de vous intéresser à ce travail et d'accepter de le juger. Je vous exprime ma plus sincère considération et vous prie d'accepter mes sincères remerciements.

À ma mère,

Pour ton soutien sans faille, ton amour et ta confiance en moi depuis toujours. Pour tes nombreuses lectures. Pour tes conseils avisés. Merci d'être une mère si porteuse.

À mon père,

Pour ton soutien pendant toutes ces années, pour ton éducation et ton amour.

À ma grande sœur Imane,

Qui sait toujours comment procurer la joie et le bonheur pour toute la famille.

À ma sœur Sabrina,

Pour ton soutien dans mes moments de doute. A mes yeux, tu es la personne la plus combative qui soit. Et un grand merci pour le temps accordé à la relecture de mon travail.

À ma sœur jumelle Fadia,

Pour ce lien presque fusionnel qui nous unit... juste un regard pour se comprendre. Je t'adore.

À mes chers frères et sœurs,

Khalida, Fatima, Mohamed, Amel, Madjid, qui m'ont toujours soutenu et encouragé durant ces années d'études.

À ma nièce et mon neveu,

Anfel et Ajan, que dieu les protège et leurs offre la chance et le bonheur.

À mes amis qui m'ont toujours encouragé et à qui je souhaite plus de succès.

A tous ce que je j'aime.

Merci !

BOUNADOURA Nadia Maroua

**« Le mérite modeste vient du savoir, et le savoir de l'étude. »**

Pierre-Jules Stahl

**« L'étude est la plus solide nourriture de l'esprit, c'est la source de ses plus belles lumières. »**

Charles de Saint-Évremond

## Résumé

Les bactéries lactiques du genre *Leuconostoc* contribuent à la texture, à la saveur des aliments et à la production de composés aromatiques dans l'industrie laitière et dans la fermentation de nombreux autres produits alimentaires. Elles fermentent les glucides en acide lactique, ce qui provoque une diminution du pH favorable à la conservation des aliments.

Leur pouvoir antagoniste résulte aussi d'une compétition pour les substrats et à l'élaboration de bactériocines qui inhibent les germes indésirables, par la production de ses substances ; ce genre de bactéries lactiques représentent un intérêt technologique très important.

Dans notre travail, nous avons isolé, purifié et identifié neuf souches de bactéries lactiques qui appartiennent au genre *Leuconostoc*, à partir du lait cru de chèvre, par l'utilisation des méthodes microbiologiques de base, et testé leur pouvoir acidifiant et leur effet antimicrobien vis-à-vis des bactéries pathogènes telles que *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Escherichia coli* ATCC 25922 et finalement nous avons recherché la nature des substances inhibitrices.

Une inhibition importante de la croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 a été mise en évidence par les souches S1 et S6.

Une inhibition importante de la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 a été mise en évidence par les souches S1, S2, et S8.

Une inhibition importante de la croissance d'*Escherichia coli* ATCC 25922 a été mise en évidence par les souches S1 et S9.

La substance antimicrobienne produite par les souches de *Leuconostoc* (S2, S4 et S9), est le peroxyde d'hydrogène.

L'antibiogramme nous permet de conclure que les trois souches sont résistantes à la pristinamycine. Tandis que, les trois souches testées sont quasiment sensibles au chloramphénicol, céphalexine, pénicilline G.

Egalement, *Pseudomonas aeruginosa* possède un profil intermédiaire vis-à-vis la gentamicine et *Staphylococcus aureus* est résistante à la tétracycline contrairement aux autres souches qui sont sensibles.

**Mots clés :** *Leuconostoc*, *Staphylococcus aureus*, germes pathogènes et nuisibles, acide lactique, inhibition, antibiogramme, bactériocine.

## Abstract

It is known that *Leuconostoc* species contribute in food industry, more precisely milk and its dairy and this is due to its production of aromatic compounds and their sugar fermentation to lactic acid, which will lead to the decrease in pH for food conservation.

Moreover, its antagonistic capacity also elaborate in the inhibition of altered germs by the production of these substances, which represent an important technological interests.

The identification of *Leuconostoc* is an important step in fundamental and technological development relative to metabolic activities which help in the selection of new stable and preferment lactic acid bacteria strains for further use as starters.

The microbiological results showed that all isolates were belonging to *Leuconostoc* species. The antimicrobial effect of these species against pathogenic bacteria such as *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Escherichia coli* ATCC 25922 was carried out on milk.

The nature of these substances was then evaluated by several existed chemical tests.

A significant inhibition of the growth of *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 was demonstrated by the strains S1 and S6.

Significant inhibition of the growth of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 was demonstrated by strains S1, S2, and S8.

Significant inhibition of the growth of *Escherichia coli* ATCC 25922 was demonstrated by strains S1 and S9.

The antimicrobial substance produced by the strains of *Leuconostoc* (S2, S4 and S9) is hydrogen peroxide.

The antibiogram allows us to conclude that all three strains are resistant to pristinamycin. While, the three strains tested are almost sensitive to chloramphenicol, cephalixin, penicillin G.

Also, *Pseudomonas aeruginosa* has an intermediate profile towards gentamicin and *Staphylococcus aureus* is resistant to tetracycline unlike other strains which are sensitive.

**Key-words:** *Leuconostoc*, *Staphylococcus aureus*, pathogenic and harmful microorganisms, lactic acid, inhibition, antibiogram, bacteriocin.

## ملخص

تستعمل بكتيريا الحليب كبدائيات في الصناعات اللبنية وفي الصناعات الغذائية، من أجل الوصول إلى نوعية جيدة تعمل هذه البكتيريا على إنتاج حمض اللبن، مما يؤدي إلى خفض الحموضة إلى . للأغذية، وخاصة في مشتقات الحليب ملائم جدا لحفظ الأغذية وبالإضافة إلى ذلك، تقوم بإنتاج مواد أيضاية مثبتة للبكتيريا الممرضة pH وحدة البكتيروسينات وضرورية لتفادي التلوث الميكروبي وبالتالي تجنب التسممات الغذائية . يهدف هذا البحث إلى عزل وتعريف مجموعة من هذه البكتيريا من حليب الماعز باستعمال طرق ميكروبية، وتقويم قدرتها على إنتاج مواد مثبتة للبكتيريا مثل:

*Staphylococcus aureus* ATCC 29213 و

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 و *Escherichia coli* ATCC 25922

وأخيراً دراسة طبيعة المواد المثبطة.

. تم إثبات تثبيط كبير لنمو *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 بواسطة سلالاتي S1 و S6

. تم إثبات تثبيط كبير لنمو *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 بواسطة سلالاتي S1 و S2 و S8

. تم إثبات تثبيط كبير لنمو *Escherichia coli* ATCC 25922 بواسطة سلالاتي S1 و S9

المادة المضادة للميكروبات التي تنتجها سلالات S2 و S4 و S9 هي بيروكسيد الهيدروجين . يسمح لنا المضاد الحيوي باستنتاج أن السلالات الثلاثة جميعها مقاومة للبريستيناميسين . بينما، فإن السلالات الثلاثة المختبرة حساسة تقريباً للكلورامفينيكول والسيفاليكسين والبنسلين ج .

*Pseudomonas* لها مظهر وسيط تجاه الجنتاميسين *aeruginosa*.

*Staphylococcus aureus* يقاوم التتراسيكلين على عكس السلالات الأخرى الحساسة

### الكلمات المفتاحية:

*Leuconostoc*، *Staphylococcus aureus*، الجراثيم الضارة ومسببات الأمراض، حمض اللبن، تثبيط، مضاد حيوي، البكتيروسينات .

## Table des matières

<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	1
<b>Chapitre I : Le lait</b> .....	4
<b>I.1. Définition du lait :</b> .....	4
<b>I.2. Le lait de chèvre :</b> .....	5
<b>I.3. Composition :</b> .....	5
<b>I.3.1. L'énergie :</b> .....	5
<b>I.3.2. Les protéines :</b> .....	5
<b>I.3.3. Les lipides :</b> .....	5
<b>I.3.4. Les glucides :</b> .....	6
<b>I.3.5. Les minéraux et les vitamines :</b> .....	6
<b>I.4. Les valeurs thérapeutiques</b> .....	8
<b>Chapitre II : Les bactéries lactiques</b> .....	10
<b>II.1. Définition :</b> .....	10
<b>II.2. Caractéristiques principales des bactéries lactiques :</b> .....	10
<b>II.3. Classification des bactéries lactiques :</b> .....	12
<b>II.4. Les différents genres :</b> .....	13
<b>II.5. Méthodes d'identification des bactéries lactiques :</b> .....	13
<b>II.5.1. Méthodes classiques :</b> .....	13
<b>II.5.2. Méthodes moléculaires :</b> .....	14
<b>II.6. Bactéries lactiques et fermentation alimentaire :</b> .....	14
<b>II.7. Bactéries lactiques et santé humaine :</b> .....	15
<b>II.8. Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques :</b> .....	15
<b>II.8.1. Les acides organiques :</b> .....	16
<b>II.8.2. Le peroxyde d'hydrogène :</b> .....	16
<b>II.8.3. Le dioxyde de carbone :</b> .....	16
<b>II.8.4. Le diacétyle :</b> .....	17
<b>II.8.5. La reutérine :</b> .....	17
<b>II.8.6. Les bactériocines :</b> .....	17
<b>II.8.7. Propriétés probiotiques :</b> .....	18
<b>Chapitre III : Les leuconostocs</b> .....	21
<b>III.1. Définition des Leuconostocs:</b> .....	21
<b>III.2. Écologie :</b> .....	22
<b>III.3. Caractères bactériologiques :</b> .....	22
<b>III.4. Taxonomie :</b> .....	23

<b>III.5. Métabolisme des Leuconostoc :</b>	23
<b>III.5.1. Fermentation des hexoses :</b>	23
<b>III.5.2. Fermentation des citrates et acides carboxyliques :</b>	24
<b>III.6. Les aptitudes biotechnologiques de Leuconostoc :</b>	25
<b>III.6.1. Production de dextrans :</b>	25
<b>III.6.2. Production de substances inhibitrices :</b>	26
<b>III.6.3. Pouvoir acidifiant :</b>	26
<b>III.6.4. Pouvoir gazeux :</b>	26
<b>III.6.5. Utilisation des Leuconostoc comme levains d'arôme :</b>	27
<b>III.6.6. Utilisation des Leuconostoc Pour éliminer certains défauts de goût :</b>	27
<b>III.6.7. Leuconostoc comme agent contaminé :</b>	28
<b>Chapitre IV : Les bactéries pathogènes.</b>	30
<b>IV.1. Escherichia Coli</b>	30
<b>IV.1.1. Caractères morphologiques et biochimiques :</b>	30
<b>IV.1.2. Pouvoir pathogène :</b>	30
<b>IV.2. Pseudomonas aeruginosa :</b>	31
<b>IV.2.1. Caractères morphologiques et biochimiques :</b>	31
<b>IV.2.2. Pouvoir pathogène :</b>	32
<b>IV.3. Staphylococcus aureus :</b>	32
<b>IV.3.1. Caractères morphologiques et biochimiques :</b>	32
<b>IV.3.2. Pouvoir pathogène :</b>	32
<b>Matériels et méthodes</b>	35
<b>1. Provenances des échantillons :</b>	35
<b>1.2. Collecte du lait :</b>	35
<b>1.3. Provenance de la bactérie pathogène :</b>	35
<b>1.4. Mesure de l'acidité Dornic et le pH des échantillons :</b>	35
<b>2. Isolement et purification des souches de Leuconostoc :</b>	36
<b>2.1. Milieux de culture et d'isolement :</b>	36
<b>2.2. Traitement des échantillons :</b>	36
<b>2.2.1. Du lait de chèvre :</b>	36
<b>2.3. Isolement et purification :</b>	36
<b>3. Identification et caractérisation des souches :</b>	36
<b>3.1. Test phénotypique :</b>	37
<b>3.1.1. Examen macroscopique :</b>	37
<b>3.1.2. Examen microscopique :</b>	37
<b>3.1.3. La catalase :</b>	38

<b>3.2. Test physiologique et conservation des souches</b> .....	38
<b>3.2.1. La croissance à différentes températures</b> :.....	38
<b>3.2.2. La tolérance à la salinité et à l'acidité</b> : .....	39
<b>3.2.5. Conservation des souches</b> : .....	39
<b>3.3. Test biochimique</b> : .....	39
<b>3.3.1. Production de dextrane</b> :.....	39
<b>3.3.2. Recherche de l'arginine hydrolase (ADH)</b> :.....	39
<b>3.3.3. L'utilisation du citrate</b> : .....	39
<b>3.3.4. Recherche du type fermentaire</b> :.....	40
<b>3.3.5. Métabolisme des sucres</b> :.....	40
<b>4. Test biotechnologique</b> : .....	41
<b>4.1 Pouvoir protéolytique</b> : .....	41
<b>4.2 Pouvoir lipolytique</b> : .....	41
<b>4.3 Étude des interactions</b> :.....	41
<b>4.3.1. Méthode directe</b> :.....	42
<b>4.3.2. Méthode indirecte</b> :.....	42
<b>5. L'antibiogramme</b> : .....	43
<b>Résultats et discussion</b> .....	46
<b>1. Isolement et caractérisation des isolats</b> : .....	46
<b>2. Purification et caractérisation des isolats</b> : .....	47
<b>2.1 Aspect macroscopique</b> : .....	47
<b>2.2. Test de la catalase</b> :.....	49
<b>2.3. Aspect microscopique</b> : .....	50
<b>2.4. Type fermentaire</b> :.....	52
<b>2.5. Recherche de l'Arginine dihydrolase (ADH)</b> :.....	53
<b>3. L'identification des espèces</b> : .....	54
<b>3.1. La croissance à différentes températures</b> :.....	54
<b>3.2. La thermorésistance</b> :.....	54
<b>3.3. La tolérance à la salinité et à l'acidité</b> : .....	55
<b>3.4. La production de dextrane</b> : .....	56
<b>3.5. L'utilisation de citrate</b> :.....	56
<b>3.6. L'utilisation des carbohydrates</b> : .....	58
<b>4. Les caractéristiques biotechnologiques des isolats</b> :.....	60
<b>4.1. Activité protéolytique</b> :.....	60
<b>4.2. Activité lipolytique</b> : .....	60
<b>4.3. Étude des interactions</b> :.....	61

<b>4.3.1. Méthode directe :</b> .....	61
<b>4.3.2. Méthode indirecte :</b> .....	63
<b>5. L'antibiogramme :</b> .....	67
<b>6. Discussion :</b> .....	70
<b>CONCLUSION GENERALE</b> .....	76
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	78
<b>ANNEXES</b> .....	90
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	94
<b>TABLE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	95
<b>LISTE DES FIGURES :</b> .....	97

**INTRODUCTION**

**GENERALE**

## INTRODUCTION GENERALE

Le lait est un aliment dont la durée de vie est très limitée. En effet, son pH, voisin de la neutralité, le rend très facilement altérable par les micro-organismes et les enzymes. Sa richesse et sa fragilité en font un milieu idéal de reproduction pour nombreux microorganismes tels que les moisissures, les levures et les bactéries. Bien que ces microorganismes soient le principal facteur de dégradation du lait, ils sont historiquement utilisés dans sa transformation et sa conservation. La fermentation des produits alimentaires comme le lait est employée depuis l'antiquité en Afrique, Asie et en Europe, les premiers laits fermentés étant apparus au Moyen Orient aux alentours du XI et XVème millénaire (Maurizio 1932).

Actuellement les industries laitières sont en effet très concernées par l'utilisation des bactéries lactiques comme agents de transformation pour l'obtention de lait fermenté et la réduction des microflore d'altérations et des flores pathogènes. Car la suppression de la microflore du lait cru par d'autres techniques tels que la microfiltration, la pasteurisation, ...entraîne une diminution du goût et des différences dans les arômes des fromages (Beuvier et al., 1997 ; Verdier et al., 2005 ; Elgazzar et al., 1992 ; Gay et Amgar, 2005).

Cette préservation est conférée par la production de plusieurs métabolites ayant une activité antimicrobienne tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyl et les bactériocines ces substances bioactives présentent également une grande tolérance aux variations de pH et aux traitements thermiques<sup>1</sup>.

Parmi les bactéries lactiques utilisés dans les industries laitières, on peut citer le genre de *leuconostoc* qui est très utilisé en technologie fromagère pour son aptitude à produire le CO<sub>2</sub>, ce caractère est plus utilisé en technologie du fromage bleu (roquefort, bleu d'Auvergne...); il contribue à la formation des cavités pour que la moisissure de *Penicillium* puisse se développer dans le fromage et lui donner son aspect persillé et semble intéressant en pâte molle. Sur le plan aromatique *leuconostoc* est un levain d'arôme qui produit les substances aromatiques telles que le diacétyl et l'acétoïne à partir des citrates du lait<sup>2</sup>. Certaines espèces de *Leuconostoc* ont été

---

<sup>1</sup> Dortu C., Thonart P., « Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires », *Biotechnol. Agron*, 2009, Soc. Environ. P. 143.

<sup>2</sup> Eom H.-J., Seo D.M., Han N.S., « Selection of psychrotrophic *Leuconostoc* spp. producing highly active dextransucrase from lactate fermented vegetables », *Int. J. Food Microbiol.*, 2007, p. 61-67.

proposées pour la bioconservation des produits alimentaires contre les flores pathogènes et /ou d'altérations.

L'objectif de ce travail était l'étude des caractères technologiques, y compris la production de dextrane et l'utilisation de citrate vu son rôle important comme précurseur des composés aromatiques et la production des bactériocines, des espèces de *Leuconostoc* isolées du lait cru de chèvre, afin d'obtenir des souches performantes d'une production intense de bactériocines de dextrane et d'arôme pour les utiliser en industrie alimentaire.

Ce mémoire est subdivisé en trois chapitres :

- Le premier chapitre présente une généralité sur le lait ; ensemble des connaissances sur les bactéries lactiques, « Définition ; Origine des bactéries lactiques ; Habitat ; Diversité et taxonomie ; Les aptitudes biotechnologiques des bactéries lactiques) y compris le genre *Leuconostoc* et sa : « Définition ; Écologie ; Caractères bactériologiques ; Taxonomie ; Métabolisme des *Leuconostoc* et les aptitudes biotechnologiques de *Leuconostoc* ».
- Le second chapitre exprime les approches méthodologiques et description des techniques qui ont servi à la concrétisation de notre travail.
- Le troisième chapitre reflète comme :

- Première partie les résultats obtenus de différents tests d'identification, caractéristiques biotechnologiques des isolats ainsi que l'étude des interactions avec différentes souches.

- Tandis que la deuxième partie contient la discussion des résultats et leur comparaison avec les différents travaux réalisés et traitant ce genre.

Enfin, la dernière partie est consacrée à la conclusion générale englobant les résultats de ce travail.

**Chapitre I :**

**Le lait**

## Chapitre I : Le lait

### I.1. Définition du lait :

Le lait est le produit intégral de la traite totale d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée, il doit être recueilli proprement<sup>3</sup>. Ce liquide opaque d'une couleur blanche plus ou moins jaunâtre, représente un aliment particulier puisqu'il constitue l'unique source d'alimentation pour le jeune animal naissant et aussi pour les nouveau-nés allaités par le lait maternel<sup>4</sup>.

Le lait est un mélange complexe et riche constitué à 90 % d'eau et présente des caractéristiques communes, il contient : une solution vraie composée de sucre, de protéines solubles, de minéraux et des vitamines hydrosolubles ; d'une solution colloïdale renfermant les protéines principalement les caséines et une émulsion constituée de la matière grasse. La densité du lait est de 1,030 à 1,034, son pH est proche de la neutralité (6,6 à 6,8). En revanche, la composition des constituants protéiques, lipidiques et minéraux peut être différente selon l'espèce<sup>5</sup>.

La composition du lait varie d'une espèce animale à une autre le tableau 1 donne la composition chimique des différents mammifères.

**Tableau 1 : Composants de lait de différentes espèces (Alais, 1984 et Amiot et al., 2002).**

Éléments en g/l	Vache	Chèvre	Brebis	Chamelle
<b>Eau</b>	900-910	900	860	902
<b>Extrait sec total (EST)</b>	125-135	140	190	140
<b>Matières grasses</b>	35-45	45-50	70-75	46
<b>Matières protéiques</b>	30-36	35-40	55-60	36
<b>Caséines</b>	27-30	30-35	45-50	28
<b>Protéines solubles</b>	4-5	6-8	8-10	8
<b>Matières minérales</b>	7.5-8.2	8-10	10-12	7.2
<b>Lactose</b>	40-50	40-45	45-50	50

<sup>3</sup> Desjeux, J.F. « Valeur nutritionnelle du lait de chèvre », *Lait*, 1993, p. 73.

<sup>4</sup> Amiot J., Fournier S., Lebeuf Y., Paquin P. et Simpson R., « composition, propriétés physicochimique, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait. Chapitre I. », 2002, p. 29.

<sup>5</sup> Pellerin, P., « Mise au point Intérêt nutritionnel de lait de chèvre Connaissances actuelles et perspectives », *Ann Pharm*, 2001, p.59.

## **I.2. Le lait de chèvre :**

Le lait de chèvre, comme le lait de vache, est utilisé traditionnellement depuis fort longtemps, Il joue un rôle alimentaire important dans les régions arides. Ce lait est un liquide opaque caractérisé par sa blancheur due à l'absence de bêta carotène (Amiot et al., 2002), sa valeur vient de l'usage pour le nourrisson qui ne peut pas recevoir le lait de sa mère d'une part, et d'autre, son utilisation comme aliment thérapeutique à condition qu'il soit produit dans des conditions d'hygiène parfaites ((Desjeux, 1993).

## **I.3. Composition :**

La composition du lait de chèvre est influencée par des facteurs liés à la race, les différences individuelles à l'intérieur de la même race, la période de lactation, variation saisonnière et aux pratiques d'élevage.

### **I.3.1. L'énergie :**

Le lait de chèvre est une source importante d'énergie, apportant de l'ordre de 700 kcal/L. cette caractéristique peut probablement expliquer de nombreuses observations de gain de poids chez l'enfant malade, l'effet nutritionnel a été véritablement mesuré et comparé à celui du lait de vache par une équipe de pédiatres Malgaches qui a clairement montré qu'il était possible de réalimenter avec succès des enfants malnutris de plus de 1 an. Ainsi donc, si le lait de chèvre est bénéfique dans cette situation extrême, il est logique de le proposer pour maintenir l'état nutritionnel de l'enfant en bonne santé.

### **I.3.2. Les protéines :**

Le lait de chèvre contient un pourcentage inférieur de protéines, ce fait à une répression sur le pourcentage de la caséine, d'environ 2,3% qui donne un rendement fromager inférieur à celui de lait de vache.

Les principaux types de caséines sont identiques, mais généralement, le lait de chèvre est plus pauvre en  $\alpha$ -caséine et plus riche en  $\beta$ -caséine, ce faible taux de  $\alpha$ -caséine explique que le fromage de chèvre à un gout amer moins prononcé puisque ce sont les peptides provenant de l'hydrolyse de cette protéine qui donnent le plus d'amertume. C'est pour ça, le caillé du lait de chèvre est plus friable que celui du lait de vache.

### **I.3.3. Les lipides :**

Ils représentent la principale source d'énergie du lait de chèvre. Les lipides du lait de chèvre, comme ceux du lait de vache, sont pauvres en acides gras polyinsaturés.

Les matières grasses se trouvent sous forme de globules légèrement plus petits avec un diamètre de 2µm (environ de 3-4 µm pour le lait de vache). Comparativement au lait de vache, les matières grasses du lait de chèvre ne contiennent pas de caroténoïdes. Les triglycérides de lait de chèvre sont plus sujets à la lipolyse, laquelle provoque l'apparition d'une odeur rance, ce qui est due à la lipase naturelle qui se retrouve dans les matières grasses (Amiot et al., 2002).

**Tableau 2 :** Composition en lipides des laits de différentes espèces (Chilliard, 1987).

<b>Composants (%)</b>	<b>Chèvre</b>	<b>vache</b>	<b>Humain</b>
<b>Triglycérides</b>	95	98	97
<b>Glycérides partielles</b>	3	0.5	1
<b>Cholestérol</b>	0.4	0.3	0.6
<b>Phospholipides</b>	1	0.9	1.1
<b>Acides gras libres</b>	0.6	0.4	0.5

#### **I.3.4. Les glucides :**

Comme dans la majorité des laits de mammifères, le lactose représente la principale forme de glucide. Ce disaccharide est normalement hydrolysé par la lactase située sur les cellules épithéliales qui tapissent l'intérieur du tube digestif (Desjeux, 1993). Le pourcentage de lactose est légèrement inférieur dans le lait de chèvre, étant d'environ 4,4%, comparativement à 4,8% pour le lait de vache (Amiot et al., 2002). Les glucides sont également présents sous forme de glycoprotéines et de Glycolipides (Desjeux, 1993).

#### **I.3.5. Les minéraux et les vitamines :**

Les minéraux présents dans le lait de chèvre et le lait de vache sont identiques, sauf que le pourcentage de sodium et de citrate est légèrement inférieur dans le lait de chèvre. Le lait de chèvre renferme plus de calcium, magnésium, potassium et de phosphore que le lait de vache.

Le lait de chèvre est riche en vitamine A, B3, mais il est particulièrement plus pauvre en vitamines C, D, pyridoxine, B12 et acide folique. Le manque de ces deux dernières vitamines peut entraîner l'anémie chez les nourrissons alimentés par lait de chèvre (Amiot et al., 2002).

**Tableau 3 :** Composition moyenne du lait en éléments minéraux majeurs de différentes espèces (Gueguen, 1996).

Composants mg/l	Chèvre	humain	vache	brebis
<b>Calcium</b>	1260	320	1200	1950
<b>Phosphore</b>	970	150	920	1500
<b>Potassium</b>	1900	550	1500	1400
<b>Sodium</b>	380	200	450	460
<b>Chlore</b>	1600	450	1100	1100
<b>Magnésium</b>	130	40	110	180

**Tableau 4 :** Composition moyenne du lait en principaux oligo-éléments indispensables aux différentes espèces (Gueguen, 1996).

Composants µg/l	Chèvre	humain	vache	brebis
<b>Zinc</b>	3400	3000	3800	5000
<b>Fer</b>	550	600	460	700
<b>Cuivre</b>	300	360	220	400
<b>Manganèse</b>	80	30	60	90
<b>Iode</b>	80	80	70	100
<b>Sélénium</b>	20	20	30	30

**Tableau 5 :** Composition vitaminique du lait de différentes espèces (Jaubert, 1996).

Composants pour 100 g	chèvre	vache	Humain
<b>Vitamines liposolubles</b>			
A rétinol mg	0.040	0.035	0.06
Carotène mg	0	0.021	0.025
Vit D µg	0.06	0.08	0.055
E tocophérol mg	0.04	0.11	0.23
<b>Vitamines hydrosolubles</b>			
B1 thiamine mg	0.05	0.04	0.02
B2 riboflavine mg	0.14	0.17	0.035
B3 niacine mg	0.27	0.09	0.16

B5 acide pantothénique mg	0.31	0.34	0.18
B6 pyridoxine mg	0.05	0.04	0.01
B8 biotine µg	2	2	0.7
B9 acide folique µg	1	5.3	5.2
B12 cobalamine µg	0.06	0.35	0.04
Acide ascorbique mg	1.3	1	4

#### **I.4. Les valeurs thérapeutiques**

L'atout principal du lait de chèvre se situe au niveau de la digestibilité supérieure de ses protéines et ses lipides, il a plusieurs effets bénéfiques sur la santé humaine : le traitement de troubles de nutrition chez les bébés, traitement d'ulcère de l'estomac, arthrite, eczéma... (Amiot et al., 2002).

# **Chapitre II : Les bactéries lactiques**

## Chapitre II : Les bactéries lactiques

### II.1. Définition :

Les bactéries lactiques sont très anciennes et sont apparues avant les cyanobactéries, il y a près de 3 milliards d'années<sup>6</sup>.

La première culture pure était des *Bacterium lactis* probablement des *Lactococcus lactis*, obtenue par Lister en 1873 (Ho, 2008). Les bactéries lactiques ont été isolées pour la première fois à partir du lait<sup>7</sup>.

Les bactéries lactiques sont définies comme des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes (De Roissart, 1986).

Les bactéries lactiques sont utilisées depuis des millénaires dans l'alimentation humaine (Penaud, 2006). La découverte de leur action sur le lait fut probablement accidentelle mais leur utilisation fut perpétuée sous forme de levains, simple récupération d'une partie du milieu de fermentation.

La fermentation confère aux aliments une saveur et une texture particulière, permet de mieux les conserver et apporte aussi certains bénéfices nutritionnels et de santé.

Malgré leur importance économique, les bactéries lactiques n'ont pas toujours reçu l'attention nécessaire ni de la part des microbiologistes ni de celle des industriels. Depuis quelques années, elles deviennent un sujet d'étude privilégié de par le monde (Novel G., 1993).

### II.2. Caractéristiques principales des bactéries lactiques :

Le groupe des bactéries lactiques a été défini par Orla-Jensen (1919) et réunit plusieurs genres caractérisés par leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique (Novel G., 1993).

Les bactéries lactiques sont un groupe de bacilles ou coccobacilles ont pour principales caractéristiques d'être : à Gram positif, généralement immobiles, asporulés, anaérobies mais

---

<sup>6</sup> (Tailliez, 2001)

<sup>7</sup> (Metchnikoff, 1908; Sandine et al., 1972; et Carr et al., 2002)

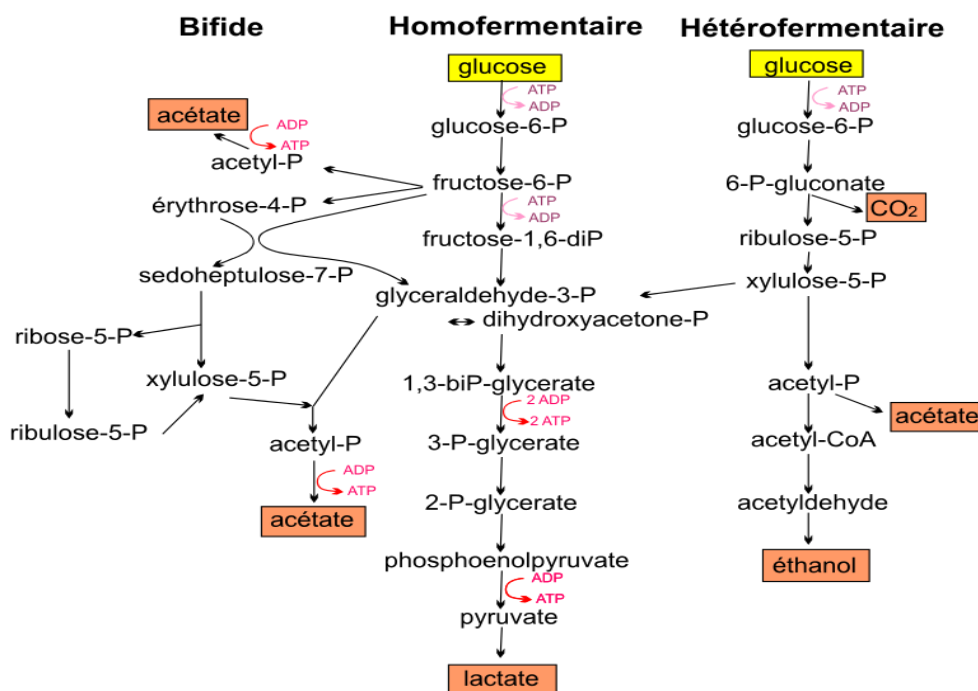
aérotolérantes, dépourvus de cytochromes-oxydase et de nitrate-réductase, ne possède pas la catalase (certaines souches possèdent une pseudo-catalase) (Dellaglio et al., 1994 ; Carr et al., 2002 ; Axelsson, 2004).

Pour se développer, elles ont besoin de sources de carbone organique (glucides fermentescibles) et de nombreuses bactéries lactiques ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés ou les peptides, les vitamines et les acides gras (Prescott et al., 1999).

Les bactéries lactiques sont un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme fermentaire. Selon le type de fermentation préférentiellement utilisé, les bactéries lactiques sont dites :

- **Homofermentaires** : l'acide lactique est le seul produit de la fermentation du glucose.
- **Hétérofermentaires** facultatif : la fermentation du glucose aboutit à la formation d'acide lactique ou de l'acide lactique et de l'acide acétique.
- **Hétérofermentaires** strict : elles produisent, en plus de l'acide lactique, de l'acide acétique ou de l'éthanol et du CO<sub>2</sub>.

**Figure 1** : Principales voies assurant le transport et le métabolisme du glucose par les bactéries lactiques (Desmazeaud et De Roissart, 1994).



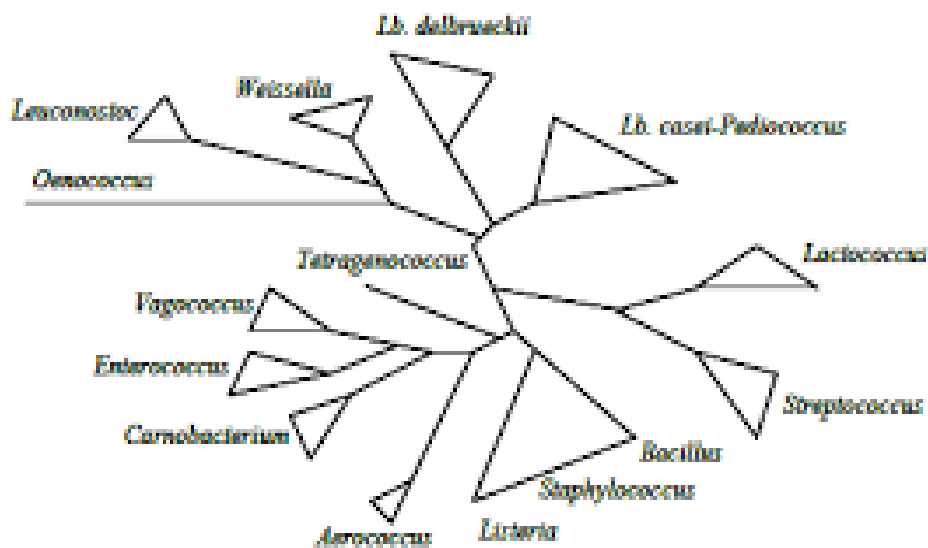
Beaucoup de ces caractères sont typiques et servent à définir le « cœur » du groupe lactique que les recherches taxonomiques et phylogéniques (ou phylogénétiques) sont en train de modifier de façon significative, soit au niveau des genres et des espèces, soit au niveau de la ligne de démarcation avec d'autres groupes de bactéries (Dellaglio et al., 1994).

### II.3. Classification des bactéries lactiques :

La systématique est en évolution permanente. Il n'y a jamais eu de règles unanimement reconnues sur la façon dont deux bactéries différentes devraient être phénotypiquement classées. Par exemple, quelles caractéristiques sont importantes dans la définition des sous espèces, des espèces et du genre ? La littérature scientifique suit généralement les recommandations des comités de taxonomie qui opèrent sous les auspices de l'Union internationale de Sociétés Microbiologiques (Sneath, 2001).

La première classification des bactéries lactiques basée sur les propriétés observables à savoir les propriétés morphologiques, biochimiques et physiologiques a été établie en 1919 par Orla Jensen.

**Figure 2 :** Schéma montrant l'arbre phylogénique des bactéries lactiques y compris des genres apparenté (Axelsson, 2004).



D'après Ludwig et al. (2008), le phylum Firmicutes comprend trois classes :

*Bacilli*, *Clostridia* et *Erysipelotrichi*. Appartenant à la classe *Bacilli*, les bactéries lactiques sont divisées en trois familles :

- Famille des *Lactobacillaceae* comportant les *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* et *Pediococcus*.
- Famille des *Leuconostocaceae* contenant les *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*.
- Famille des *Streptococcaceae* comprenant les *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Lactovum*.

Historiquement, le genre *Bifidobacterium* était aussi considéré comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques grâce à la similarité de ses propriétés physiologiques et biochimiques et à sa présence dans le même habitat écologique, tel que le tube gastro-intestinal (Klein et al., 1998).

#### **II.4. Les différents genres :**

La classification actuelle des bactéries lactiques fait apparaître douze genres qui incluent :

*Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella* (Stiles et Holzapfel, 1997).

#### **II.5. Méthodes d'identification des bactéries lactiques :**

Les bactéries lactiques ont de nombreuses propriétés métaboliques dont les industriels. Ces propriétés (technologiques, sensorielles antimicrobiennes ou probiotiques) sont spécifiques de l'espèce, ce qui implique qu'on puisse les mettre en évidence par des techniques d'identification et de différenciation.

##### **II.5.1. Méthodes classiques :**

Les caractéristiques phénotypiques ont généralement servi de point de départ pour plusieurs tests sophistiqués et constituent la base de différenciation et d'identification des bactéries lactiques. Différents tests clefs sont largement adoptés. La morphologie ainsi que les méthodes physiologiques, métaboliques/biochimiques et chimiotaxonomiques sont les plus utilisées.

Schillinger et Lücke (1987) ont été les premiers à proposer une clef d'identification des bactéries lactiques de la viande basée sur la comparaison des caractéristiques physiologiques et biochimiques typiques des différentes espèces (Ammor, 2004).

Plus les méthodes mentionnées en dessus, il y a aussi la technique sérologique. Pour les bactéries lactiques, l'analyse sérologique de fait principalement suivant la méthode de Lancefield (1933), basée sur l'utilisation de polysaccharides de l'enveloppe cellulaire en tant qu'antigènes (Curk et al., 1994).

### **II.5.2. Méthodes moléculaires :**

Les méthodes modernes d'identification des bactéries lactique font appel à l'étude des constituants des cellules.

Le séquençage de l'ARN 16S reste l'une des méthodes les plus appliquées pour obtenir une identification précise en complément des méthodes classiques. Cependant plusieurs méthodes d'identification par PCR, plus abordables en routine se sont développées pour l'identification des bactéries lactiques.

Pour la différenciation intraspécifique, les différentes méthodes moléculaires, comme composition en base de l'ADN : G+C%, l'hybridation ADN/ADN et ADN/ARN, l'analyse des fragments de restriction de l'ADN par l'électrophorèse en champ pulsé (R-ECP), les profils protéiques par SDS-PAGE, sont généralement couplées et permettent l'analyse de la biodiversité des isolats dans un écosystème donné.

### **II.6. Bactéries lactiques et fermentation alimentaire :**

L'utilisation de la fermentation par l'homme remonte à des temps très anciens. Les ferments lactiques, contenant une ou plusieurs cultures pures en proportions définies de différentes bactéries lactiques, sont largement utilisés en agroalimentaire (Holzapfel, 2002).

Les bactéries lactiques interviennent dans de nombreuses transformations du lait (crème maturée, laits fermentés comme le yaourt, fromages frais et affinés), mais également dans la vinification (fermentation malolactique), la fabrication des salaisons, la fermentation des végétaux (choucroute et ensilages) et en boulangerie traditionnelle (Desmazeaud, 1998).

**Tableau 6** : Principaux produits issus de la fermentation des bactéries lactiques (Penaud, 2006).

Genre	Substrat	Exemples de produits
<i>Bifidobacterium</i>	Lait	laits fermentés
<i>Lactobacillus</i>	Lait	Yaourts, laits fermentés, kéfirs, fromages
	Viande	Saucissons secs, jambons secs
	Végétaux	Choucroute, olives, "yaourts" au lait de soja
	Céréales	pain au levain, bières
<i>Lactococcus</i>	Lait	fromages, kéfirs
<i>Leuconostoc</i>	Végétaux	Choucroute, olives, vin
	Lait	fromages, kéfirs
<i>Pediococcus</i>	Végétaux	Choucroute
	Viande	saucisses semi-séchées
<i>Oenococcus</i>	Végétaux	vin
<i>Streptococcus</i>	Lait	yaourts, laits fermentés, fromages

### II.7. Bactéries lactiques et santé humaine :

Dans le domaine de la santé, certaines bactéries lactiques spécifiques sont utilisées comme probiotiques c'est-à-dire des micro-organismes vivants dont l'application à l'homme ou à l'animal exercent un effet bénéfique sur ce dernier par amélioration des propriétés de la flore intestinale. Les espèces couramment utilisées sont *Lb. Acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. johnsonii*, *Lb. reuteri*, *Lb. delbruecki, subsp bulgaricus* (Salminen et al., 2004). Les souches lactiques sont également utilisées dans le traitement de certaines infections telles que les diarrhées, les allergies alimentaires. D'autres effets, comme la prévention des gastro-entérites nosocomiales chez le nourrisson, des propriétés anticancérigènes, antihypercholestérolémiques, lutte contre *Clostridium difficile* et *Helicobacter pylori*, prévention des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

### II.8. Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques :

On reconnaît depuis longtemps, aux bactéries lactiques, la propriété de produire des substances antibactériennes leur permettant de se développer préférentiellement dans divers écosystèmes. L'activité antagoniste des bactéries lactiques est due aux métabolites excrétés : l'acide lactique

et autre acides organiques, peroxyde d'hydrogène, diacétyle, reutéline et les bactériocines (Leveau et al., 1991 ; Klaenhammer et al., 1994 ; De Vuyst et Leroy, 2007).

### **II.8.1. Les acides organiques :**

Le métabolisme principal des bactéries lactiques a pour effet une production importante des acides organiques. Les acides organiques sont produits soit par les bactéries homofermentaires, soit par les bactéries hétérofermentaires. Le métabolisme du pyruvate conduit à la formation uniquement d'acide lactique chez les homofermentaires tandis qu'il conduit à la formation d'acide lactique, acétique et formique, d'éthanol et de dioxyde de carbone chez les hétérofermentaires (Liu, 2003).

En général, les acides organiques ont différentes actions telles qu'un excellent pouvoir bactéricide ou un effet bactériostatique contre les micro-organismes pathogènes se trouvant dans le tube digestif. Les acides organiques sont un des agents classiques de préservation des aliments (Brul et Coote, 1999) et sont reconnus comme des additifs alimentaires.

### **II.8.2. Le peroxyde d'hydrogène :**

L'intervention du peroxyde d'hydrogène dans les phénomènes d'inhibition par les bactéries lactiques a été établie en 1951 Wheater et al., mettent en évidence l'inhibition de *Staphylococcus aureus* par *Lactobacillus lactis* et l'attribuent à une « lactobacilline ». Dès 1952 ils montrent que l'agent inhibiteur est en fait le peroxyde d'hydrogène produit par le lactobacille (Mathot et al., 1996).

Les bactéries lactiques sont catalase négatives et certaines souches peuvent accumuler du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Le peroxyde d'hydrogène est, depuis longtemps, reconnu comme un agent majeur de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques en particulier celle des lactobacilles. Il peut s'accumuler et être inhibiteur de différents micro-organismes par l'oxydation des lipides membranaires et la destruction des structures des protéines cellulaires (Zalan et al., 2005).

### **II.8.3. Le dioxyde de carbone :**

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

#### II.8.4. Le diacétyl :

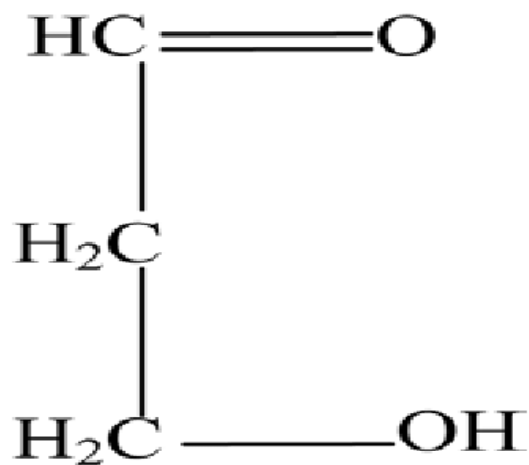
Le diacétyl produit par nombre de bactéries lactiques est un inhibiteur actif contre de nombreux microorganismes, bactéries ou moisissures. Le diacétyl (C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>) est un des composants aromatiques essentiels du beurre. L'action inhibitrice est accrue en milieu acide, les bactéries Gram-négatives sont plus sensibles que les bactéries Gram-positives ((Mathot et al., 1996).

#### II.8.5. La reutérine :

Axelsson et al., (1989) ont mis en évidence l'action inhibitrice d'une substance produite par *Lactobacillus reuteri*. Cette substance (reutérine) a été purifiée et identifiée.

La reutérine (ou 3-hydroxypropionaldehyde) est une substance antimicrobienne qui est produite comme métabolite intermédiaire pendant la fermentation anaérobique du glycérol. La reutérine a un large spectre d'activité. Elle a une action contre les procaryotes (Gram-positif ou Gram-négatif), les eucaryotes, les virus, les champignons et les protozoaires. Elle a des applications aussi bien dans le domaine médical que dans le domaine alimentaire (Vollenweider, 2004).

**Figure 3 :** Structure de la reutérine, 3-hydroxypropanal (Axelsson, 2004).



#### II.8.6. Les bactériocines :

La détection de la première bactériocine remonte à 1925 par André Gratia qui a observé que la croissance de certaines souches d'*Escherichia coli* a été inhibée en présence d'un composé antibactérien, dont il a donné le nom de colicin V. En 1953, Jacob et al. proposèrent le terme général « bactériocine ». Les bactériocines diffèrent de la plupart des antibiotiques thérapeutiques par leur composition protéique et possèdent généralement une spécificité d'action étroite contre les mêmes espèces (Tagg et al., 1976).

Klaenhammer (1988) définit les bactériocines comme des protéines, ou complexes de protéines, avec une activité bactéricide contre des espèces proches de la souche productrice. Les bactériocines représentent une large classe de substances antagonistes qui varient considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leur spectre d'action et de leur mode d'action (Klaenhammer, 1988). Toutes les bactériocines produites par des bactéries lactiques décrites jusqu'à présent ont une activité dirigée contre les bactéries Gram-positives.

### **II.8.7. Propriétés probiotiques :**

Fuller (1989) définit les probiotiques comme étant des « préparations microbiennes vivantes, utilisées comme additif alimentaire, ayant une action bénéfique sur l'animal hôte en améliorant la digestion et l'hygiène intestinale ». Guarner et Schffsma (1998) proposent de modifier cette définition en incluant tous les « microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en un certain nombre, exercent des effets bénéfiques dans le tractus intestinal. Le sujet doit toutefois ingérer 10<sup>9</sup> UFC par jour pour qu'un effet probiotique soit observé (Ouwehanf et al., 2002).

Les données épidémiologiques des dernières années indiquent que la consommation de bactéries lactiques probiotiques est sans danger pour la santé de l'hôte. Dans un souci de sécurité alimentaire, un ensemble de tests visant à contrôler l'innocuité des souches probiotiques a été proposé par (Salminen et al., 1996) (Tableau 6). En l'absence de modèles précis permettant l'évaluation des modes d'actions, les microorganismes employés aujourd'hui comme probiotiques en alimentation humaine doivent :

- Etre résistants aux enzymes pancréatiques, à l'acidité et aux sels biliaires (survie au passage dans le tractus intestinal) ;
- Etre capable d'adhérer aux muqueuses intestinales (rôle immuno-modulateur, exclusion des pathogènes, aide à la guérison des muqueuses, colonisation) ;
- Etre d'origine humaine (spécificité des interactions avec l'hôte) ;
- Avoir une action prouvée sur la santé ;
- Etre d'origine pour l'hôte ;
- Posséder des bonnes propriétés technologiques (stabilité de la souche, production à grande échelle, tolérance à l'oxygène) (Ouwehand et al., 2002).

**Tableau 7 :** Tests évaluant l'innocuité des bactéries lactiques probiotiques (d'après Salminen et al., 1996)

<b>Domaines étudiés</b>	<b>Test d'innocuité à réaliser</b>
<b>Propriétés intrinsèques</b>	existence de facteurs d'adhésion capacité à résister aux antibiotiques existence de plasmides et de possibilité de transfert plasmidique existence des enzymes nuisibles
<b>Métabolites produits</b>	estimation de la concentration en métabolites estimation de l'innocuité des métabolites existence d'effets autres que probiotiques
<b>Toxicité</b>	estimation des effets (aigus et subaigus) de "ingestion d'une grande quantité de bactéries test
<b>Effets sur les muqueuses</b>	capacité d'adhésion existence d'un potentiel invasif capacité de dégrader le mucus intestinal capacité à infecter des animaux immunodéprimés (irradiés)
<b>Effet dose-réponse</b>	étude dose-réponse lors d'administration orale sur des volontaires
<b>Evaluation clinique</b>	existence d'effets secondaires potentiels évaluation clinique sur des volontaires bien portants études spécifiques sur la maladie ciblée
<b>Etudes épidémiologiques</b>	surveillance d'une large population après introduction de nouvelles souches probiotiques ou de nouveaux produits probiotiques.

# **Chapitre III : Les leuconostocs**

## Chapitre III : Les leuconostocs

### III.1. Définition des Leuconostocs:

Les *Leuconostocs* (le genre *Leuconostoc*) sont des bactéries lactiques à Gram positif, de la famille des *Leuconostocaceae* de l'ordre *Lactobacillales*. Ils sont reliés sur le plan phénotypique aux *Lactobacillus* et aux *Pediococcus* et partagent beaucoup de caractères avec les lactobacilles hétérofermentaires (Wilhelm et Wood, 1995).

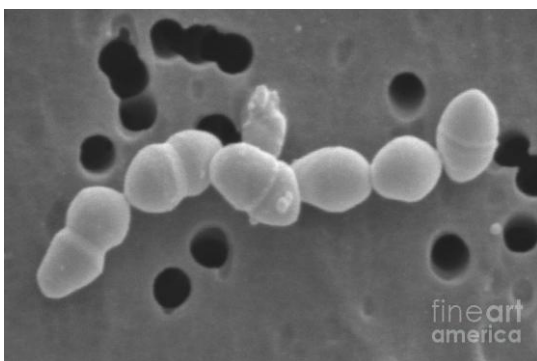
Le terme scientifique *Leuconostoc* est dérivé du grec leukos « clair, blanc » et nostoc « algue », car les *leuconostocs* peuvent apparaître à l'examen microscopique (Figure 4), sous forme de cellules sphériques immobiles, non pigmentés souvent lenticulaires après culture sur gélose, regroupées par deux ou en chaînes (Devoyod J.J. et Françoise Poullain, 1988).

**Figure 4:** Images de *Leuconostoc*.

A)



B)



A) -Observation des *Leuconostoc carnosum* au microscope optique (x100).

B) -Observation des *Leuconostoc lactis* au microscope électronique.

### III.2. Écologie :

Les *Leuconostoc* se rencontrent dans la nature et font partie de la microflore de la plupart des champs cultivés. On les retrouve souvent sur les plantes (en particulier la betterave à sucre d'où leur ancien nom de *Betacoccus*) et dans divers aliments comme le lait et les produits laitiers fermentés (fromages, kéfir) (Devoyod et Poullain, 1988), les végétaux fermentés (vin, cidre, olives, choucroute), la viande réfrigérée (Wilhelm et Wood, 1995) et le sang humain (Thunell, R.K. et al., 1995).

Les espèces couramment trouvées dans le lait et les fromages fabriqués au lait cru sont les espèces *L. mesenteroides*, avec les sous-espèces *dextranicum* et *mesenteroides*, puis *L. citreum* (Cibik et al., 2000).

*Leuconostoc* n'est généralement pas considéré comme faisant partie de flore humaine bien que des souches ont été isolées à partir de déchets humaine, des échantillons vaginaux et des échantillons de lait maternel (Hemme et Foucaud - Scheunmann, 2004).

### III.3. Caractères bactériologiques :

Les *Leuconostoc* "laitiers" se développent le mieux à un pH proche de celui du lait et sont inhibés en milieu acide. Leur croissance s'arrête lorsque le pH interne de la cellule atteint 5,4-5,7 (Mc Donald et al., 1990). Le pH externe d'inhibition dépend de la nature de l'acide organique présent (Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004). En présence d'acide lactique, des souches sauvages de *Leuconostoc sp.*, isolées de fromage au lait cru, ne se développent quasiment plus à un pH de 4,6 (Sánchez et al., 2005).

Les *Leuconostoc* sont généralement mésophiles, avec une température optimale de croissance de 25 - 30°C, et anaérobies facultatifs (Garvie, 1984). Ils ne produisent pas d'ammoniac à partir d'arginine, et sont hétérofermentaires stricts, produisant à partir des glucides de l'acide lactique du type (D), du CO<sub>2</sub>, de l'éthanol et parfois même de l'acétate. Leur pouvoir protéolytique est nul. Ils sont intrinsèquement résistants à la vancomycine (Hodwitz et al., 1987; Dyas et Chauhan, 1988).

Ils sont exigeants du point de vue nutritionnel (acides aminés et vitamines). Les souches ne formant pas de dextrane réclament plus de huit acides aminés. En particulier, les *Leuconostoc* laitiers nécessitent pour leur développement les trois acides aminés branchés et la glutamine (Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004), ainsi que les vitamines acides nicotinique, biotine, thiamine et acide pantothenique (Garvie, 1984). Seule, l'espèce *Ln. lactis* est capable d'acidifier

le lait ; au contraire, l'espèce *Ln. Mesenteroides* n'acidifie le lait que très lentement (Garvie, 1984) ou en présence d'extrait de levures (Sandine et al., 1962).

Par ailleurs, les *Leuconostoc* laitiers ont besoin de traces de manganèse pour avoir une croissance et une production de composés de flaveur correcte (Vedamuthu, 1994).

Les *Leuconostoc* possèdent un métabolisme de l'O<sub>2</sub>, revue par (Hemme et Foucaud Scheunemann (2004) qui leur permet de se développer plus vite, d'atteindre une biomasse plus importante et de réduire les quantités d'éthanol produites au profit de celles d'acétate.

#### **III.4. Taxonomie :**

Le genre *Leuconostoc* est un groupe de bactéries lactiques, il regroupe 15 espèces :

*Ln. Carnosum*, *Ln. Citreum*, *Ln. durionis*, *Ln. fallax*, *Ln. ficulneum* : *Ln. fructosum*, *Ln. garlicum*, *Ln. gasicomitatum*, *Ln. gelidum*, *Ln. Inhae*, *Ln. kimchii*, *Ln. Lactis*, *Ln. mesenteroides*, *Ln. pseudoficulneum*, *Ln. pseudomesenteroides* (Gu et al., 2012).

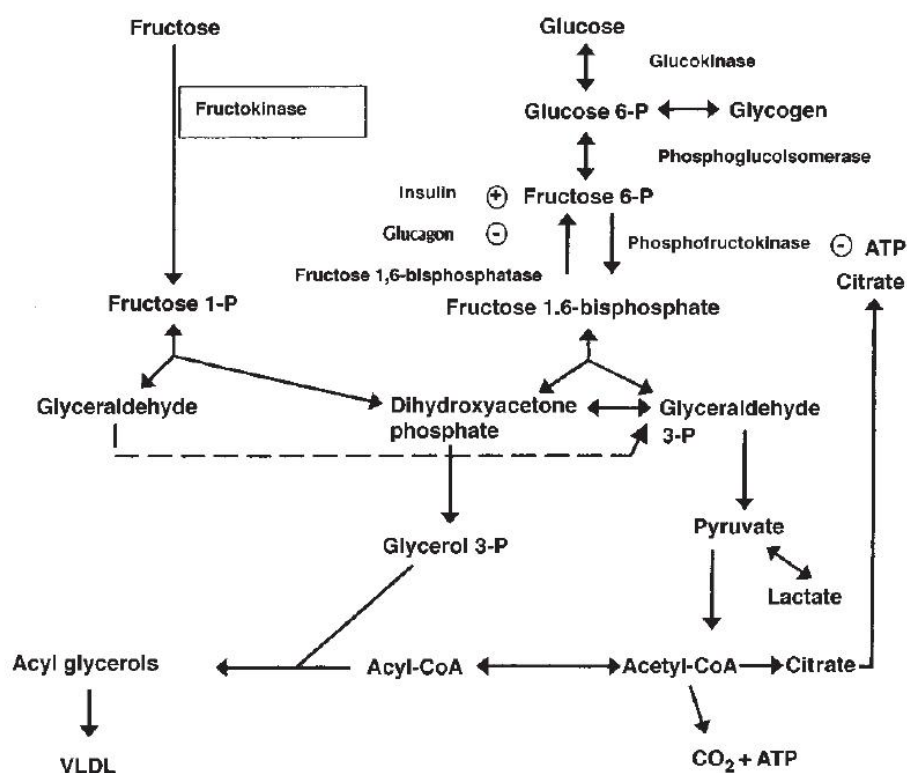
#### **III.5. Métabolisme des Leuconostoc :**

##### **III.5.1. Fermentation des hexoses :**

Les bactéries lactiques sont capables de produire de l'acétaldéhyde et de l'éthanol à partir du glucose (Lees et Jago, 1976). Trois voies principales existent pour la synthèse de l'acétaldéhyde à partir du glucose: la voie d'Embden-Meyerhof, celle d'Etner Doudoroff et la voie des hexoses monophosphates.

Les *Leuconostoc* fermentent le glucose en utilisant cette troisième possibilité. Ils clivent le xylose-5-phosphate en acétyl-phosphate et en glycéraldéhyde- 3-phosphate par action de la phosphocétolase (Figure 5) (Goldberg et al., 1966).

**Figure 5** : Schéma simplifié du cométabolisme sucre-citrate de *Leuconostoc mesenteroides* (Bourel et al., 2001).



Les *Leuconostocs* ne peuvent pas décarboxyler directement, comme certains microorganismes, le pyruvate en acétaldéhyde car ils ne possèdent pas de pyruvate décarboxylase (De moss et al., 1951).

L'acétate est le principal produit terminal du métabolisme des hexoses des souches de *Leuconostocs* par voie oxydative (Ito et al., 1983).

Selon Lucey et Condon (1986) les cultures aérées de *Leuconostocs* croissent plus vite et produisent plus de biomasse, aux dépens du glucose et d'autres sucres, que les cultures non aérées. Ces dernières ne produisent que peu ou pas d'acétate.

### III.5.2. Fermentation des citrates et acides carboxyliques :

Les *Leuconostocs* ne peuvent utiliser le citrate comme seule source d'énergie (comme *Str. lactis subsp. diacetylactis*), ils ne peuvent le métaboliser qu'en présence d'un sucre fermentescible (Kempler et Mckay, 1981).

D'autres espèces de *Leuconostocs* sont capables d'utiliser le citrate mais sans produire de diacétyle ni d'acétoïne. La presque totalité des 210 souches de *Ln. mesenteroides ssp.*

*mesenteroides* et *Ln. mesenteroides ssp. dextranicum* isolées par des produits laitiers, du matériel et de la vaisselle laitière, donnaient une réaction positive lorsqu'elles étaient cultivées sur le milieu de Kempler et McKay (1980) mais elles ne produisaient pas d'acétoïne lorsque nous utilisons la technique de Swartling (1951). Par contre les deux souches de *Str. lactis ssp. diacetylactis* et *Ln. cremoris* utilisées comme témoins donnaient, dans les mêmes conditions de culture, un résultat positif. En technologie laitière il est reconnu que le principal rôle des Leuconostocs est de produire des composés d'arôme; c'est la raison pour laquelle les voies métaboliques d'utilisation du citrate par *Ln. mesenteroides ssp. mesenteroides* ou *Ln. mesenteroides ssp. dextranicum* n'ont pas été étudiées (Hegazi et Abo-Elnaga, 1980).

### **III.6. Les aptitudes biotechnologiques de Leuconostoc :**

#### **III.6.1. Production de dextranses :**

De nombreux microorganismes sont capables de produire des exopolysaccharides c'est-à-dire des polysaccharides à l'extérieur de la paroi cellulaire qui sont, soit attachés à cette paroi sous forme de capsule, soit excrétés dans l'environnement extracellulaire sous forme de gomme. (Sutherland, 1982) a classé les exopolysaccharides selon leur composition.

Il est donc possible pour les *Leuconostocs* de produire des dextranses de structure et de composition très différentes d'autant qu'il existe une relation biosynthétique entre les dextranses solubles et les dextranses insolubles produits par une même souche de *Leuconostoc* (Smith, 1970) et que la dextransucrase de ce microorganisme peut prendre des formes multiples (Kobayashi et Matsuda, 1986).

La production de dextrane à partir de saccharose est un caractère important de différenciation des espèces de *Leuconostoc* (Garvie, 1967).

Le dextrane est un groupe de polysaccharides de haut poids moléculaire qui sont synthétisés à partir du saccharose et composée par des chaînes d'unités de D-glucose (Kim et Robyt, 1995 in : Shah Ali UL et al., 2005).

Les dextranses industriels sont actuellement utilisés dans la fabrication de gel de filtration et comme diluant de volume sanguin et améliorant de la circulation sanguine (Hemme et al., 2004). En technologie laitière, le dextrane comme autre exopolysaccharides, est utilisé comme additif alimentaire, comme gélifiant par l'augmentation de la viscosité et comme stabilisant à travers le renforcement de rigidité du réseau de la caséine (Pucci et al., 1995; Duboc et al., 2001 ; Cooke et al., 2002., Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004).

### III.6.2. Production de substances inhibitrices :

L'effet antimicrobien dû aux bactériocines produites par *Leuconostoc sp.* a été observé pour la première fois dans les années 90 (Ahn et Stiles, 1990). Plus tard, différentes bactériocines produites par *Leuconostoc sp.* ont été isolées (Tableau 7) parmi lesquelles quelques-unes ont été caractérisées.

Parmi ces bactériocines, la leucocine A-UAL 187, produite par *Ln. gelidum* A-UAL 187 (Hastings et al., 1991), la leucocine B-Ta11a produite par *Ln. carnosum* Ta11a (Felix et al., 1994), la mésentéricine Y105 produite par *Ln. mesenteroides subsp. Mesenteroides* Y105 (Hécharde et al., 1992),... (Figure 8). Depuis, de nouvelles bactériocines ont été et sont toujours découvertes (Sawa et al., 2010).

Il a été montré que les bactéries du genre *Leuconostoc* renfermaient un ou plusieurs plasmides de différentes tailles (Dessart et Steenson, 1995). Ces plasmides portent différents systèmes génétiques parmi lesquels celui impliqué dans la biosynthèse des bactériocines (Dessart et Steenson, 1995, Fremaux et al., 1995).

### III.6.3. Pouvoir acidifiant :

Le pH normal du lait est de 6,6. La plupart des microorganismes du lait sont capables de fermenter le lactose en produisant une acidification qui entraîne la coagulation de la caséine. Cette coagulation se produit à partir du pH 4,6. Les fermentations microbiennes responsables de l'acidification sont de type homo ou hétérolactique (Guiraud, 2003).

Les *Leuconostoc* produisant à partir des glucides de l'acide lactique du type (D), du CO<sub>2</sub>, de l'éthanol et parfois même de l'acétate. Seule, l'espèce *Ln. lactis* est capable d'acidifier le lait; au contraire, l'espèce *Ln. mesenteroides* n'acidifie le lait que très lentement (Garvie, 1967).

La présence de *Leuconostoc* stimule également la croissance des *Lactococcus*. Ces deux raisons expliquent pourquoi on inclut les *Leuconostoc* dans les starters de fermentation pour la production de beurre ou de fromages. (Savadogo et Traore, 2011).

### III.6.4. Pouvoir gazeux :

Leur métabolisme du citrate et des oses participe à l'aromatisation des produits laitiers fermentés. Leur production d'acide acétique, de diacétyl et de CO<sub>2</sub>, en inhibant les bactéries psychrotrophes, permettrait d'augmenter la durée de vie de fromages (Vedamuthu, 1994).

Par leur production de CO<sub>2</sub>, les *Leuconostoc* jouent un rôle important dans la fabrication du fromage. Pour que la moisissure de *Penicillium* puisse se développer dans le fromage et lui

donner son aspect persillé, il est nécessaire que le caillé soit « ouvert ». Suivant Devoyod et Muller ,1969 ; l'ouverture que l'on observe au cours des 48 premières heures qui suivent l'emprésurage, semble être due à l'action des *Leuconostoc*.

### **III.6.5. Utilisation des *Leuconostoc* comme levains d'arôme :**

Les *Leuconostoc* entrent couramment dans la composition de levains utilisés pour la fabrication de nombreux produits laitiers, tels le fromage de Roquefort (Devoyod et al., 1988), le fromage de Laguiole (Didienne et al., 1978), le fromage de Manchego (Ramos et al., 1981).

Mostert et Hus- Mann (1975) ont trouvé des *Leuconostocs* dans des levains commerciaux utilisés pour la fabrication du Gouda en Afrique du Sud.

Les *Leuconostoc* rentrent dans la composition de la flore bactérienne des levains lactiques mésophiles. (Cogan ,1980) subdivisent les levains mixtes en quatre groupes selon leur composition en bactéries d'arôme:

- Les levains du type B (B comme *Betacoccus*) contiennent des *Leuconostocs* producteurs d'arôme tels que *L. cremoris*, *L. dextranicum* et/ ou *L. lactis* ;
- Les levains du type D contiennent *S. lactis subsp. diacetylactis* comme producteur d'arôme;
- Les levains du type BD contiennent à la fois des *Leuconostocs* et *S. lactis subsp. diacetylactis* comme producteurs d'arôme;
- Les levains du type N ou 0 ne contiennent pas de bactéries aromatiques.

Les principales fonctions demandées aux levains lactiques sont d'après (Stadhouders, 1974): la production d'acide, la protéolyse, la lipolyse, la production de gaz et d'arôme et l'inhibition des bactéries indésirables (pathogènes entre autres).

C'est pourquoi les *Leuconostocs* sont toujours utilisés dans des levains mixtes en association avec des bactéries lactiques acidifiantes, notamment des lactocoques (André Eck et al., 2006).

### **III.6.6. Utilisation des *Leuconostoc* Pour éliminer certains défauts de goût :**

L'acétaldéhyde est un produit du métabolisme des streptocoques lactiques mésophiles.

Une petite quantité d'acétaldéhyde est reconnue comme participant à l'obtention d'un bon arôme; par contre une surproduction de ce composé par rapport au diacétyl provoque un défaut dit de « vert » ou « d'âtre » (Lindsay et al., 1965). Selon Keenan et al. (1966) il est possible

d'éliminer le défaut de « vert » d'une culture de bactéries lactiques en utilisant les *Leuconostoc* ; mais pour cela il est nécessaire d'en ajouter une grande quantité.

### **III.6.7. Leuconostoc comme agent contaminé :**

Ils ont été associés à des défauts de présentation, gonflement, de certaines variétés de fromages (Devoyod J.J. et Françoise Poullain, 1988). Certaines espèces peuvent produire des amines biogènes qui peuvent provoquer des intoxications alimentaires, comme cela a été rapporté dans les vins (Moreno - Arribas et al., 2003). Par contre, aucune étude, à notre connaissance, n'a identifié d'amines biogènes produites par les *Leuconostocs* dans les fromages (Gonzalez de Llano et al., 1998 ; Bover Cid and Holzapfel, 1999).

Ils provoquent des altérations dans les boissons sucrées et les sirops, mais ils ne sont ni hémolytiques ni pathogènes. Les *Leuconostocs*, cités parfois comme des pathogènes opportunistes chez l'homme, sont cependant reconnus comme inoffensifs et peuvent donc être utilisés pour fermenter des produits laitiers (Ogier et Serror, 2008).

**Chapitre IV :**

**Les bactéries**

**pathogènes**

## **Chapitre IV : Les bactéries pathogènes**

### **IV.1. Escherichia Coli**

Découverte en 1885 par Théodore Escherich, *Escherichia coli* est une entérobactérie retrouvée en abondance dans la flore commensale humaine, en particulier dans le tube digestif de l'homme qu'elle colonise dès les premières heures de la naissance. Elle constitue l'espèce dominante de la flore aérobie anaéro-tolérante. (AHOYO et al., 2007).

#### **IV.1.1. Caractères morphologiques et biochimiques :**

Les *E. coli* ont une morphologie habituellement typique, sous forme de bacilles à Gram négatif de 2 à 3 µm de long sur 0,5 µm de large, généralement polymorphes. Ils possèdent des caractères biochimiques particuliers permettant de le différencier des autres espèces (GRINIONT, 1987). Les principaux caractères sont: absence de production d'oxydase, absence d'uréase, fermentation du lactose, production d'indole, absence de croissance sur le citrate et pas de production de H<sub>2</sub>S (MINOR et RICHARD, 1993).

La plupart des souches d'*E. Coli* se multiplient rapidement (18 à 24 h) sur les milieux habituels. Les colonies ont en moyenne 2 mm de diamètre, elles sont rondes, plates et à bords réguliers (VERNOZY et MONTET, 2001).

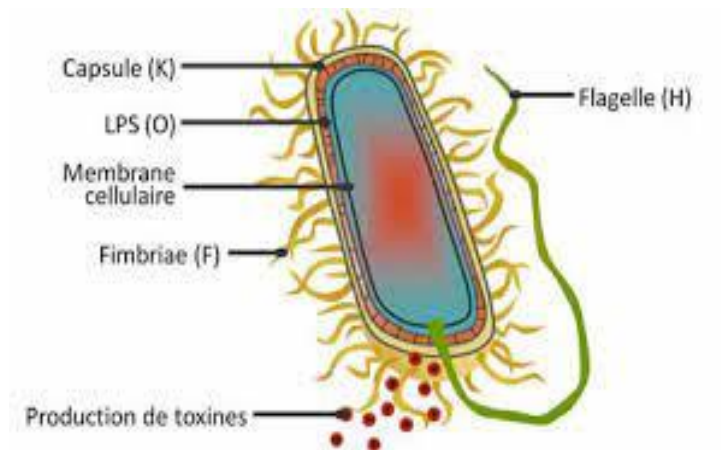
Ce sont des bactéries mésophiles : la température optimale de croissance est de 37°C et le potentiel d'Hydrogène (pH) optimal est de 7,2 - 7,4. La limite de croissance inférieure se situe aux environs de 7°C (HANES et NONTYPHOID, 2003).

#### **IV.1.2. Pouvoir pathogène :**

*E. coli* est aussi à l'origine d'infections communautaires et hospitalières. C'est l'un des germes le plus fréquent des infections néonatales (QUINET et al., 2010), et en particulier les méningites ou les septicémies néonatales.

Elle est une cause fréquente de bactériémie (MELZER et PETERSEN, 2007). Elle provoque 40% à 50% de toutes les infections nosocomiales. (VERHAEGEN, 2004). L'infection urinaire est considérée comme une infection grave chez le nouveau-né, Le germe le plus fréquemment en cause est l'*E. Coli* (60 %) (ATMANI et al., 2007).

**Figure 6 :** Facteurs de virulence d'Escherichia coli (HOLZAPFEL et al., 1998)



## **IV.2. Pseudomonas aeruginosa :**

C'est une bactérie pathogène opportuniste actuellement connue sous le nom de *P. aeruginosa* a reçu plusieurs noms à travers son histoire sur la base de ses cultures de coloration bleu-vert caractéristique produisant le plus souvent des pigments de pyocyanine et de pyoverdine, ainsi que son odeur aromatique caractéristique (seringat). Le chirurgien Charles-Emmanuel Sedillot en 1850 fut le premier à observer que la coloration de pansements chirurgicaux a été associée à un agent transmissible (Lister, Wolter et al. 2009). C'est en 1869 que Fordos a souligné que la coloration était due à un pigment bleu cristallin appelé pyocyanine (Williams and Cameron 1894). *P. aeruginosa* a été isolé pour la première fois treize ans plus tard en 1882 par Gessard qui a démontré que ce pigment a été le produit d'un organisme, *Bacillus pyocyaneus* (bacille pyocyanique) (Gessard, 1984).

### **IV.2.1. Caractères morphologiques et biochimiques :**

Il s'agit d'un bacille à Gram négatif ubiquitaire, présent notamment dans le sol et dans les milieux aquatiques, non sporulant, non capsulé, de forme droite ou légèrement courbée. Il mesure de 1 à 5  $\mu\text{m}$  de long et de 0,5 à 1  $\mu\text{m}$  de large (KADRI et al., 2010).

Bien que ce pathogène, ayant un métabolisme oxydatif, non fermentaire, aérobie stricte, plusieurs isolats ont montré une capacité à croître en milieu anaérobie. *P.aeruginosa* est une bactérie mobile grâce à la présence d'un flagelle monotriche polaire. Cette bactérie est catalase positive et oxydase positive (CHOMARAT et al., 2004).

Elle possède une versatilité nutritionnelle remarquable pouvant utiliser une variété de sucres simples et complexes, d'alcools et d'acides aminés comme seule source de carbone, mais

également en absence d'oxygène elle peut utiliser les nitrates comme accepteur d'électrons (Van Alst, Wellington et al. 2009).

#### **IV.2.2. Pouvoir pathogène :**

*P.aeruginosa* présente un niveau élevé de résistance naturelle aux antibiotiques. Ainsi, les molécules habituellement actives sur cette bactérie sont de nombre limité. (Mesaros, Nordmann et al. 2007). Malheureusement, la perspective d'avoir de nouveaux agents antipseudomonal à l'utilisation clinique dans un avenir proche n'est pas prometteur (Lister, Wolter et al. 2009).

#### **IV.3. Staphylococcus aureus :**

Pasteur a observé, en 1879, dans des pus de furoncle et d'ostéomyélites « un organisme unique, formé de petits points sphériques, réunis par couple, rarement par quatre, mais très fréquemment associés en amas. ». Les Staphylocoques, qu'il venait de décrire, sont des cocci à Gram positif très répandus dans la nature (eaux, sol, air...) et responsables d'un très grand nombre d'infections chez l'homme et l'animal (Berche, 1989).

##### **IV.3.1. Caractères morphologiques et biochimiques :**

Les staphylocoques apparaissent à l'examen microscopique comme des cocci à Gram positif, bactéries sphériques de 0,8 à 1 µm de diamètre, regroupés en diplocoques ou en petits amas (grappe de raisin). Ils sont immobiles, asporulés, habituellement sans capsule. Ces bactéries sont aéro-anaérobies, à métabolisme respiratoire et fermentaire, cultivant facilement en 24 heures sur milieux ordinaires. *Staphylococcus aureus* peut être aussi isolé sur milieu sélectif (milieu hypersalé de Chapman), utilisé pour les prélèvements plurimicrobiens (ALAIN et BERNARD, 2002).

Les colonies sont convexes, lisses (smooth) de 1 à 4 mm de diamètre. De nombreuses souches de *S. aureus* produisent un pigment jaune doré ou citrin, non diffusible (caroténoïde), et sont hémolytiques sur gélose au sang. Toutes les espèces du genre *Staphylococcus* sont catalase positive. L'espèce *S. aureus* est capable de fermenter le mannitol et de produire des enzymes extracellulaires (staphylocoagulase, ADNase), et il est possible de mettre en évidence la protéine A de paroi chez près de 90% des souches. Cette espèce est séparée en quatre biotypes (A, B, C, D) d'après des caractères enzymatiques métaboliques et lysotypiques (NEUZILLET et al., 2012).

##### **IV.3.2. Pouvoir pathogène :**

Les infections à *S. aureus* ont une symptomatologie très polymorphe et sont particulièrement fréquentes en milieu hospitalier où des souches, souvent résistantes à de multiples antibiotiques,

sont fréquemment sélectionnées par les traitements antibiotiques et propagées à l'occasion de soins infirmiers chez des malades aux défenses affaiblies (Berche, 1989).

Cette bactérie est à l'origine de plusieurs infections, dont on citera les :

- Infections cutanéomuqueuses
- Septicémies
- Infections nosocomiales
- Infections urinaires

**Matériels &**

**Méthodes**

## Matériels et méthodes

Notre étude répond à trois objectifs :

- Isolement et identification des souches de *leuconostoc* à partir de lait cru de chèvre collecté dans la région de l'Ouest Algérien.
- Sélection des souches leuceunostocs productrices de des substances antibactériennes.
- Rechercher la nature des substances inhibitrices.

Afin d'essayer d'obtenir des résultats confirmatifs, le travail présent a pour but principal, l'étude des interactions entre les souches de bactéries lactiques isolées et identifiées au laboratoire de microbiologie générale et des bactéries pathogènes responsables de toxi-infections alimentaires (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922).

### 1. Provenances des échantillons :

Les échantillons de lait cru de chèvre proviennent d'une ferme de la région Ouest d'Algérie (Sidi Bel Abbès).

#### 1.2. Collecte du lait :

Le lait cru doit être traité avec un grand soin afin d'éviter toute risque de contamination qui peut influencer sur la flore lactique et donc les *leuconostocs* et ceci par la réalisation du prélèvement dans des conditions aseptiques en lavant les mamelles de la chèvre et l'endroit avec de l'eau savonneuse et la collecte du lait doit se faire dès le premier jet dans des flacons stériles qui sont transportés à 4°C au laboratoire de microbiologie générale.

#### 1.3. Provenance de la bactérie pathogène :

La bactérie pathogène appartenant aux germes gram positif et négatif :

- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- *Escherichia coli* ATCC 25922

Provient du laboratoire central médical du CHU de Sidi Bel Abbès.

#### 1.4. Mesure de l'acidité Dornic et le pH des échantillons :

L'acidité Dornic et le pH de chaque échantillon du lait doivent être mesurés par titrimétrie et par le pH-mètre.

## **2. Isolement et purification des souches de *Leuconostoc* :**

### **2.1. Milieux de culture et d'isolement :**

Nous avons employé dans notre étude des milieux de cultures sélectifs pour les *Leuconostoc* afin d'inhiber et ralentir la croissance des autres genres de bactéries lactiques :

-Milieu MRS (De Man Rogosa et Sharpe 1960) additionné à un antibiotique la vancomycine à raison de 30µg/ml dont la plupart des bactéries lactiques sont sensibles à cette dose.

-Milieu MSE (Mayeu, Sandine et Elliker 1962). Badis et al ., 2005

Sur lesquelles les espèces de *Leuconostoc* produisent des colonies de forme spéciale.

### **2.2. Traitement des échantillons :**

#### **2.2.1. Du lait de chèvre :**

-On réalise à partir de chaque échantillon du lait de chèvre des dilutions décimales jusqu'à 10<sup>-9</sup> dans de l'eau peptonée.

-On prélève à partir des quatre dernières dilutions 1 ml qu'on ensemence en profondeur dans des boîtes de Pétrie contenant du MSE ou MRSv (Badis et al., 2005).

Toutes les boîtes sont incubées en anaérobiose à 30°C pendant 48h à 72h (Mathot et al., 1993 ; Khedid et al., 2006).

#### **2.3. Isolement et purification :**

L'isolement des bactéries lactiques suspect *Leuconostoc* a été fait à partir des boîtes de pétrie contenant un nombre de colonies compris entre 25 et 250, réalisé selon les méthodes décrites par la Fédération internationale du Lait.

La purification des bactéries isolées a été établie par la réalisation des subcultures sur bouillon et milieu MRS agar jusqu'à l'obtention de colonies bien distinctes et homogènes.

La pureté des souches est vérifiée par l'étude microscopique et les *Leuconostoc*s seront identifiés selon les tests classiques (Mathot et al., 1994, Kihal 1996 et Kihal et al., 1996).

## **3. Identification et caractérisation des souches :**

Les isolats ont été caractérisés selon plusieurs méthodes de façon à mettre en évidence la diversité phénotypique de la collection (Carr et al., 2002).

### **3.1. Test phénotypique :**

#### **3.1.1. Examen macroscopique :**

Les cultures obtenues sur boîte de Pétrie sont observées à l'œil nu pour caractériser la forme la taille et l'aspect ainsi que la couleur des colonies (Badis et al., 2006).

En effet les colonies des *Leuconostoc* rependent généralement au critère morphologique suivant:

- Colonies transparentes très petites.
- Un diamètre compris entre 0,5 et 1 mm
- Un contour régulier.
- Une forme circulaire lisse sur MRS et gluante et visqueuse sur milieu MSE.

#### **3.1.2. Examen microscopique :**

Il s'agit d'observer la morphologie cellulaire et le type d'association par la coloration de Gram. L'observation microscopique renseigne sur la forme et la disposition des cellules bactérienne et détermine ainsi le Gram. La sélection les bactéries lactiques suspectes *Leuconostoc* se fasse sur l'aspect cellulaire qui sont des cocci ovoïdes et se regroupe en paire et en chaînette (Rodolphe et al., 2002 ; Khedid et al., 2006). Les isolats sont tous Gram positive.

#### **Technique :**

- La première étape de la coloration consiste à réaliser une suspension en eau physiologique à partir d'une culture jeune (sur un milieu solide) et prélever un aliquote de suspension à l'anse de platine (ou à la pipette stérile) puis on étale sur 1 à 2 cm par un mouvement circulaire en partant du centre de la lame ;
- La seconde étape nécessite le séchage et la fixation par la chaleur (pour tuer les bactéries, fixer leur structure cytotologique, et les faire adhérer à la lame).
- La troisième étape nécessite quelques gouttes de violet de gentiane sur un frotti fixé pendant une minute, après rinçage, on ajoute de Lugol (solution aqueuse d'iode et d'iodure de potassium) pendant 30 secondes ;
- La quatrième étape, à savoir le bain d'alcool 90°, (ne va traverser que la paroi de certaines bactéries « les Gram- », et décolorer leur cytoplasme). Puis on rince avec de l'eau distillée.

- En fin, quelques gouttes de fuchsine de Ziehl sont versées sur la lame qu'on laisse agir une minute. La lame est lavée à l'eau distillée. Après séchage, on passe à l'observation microscopique.

Les *Leuconostocs* sont généralement des cocci ovoïdes et se regroupent en paire et en chaînette (Rodolphe et al., 2002 ; Khedid et al., 2006).

### **3.1.3. La catalase :**

La catalase est une enzyme respiratoire qui permet la dégradation du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène :



La recherche de la catalase se fait par la mise en contact d'une colonie bien isolée avec une goutte d'eau oxygénée ; un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulles traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de la catalase (Guiraud, 1998).

**NB:** pratiquement toutes les bactéries à Gram négatif sont catalase +.

### **Technique :**

- Déposer une goutte d'eau oxygénée sur une lame.
- Y déposer, à l'aide de l'anse de platine ou d'une pipette Pasteur boullée, une colonie isolée (ou plusieurs si petites colonies) de la souche à tester.
- Observer l'apparition de bulles.

Les *Leuconostocs* ont une catalase négative (Thunell, 1995).

## **3.2. Test physiologique et conservation des souches :**

### **3.2.1. La croissance à différentes températures :**

La croissance bactérienne est évaluée par un trouble en milieu MRS après 5 jours d'incubation à 4°C, 15°C, 30°C, 37°C et 44.5°C. (Guessas et Kihal, 2004).

Alors que la thermorésistance des bactéries a été testée au bain marie à 63.5°C/30 minutes et 55°C/15 minutes puis on a incubé à 30°C/24h à 48h (Guiraud, 1998).

Ces tests vont nous aider à distinguer les souches mésophiles des thermophiles ainsi que les thermorésistantes

### **3.2.2. La tolérance à la salinité et à l'acidité :**

Après avoir une culture jeune des isolats (culture de 18h à 30°C), ces derniers sont ensemencés dans un milieu MRS liquide contenant 3% et 6.5 % de chlorure de sodium (NaCl) et incubés à 30°C avec un témoin MRS liquide sans sel pendant 5 jours (Guessas et Kihal, 2004).

La croissance des bactéries est appréciée par l'apparition d'un trouble dans les tubes (Leveau et Bouix, 1980).

### **3.2.5. Conservation des souches :**

- Conservation à court terme : Des souches pures cultivées sur MRS incliné sont conservées à 4° C.
- Conservation à long terme : Le culot bactérien d'une culture en phase exponentiel est conservé à -20°C dans de lait écrémé additionné du glycérol à 30%. Au fur et à mesure des besoins les souches sont décongelée rapidement et repiquées dans du lait écrémée avant chaque utilisation (Samelis et al., 1994).

## **3.3. Test biochimique :**

### **3.3.1. Production de dextrane :**

La capacité des leuconostocs de produire cette exopolysaccharide rend ce test important pour leur identification au niveau de l'espèce (Ignacio Sanchez et al., 2005). On réalise des ensemencements sur milieu MSE de Mayeux et al., (1962), par des pré-culture de 18h puis on incube à 30°C pendant 24 à 48 h.

Les souches dextranigène sont caractérisées par la formation des colonies gluantes.

### **3.3.2. Recherche de l'arginine hydrolase (ADH) :**

Ce test est très important pour différencier les leuconostocs des lactobacilles hétérofermentaire (Moulay et al., 2006). Des cultures jeunes des souches sont ensemencées sur milieu M16BCP (Thomas, 1973) et sont incubée à 30 °C pendant 24 à 48 h.

Les souches dites ADH négatif virent la couleur du milieu au jaune qui signifie la dégradation du glucose par contre le catabolisme de l'arginine et la libération de l'ammoniac (NH<sub>3</sub>) neutralisent l'acidité et garde la couleur stable du milieu violette.

### **3.3.3. L'utilisation du citrate :**

La dégradation du citrate se fait grâce à la citratase, il s'agit d'une enzyme qui existe dans certaines espèces de *Leuconostoc* donc la recherche de la citratase oriente l'identification des

espèces. Sa mise en évidence se fait par la réalisation d'une culture sur milieu Kempler et McKay (1980) (Kihal et al., 1996 ; Moulay et al., 2006).

#### **3.3.4. Recherche du type fermentaire :**

Ce test permet d'apprécier la nature de la fermentation des substrats carbonés le type de métabolisme (homoférentaire ou hétéroférentaire).

Un bouillon MRS contient une cloche de durham est inoculé par une culture jeune de la souche à tester et incubé pendant 24h à 48h à une température de 30°C.

Il faut se rappeler que les leuconostocs sont tous productrice de CO<sub>2</sub> (hétéroférentaire), donc ce test est un caractère de base pour leurs identifications.

#### **3.3.5. Métabolisme des sucres :**

Ce test permet de connaître l'aptitude des bactéries à utilisées certains sucres.

Le milieu approprié à cette étude est également du bouillon MRS contenant le pourpre de bromocrésol (0.04 g/l) comme indicateur de pH et additionné avec 1% de différents sucres ou chaque souche est repiquée dans différents tubes selon la méthode décrite par Stiles et al., (1997) :

Des cultures e phase exponentiel de nos souches sont repartis dans des epindorfs à un volume de 2ml puis on centrifuge à une vitesse de 5000 tours pendant 5min, on garde le culot et on le lave avec de l'eau physiologique pour éliminer toute marque de milieu puis on centrifuge une seconde fois ensuite on ajoute au culot bactérien 2ml de MRS BCP. Les tubes ont été agités pour homogénéiser le mélange.

On répartit dans des tubes stériles les sucres utilisés à raison de 100µl /ml de milieu (MRS BCP) dont on ajoute 100µl de chaque souche.

La lecture se fait après 24 à 48 h jusqu'à 72h d'incubation à 30°C.

Le virage de la couleur du milieu du violet au jaune explique un résultat positif.

Les sucres utilisés sont : Galactose, Fructose, Arabinose, Mannose, Mannitol, Maltose, Xylose, Saccharose, Amidon.

#### **4. Test biotechnologique :**

##### **4.1 Pouvoir protéolytique :**

L'activité protéolytique des bactéries lactiques est recherchée en milieu MRS gélosé additionnée de lait écrémé à 1% et 2% selon la méthode de (Van den berg et al., 1993)

Les souches bactériennes à tester sont ensemencées simultanément en touches à la surface du milieu de culture jeune. Après une incubation à 30° C pendant 24h, la protéolyse est révélée par des zones claires autour des touches.

##### **4.2 Pouvoir lipolytique :**

L'activité lipolytique est étudiée sur le milieu décrit par Sierra (1957) pour détecter la production des enzymes lipolytiques dans lequel le monooléate sorbitane polyoxyéthylène (tween 80) est utilisé comme substrat lipidique (Sierra G. ,1957 ; Janda K. 2005).

Le principe de cette méthode repose sur la précipitation des cristaux du sel de calcium de l'acide gras sous l'influence d'une lipase (El marrakchi A. et al., 1988 ; Plou F. G., et al., 1998). Si la souche bactérienne possède une enzyme lipolytique, la précipitation des cristaux de savon calcique sera visible sous forme d'un halo opaque autour des colonies.

En outre, si l'activité lipasique est intense, la précipitation apparait sous forme de cristaux visibles à l'œil nu (Delmotte A., 1958).

Les souches bactériennes sont donc ensemencées sur la gélose nutritive à base de Tween 80. Le substrat est additionné dans le milieu de culture, préalablement stérilisé, à une concentration de 10 ml /L (Helist P. et Korpela T., 1998). L'apparition des précipitations opaques autour des colonies bactériennes a lieu au bout de 24h à 72 h d'incubation à 30°C (Delmotte A., 1958).

##### **4.3 Étude des interactions :**

Le choix des ferments mixtes repose sur l'étude des interactions entre les bactéries lactiques. On les classe en deux catégories : les interactions positives qui se caractérisent par la stimulation d'un ou de plusieurs micro-organismes et les interactions négatives qui correspondent à une inhibition de la croissance et de l'activité métabolique (Choisy et al., 1997).

La symbiose est révélée par l'absence des zones d'inhibition par contre l'antagonisme se traduit par la présence de ces dernières après une incubation à 37°C pendant 24h. (Benkerroum et al ; 1993).

Afin de réaliser ce test avec nos isolats nous avons choisi :

- Les 09 souches de *Leuconostoc*.
- Une souche de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.
- Une souche d'*Escherichia coli* ATCC 25922.
- Une souche de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

#### **4.3.1. Méthode directe :**

Pour se faire, la méthode décrite par Fleming et al. (1975) a été utilisée. Les souches à tester ont été ensemencées en touche sur la gélose MRS préalablement coulée et solidifiée. On laisse sécher à température ambiante puis ont été incubées pendant 24h à 30°C. (Barefoot et Klaenhammer, 1983).

Après la croissance des souches de *Leuconostocs* on inocule 7ml de: (MRS semi solide « pour les souches lactiques », MH semi solide pour les *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*) déjà fondue et refroidie à 39°C par 0.5ml de la souche indicatrice, le mélange est ensuite coulé à la surface de la gélose MRS ensemencée en touches.

#### **4.3.2. Méthode indirecte :**

Afin de déterminer la nature de la substance inhibitrice produite par nos bactéries lactiques, il est impératif de réaliser une série de tests en utilisant la méthode indirecte.

Cette méthode permet de mettre en contact le surnageant des souches lactiques productrices de substance antimicrobienne avec la souche test (Tagg et Mcgiven, 1971).

Les souches précédemment sélectionnées pour leur production de substances antimicrobienne sont concernées par ce test.

Les souches sont cultivées dans du milieu MRS liquide et incubées pendant 18 heures. Après incubation, le milieu est centrifugé (8000 rpm/mn 10 min) et le surnageant est conservé.

Dans une boîte de Pétri contenant du milieu solide et ensemencé par la souche test, des puits sont réalisés avec un emporte-pièce et celée par 10 µl de gélose MRS. Les puits recevront 100 µl du surnageant de la souche à tester. Les boîtes de Pétri, ainsi préparées, sont entreposées pendant 4 à 8 h à 4°C pour laisser diffuser la bactériocine dans la gélose

(Khaoua et al., 1997) ensuite les boites sont incubée pendant 24 à 48 heures Le résultat positif se manifeste par l'apparition d'une zone autour de la souche productrice (*Leuconostoc*).

Les colonies entourées d'une zone claire dans la nappe de culture de la souche test et ayant un diamètre supérieur à 2 mm sont considérées comme positive.

➤ **Inhibition due à l'acide lactique :**

L'acide lactique est un facteur majeur dans les inhibitions par les bactéries lactiques.

Afin d'éliminer son effet, les *Leuconostocs* sont cultivés dans MRS liquide tamponné (tampon phosphate 0.2 M, pH7) ; ainsi l'acide lactique produit par la souche lactique sera neutralisé et seule la substance antimicrobienne si elle est produite exprime son action sur les souches indicatrices (Achemchem et al., 2004).

➤ **Inhibition due au peroxyde d'hydrogène :**

En plus de l'acide lactique et des autres acides organiques qui empêchent le développement des microorganismes indésirables par diminution du pH du milieu, les bactéries lactiques produisent d'autres métabolites ayant des propriétés antimicrobiennes tels que le peroxyde d'hydrogène (Dortu et Thonart, 2009).

Pour écarter l'effet du peroxyde d'hydrogène dans l'inhibition des pathogènes cibles, le surnageant des cultures des bactéries lactiques ont été traités par 1 mg/ml de catalase puis incubée à 37°C pendant 1 heure. Le surnageant est stérilisé par filtration et testé par la méthode des puits sur les pathogènes. (Achemchem et al., 2004 ; Guessas et al., 2005).

## **5. L'antibiogramme :**

L'antibiogramme des souches pathogènes (*Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*) est déterminé par la technique standardisée de diffusion (D'après le comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie, 2004) sur milieu gélosé (MRS gélosé). A partir d'une culture de 18h en milieu liquide MRS (Dalache et al., 2003) et à l'aide d'un écouvillon stérile, on aensemencé toute la surface du milieu. Après le séchage, on a déposé les disques des antibiotiques sur les boîtes (maximum 7 disques sur grande boîte de pétri). On les a incubés à 37°C pendant 18h à 24h (Bauer et al., 1966).

Les diamètres de la zones d'inhibition observés autour des colonies classent les bactéries comme chimiquement sensibles (S), intermédiaires (I), ou résistantes (R) à un antibiotique donné et cela se fait en comparaison avec les diamètres critiques pour les diverses classes d'antibiotiques proposés par le comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (2009).

## Matériels et méthodes

Les antibiotiques testés sont les suivants : Erythromycine, Pristinamycine, Pénicilline G, Chloramphénicol, Tétracycline, Gentamicine, Céphalexine. Ces disques d'antibiotiques proviennent de Bio-rad (Marnes-la Coquette, France).

**Résultats &**

**Discussion**

## Résultats et discussion

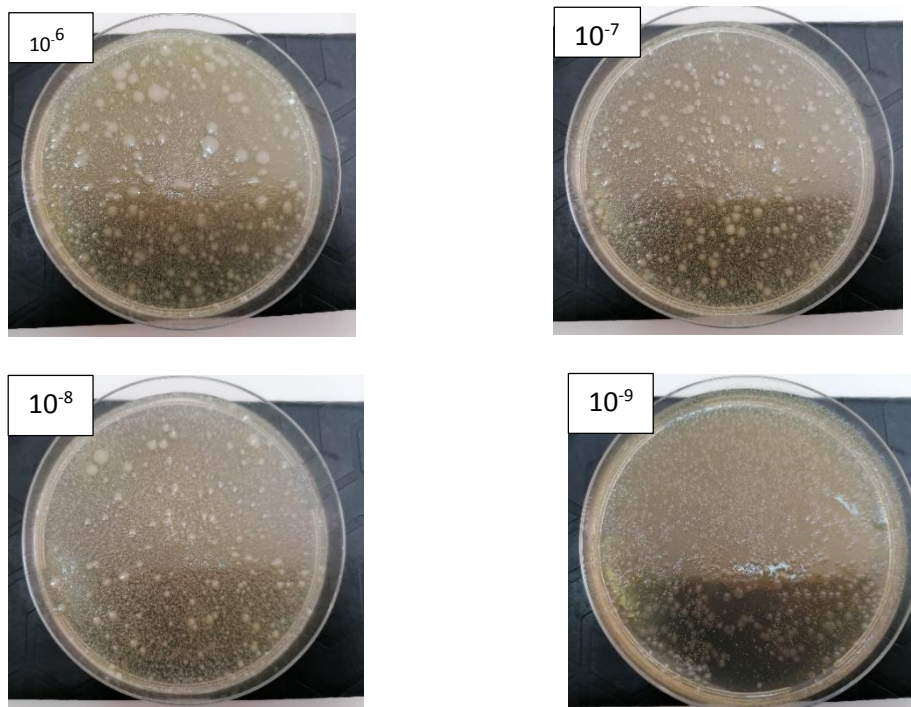
### 1. Isolement et caractérisation des isolats :

Pour isoler les *Leuconostocs*, nous avons utilisé dans notre étude deux milieux considérés comme sélectifs pour ce genre qui sont : Le MRS additionné de 30µg/ml de la vancomycine pour minimiser la croissance des autres bactéries lactiques et le MSE solide. L'échantillon (Lait de chèvre) est dilué à  $10^{-9}$  ensemencé en profondeur dans chacun des deux milieux cités précédemment.

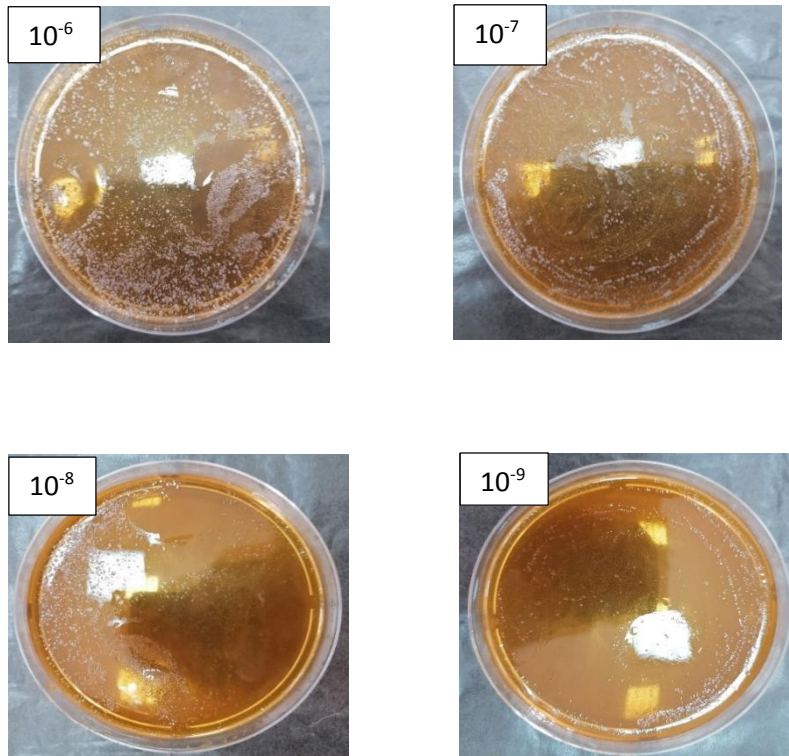
Après une incubation à 30°C pendant 24h à 48h : Les boîtes de Pétri ont été examinées.

Sur le milieu MRS, Les colonies sont de forme ronde, petite et lenticulaire de couleur blanchâtre, par contre, sur milieu MSE elles sont transparentes avec un aspect visqueux et gluant.

**Figure 7** : Aspect macroscopique des cultures bactériennes (*Leuconostocs*) ensemencée en profondeur avec MRSv.



**Figure 8 :** Aspect macroscopique des cultures bactériennes (*Leuconostocs*) ensemencée en profondeur avec MSE.



## 2. Purification et caractérisation des isolats :

Neuf colonies typiques à savoir leur apparence macroscopique (une forme circulaire de contour régulier, très petite de taille environ 0.5 et 1mm) sont isolées de chaque échantillon à partir des boîtes contenant le milieu MRSv et repiquées dans le bouillon MRS et incubé à 30°C.

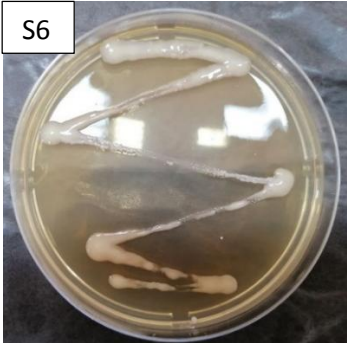
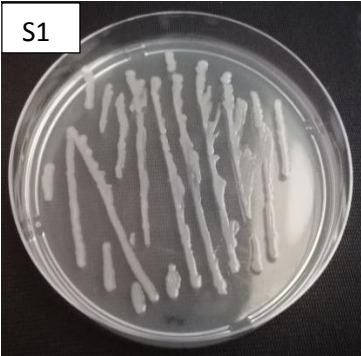
La purification des bactéries isolées a été établie par la réalisation des subcultures sur bouillon (MRS liquide) et milieu MRSv solide jusqu'à l'obtention des colonies bien distinctes et homogènes.

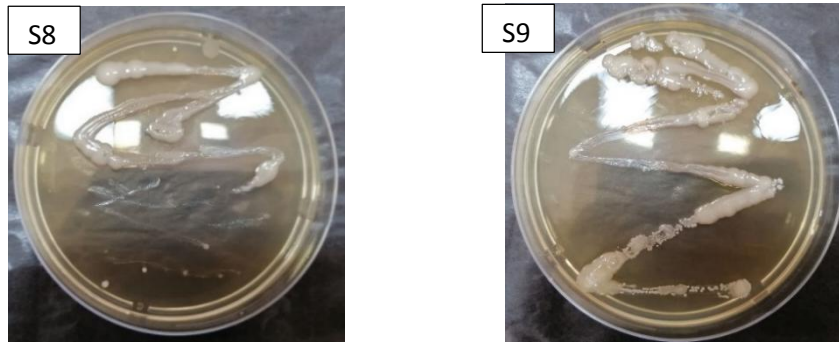
### 2.1 Aspect macroscopique :

- **Sur milieu solide :**

Les colonies de *Leuconostoc* après une purification apparaissent sur milieu MRSv solide sous forme de colonies de couleur blanchâtre, forme lenticulaire ou circulaire. Ces colonies sont environ de 0,5 à 1mm de diamètre (**Figure 9**) (Kihal, 1996 ; Carr et al., 2002).

Résultats et discussion

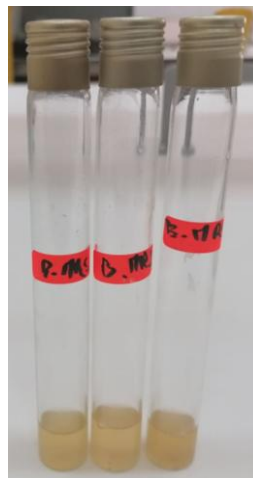




**Figure 9** : L'aspect macroscopique des souches S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8 et S9 sur le milieu MRS (ensemencé en surface).

- **Sur milieu liquide :**

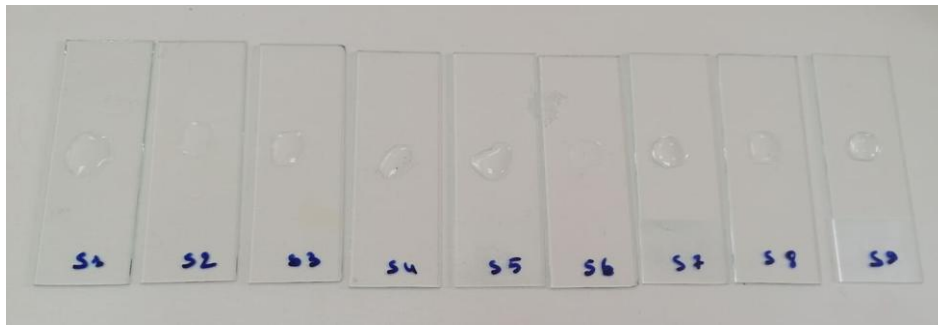
Dans le milieu MRS liquide la croissance des bactéries apparaît sous forme de trouble. Et pour une souche pure cette trouble est concentrée au fond du tube à la recherche des conditions anaérobiques de ces bactéries avec une zone transparente de 5mm à la surface du milieu liquide (Figure18) (Kihal, 1996 ; Carr et al., 2002).



**Figure 10** : Aspect des souches pures S1, S2 et S3 sur MRS liquide.

## 2.2. Test de la catalase :

Selon les caractéristiques phénotypes du genre *Leuconostoc*, toutes les espèces étudiées ne possèdent pas la catalase.

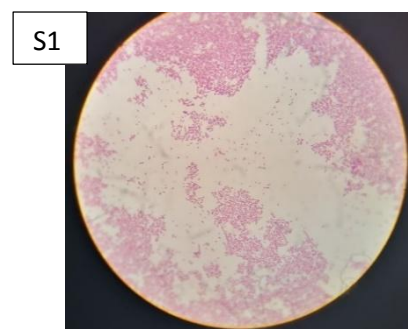


**Figure 11:** Test de catalase des souches S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8 et S9.

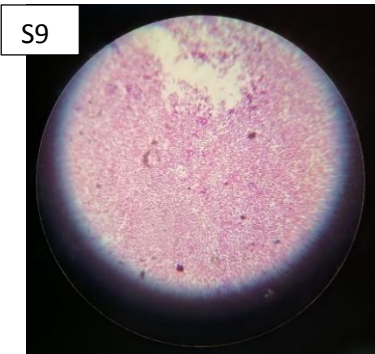
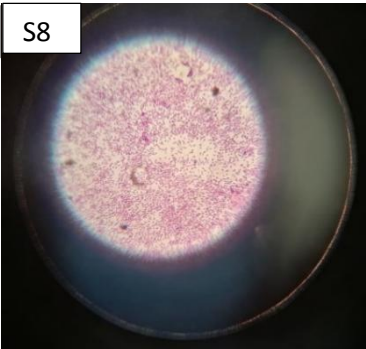
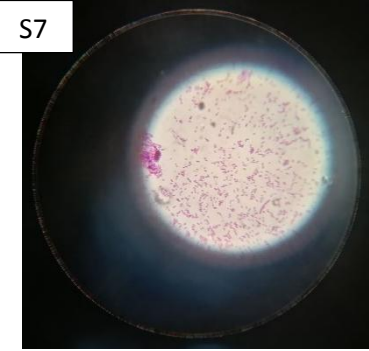
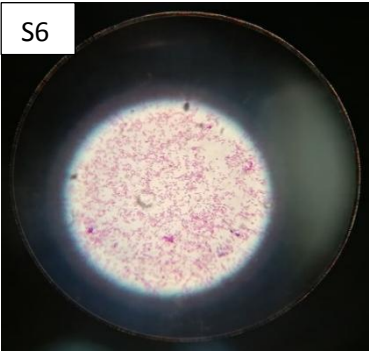
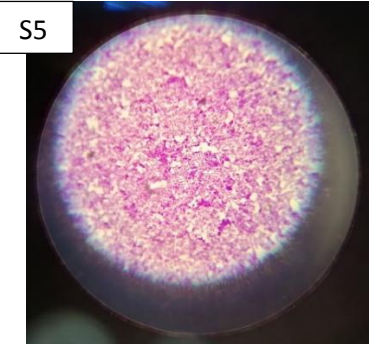
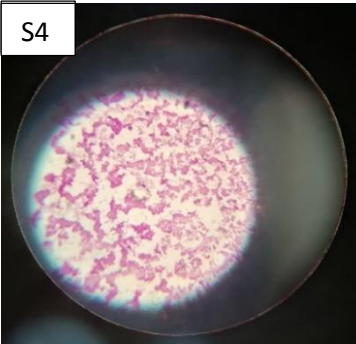
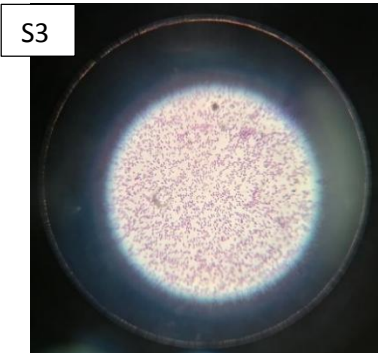
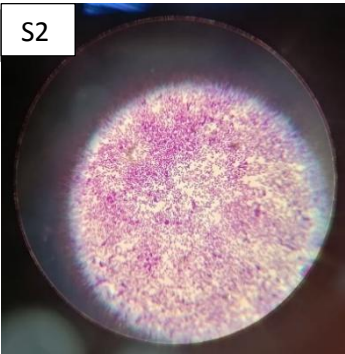
### **2.3. Aspect microscopique :**

La forme des bactéries et leur affinité pour les colorants constituent la base de leur classification. Les bactéries peuvent être sphériques (coque ou cocci), en forme de bâtonnet (bacilles), ou intermédiaires (coccobacilles). Ainsi pour déterminer leurs caractères cultureux (couleur, disposition forme et aspect), les colonies obtenues sont observées à la loupe binoculaire, après une coloration de Gram, au microscope optique (x100).

Alors après l'observation microscopique on a éliminé toutes les espèces apparaissent comme Gram négatif et les forme de bacilles ; et comme une pré-identification on garde juste les souches apparaissent sous forme ovoïde ou coccobacille ; dont le mode d'association est toujours en paires ou en chaînes incurvées de nombre paires (Kihal, 1996 ; Carr et al., 2002) (**Figure12**).



Résultats et discussion

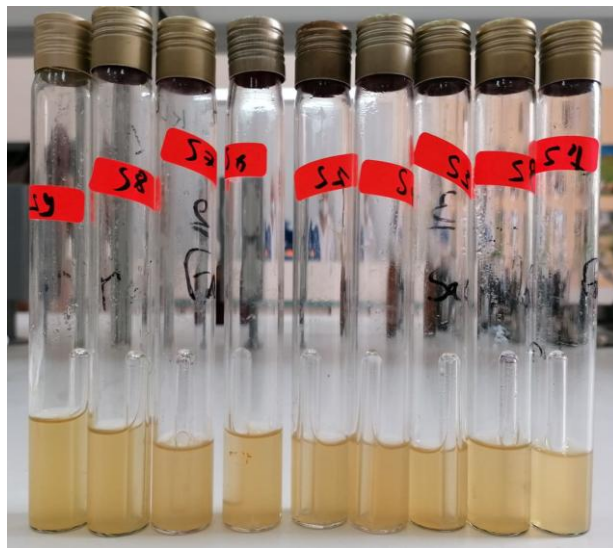


**Figure 12 :** L'observation microscopique des cellules bactériennes (*Leuconostoc*) après fixation (Coloration de Gram) (Gx1000).

#### 2.4. Type fermentaire :

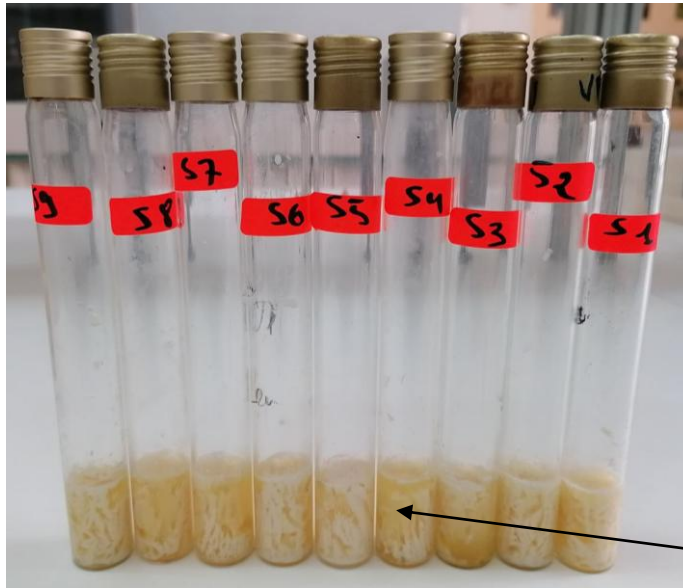
Ce test nous a permis de différencier entre les souches homofermentaires et les souches hétérofermentaires.

Toutes les souches produisent du gaz ( $\text{CO}_2$ ) à partir du glucose qui apparaît dans la cloche de Durham (**Figure 13**). Sont considérés comme hétérofermentaire qui est un caractère spécifique pour les *Leuconostoc* (Mathot et al., 1994 ; Badis et al., 2005). Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau 8.



**Figure 13 :** Type fermentaire des 9 isolats (*Leuconostoc*) sur milieu MRS liquide glucosé contenant la cloche de Durham. Incubées à 30°C/24h.

Ce caractère est aussi étudié sur milieu lait écrémé stérile, la production du  $\text{CO}_2$  se traduit par l'apparition des fissures dans le coagulum après une incubation à 30°C/24h (**Figures 14**).



Formation des fissures

**Figure 14 :** Type fermentaire des 9 isolats (*Leuconostoc*) sur milieu lait UHT.

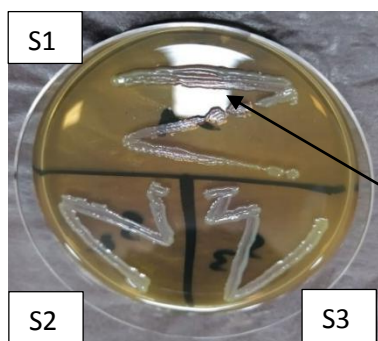
### 2.5. Recherche de l'Arginine dihydrolase (ADH) :

Les bactéries qui fermentent le lactose entraînent une acidification du milieu et une coloration jaune du milieu en présence de pourpre de bromocrésol (indicateur de pH).

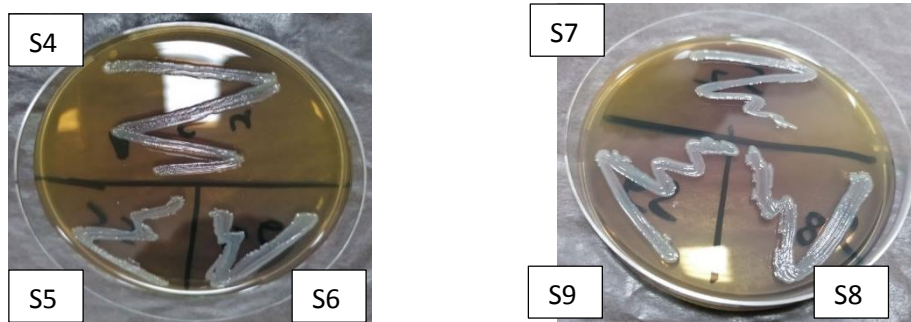
L'enzyme ADH, dont l'action est favorisée en milieu acide, forment des substances alcalines à partir des acides aminés et l'alcalinisation du milieu ce qui provoque le virage au violet. Après ensemencement de chacun de nos souches sur le milieu M16BCP. Incuber à 30° C. (Kheddid et al., 2006).

Apparition d'une coloration jaune (acidification du milieu): réaction négative.

On garde toutes les souches qui n'ont pas la capacité à hydrolyser l'arginine, car les *Leuconostoc* ne possèdent pas l'ADH (arginine déshydrogénase). (**Figure 15**). Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 8.



La couleur jaune indique l'absence de l'ADH chez *Leuconostoc*



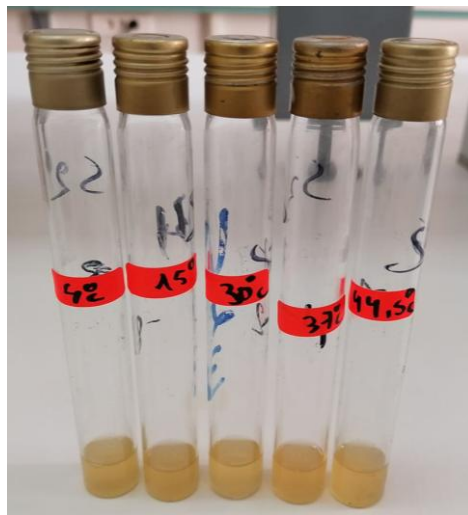
**Figure 15 :** Test de l'hydrolyse de l'arginine.

### 3. L'identification des espèces :

Après les tests phénotypiques on sélectionne seul les souches qui ont les caractéristiques du genre de *Leuconostoc* pour admettre aux tests de croissance à différentes températures et a la thermorésistance.

#### 3.1. La croissance à différentes températures :

Nos souches n'ont pas poussé ni à 4°C ni à 44.5°C, cependant elles ont poussé à 15°C à 30 et 37°C.



**Figure 16 :** Test de croissance à différentes températures.

#### 3.2. La thermorésistance :

Toutes les souches isolées n'ont pas résisté à 63.5°C pendant 30min mais elles ont résisté à 55°C pendant 15min. Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau 8.

### 3.3. La tolérance à la salinité et à l'acidité :

- **La croissance en milieux acides :**

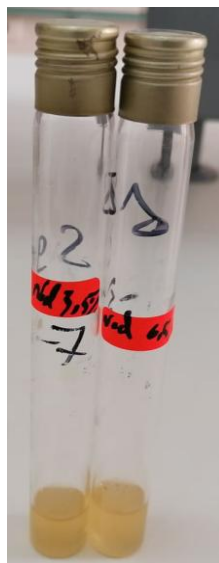
Les résultats montrent que toutes les souches poussent après une incubation à 30°C sur le milieu à pH 6.5 et aucune souche n'a poussé à pH 4.8



**Figure 17 :** Test de croissance à pH 4.8 et pH 6.5.

- **La croissance en milieu hyper salé**

Trois souches (V4, V6 et M7) n'ont pas poussé à une concentration de 3%NaCl et aucune souche n'a poussé à une concentration de 6.5% NaCl. (**Tableau 8**)



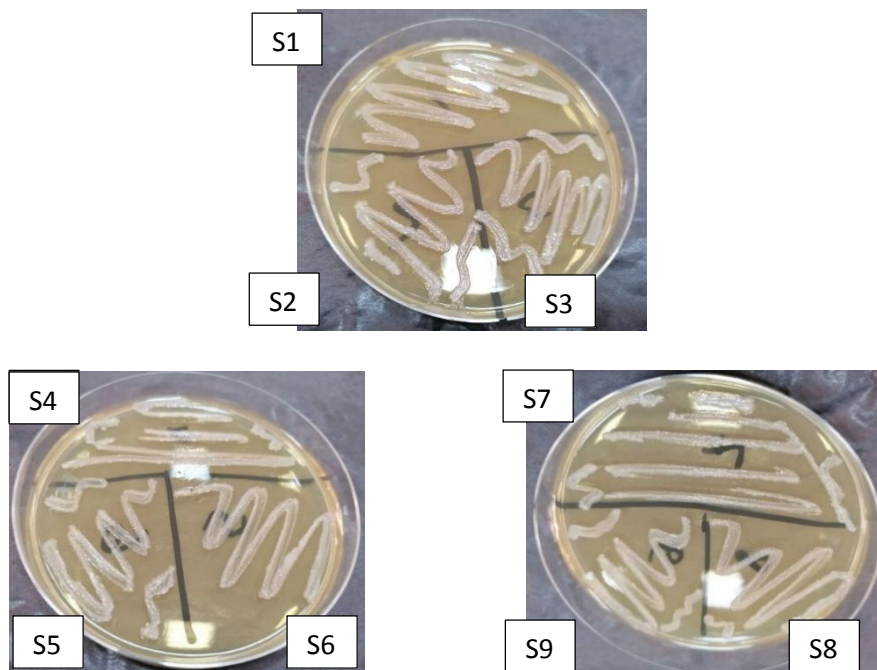
**Figure 18 :** Test de croissance à 3% NaCl et à 6.5% NaCl.

### 3.4. La production de dextrane :

Sur le milieu MSE qui est un milieu électif permettant la recherche et le dénombrement des *Leuconostoc* dans le lait, les produits laitiers et les aliments sucrés.

À partir du saccharose du milieu, les *Leuconostoc* synthétisent des polysaccharides (dextrane) qui donnent aux colonies un aspect gélatineux.

Ce caractère a été observé chez toutes les souches isolées de lait cru de chèvre (**Figure 19**), (**Tableau 8**).

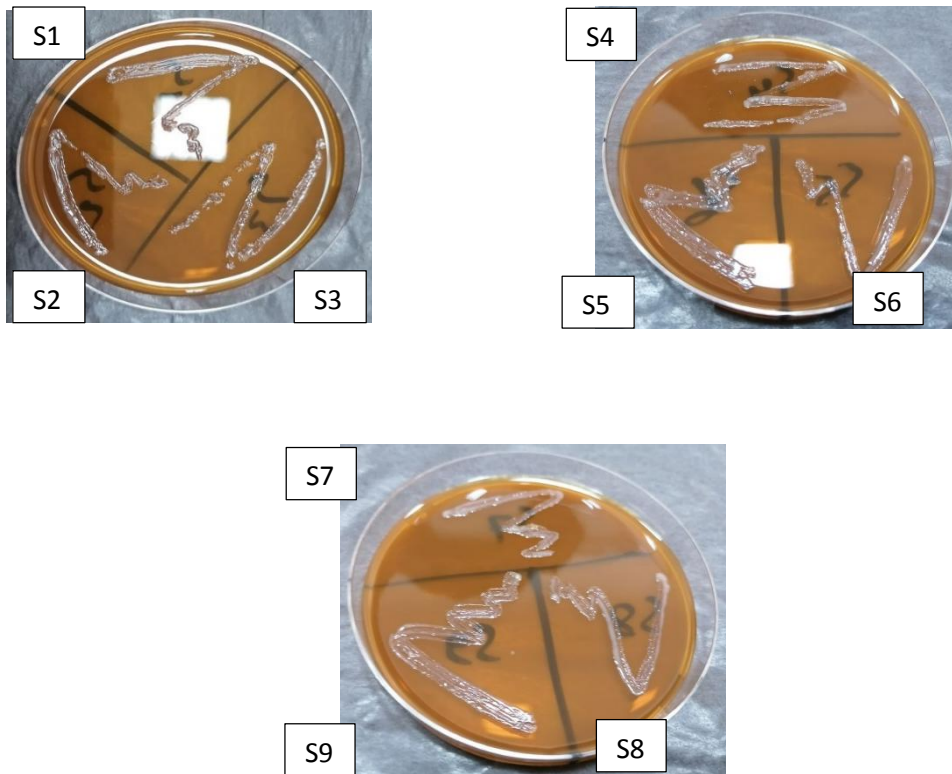


**Figure 19** : L'aspect des colonies productrices de dextrane par les souches S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8 et S9 sur milieu MSE.

### 3.5. L'utilisation de citrate :

Nos souches sont tous capables de dégrader le citrate elles apparaissent sous formes de la couleur bleu (**Figure 20**), (**Tableau 8**).

## Résultats et discussion



**Figure 20** : l'utilisation de citrate révèle par les colonies bleues sur le milieu KMK de nos 09 isolats.

**Tableau 8 :** Les caractéristiques physiologiques et biochimiques des souches de *Leuconostoc* isolées.

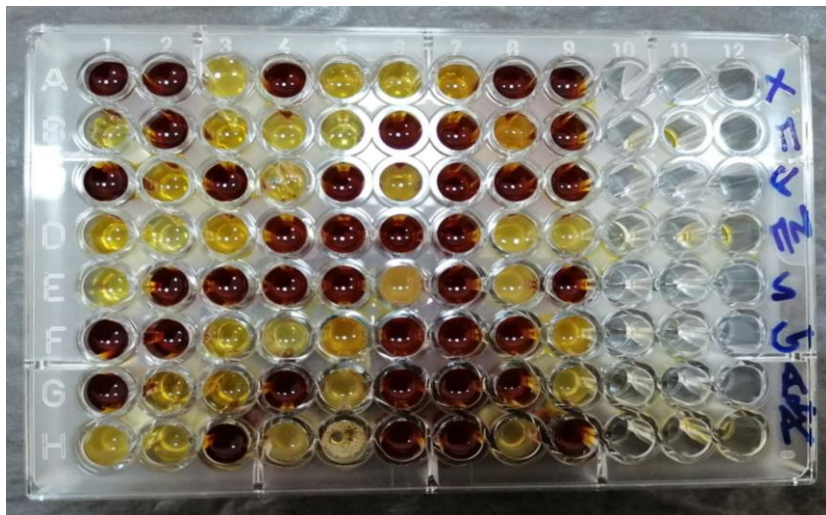
Souches	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
Forme cellulaire	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gram	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+
ADH	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Production du CO <sub>2</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
44.5°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63.5°C /30min	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55°C /15min	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 4.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH 6.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6.5% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dextrane	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L'utilisation de citrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+

### 3.6. L'utilisation des carbohydrates :

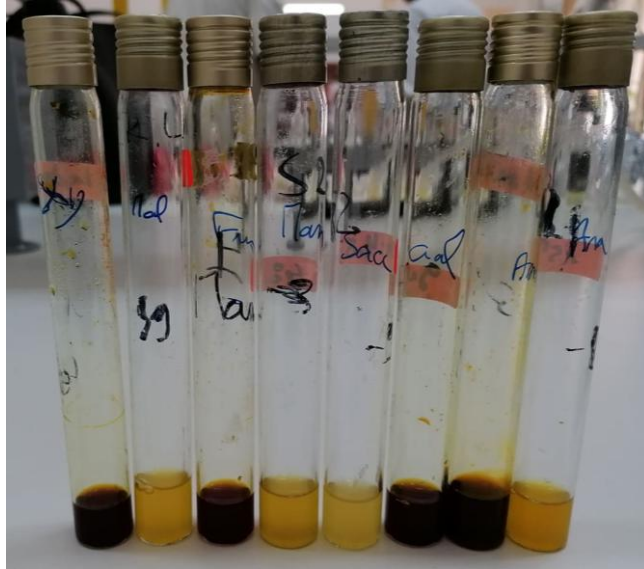
Pour mieux identifier les isolats au niveau de l'espèce et de la sous espèce on a établi leur profil fermentaire de huit sucres en utilisant le milieu MRS BCP qui contient le bromocrésol qui est un indicateur de pH, leur virage au jaune révèle la fermentation des carbohydrates qui provoque une acidification du milieu. (Tableau 9), (Figures 22 et 23).

**Tableau 9** : le profil fermentaire des 09 souches isolées vis-à-vis des 8 sucres.

Souches	Xylose	Maltose	fructose	Mannitol	Saccharose	Galactose	Amidon	Arabinose
S1	-	+	-	+	+	-	-	+
S2	-	-	+	+	-	-	+	+
S3	+	+	-	+	-	+	+	-
S4	-	+	+	-	-	+	-	+
S5	+	+	-	-	-	+	+	+
S6	+	-	+	-	+	-	-	-
S7	+	-	-	-	-	-	-	-
S8	-	+	-	+	+	-	-	+
S9	-	-	-	+	-	+	+	-



**Figure 21** : Le profil fermentaires des 09 isolats effectué sur une galerie classique et sur plaque d’Elisa: 1- Xylose, 2- Maltose, 3- Fructose, 4- Mannitol, 5- Saccharose, 6- Galactose, 7- Amidon, 8- Arabinose.

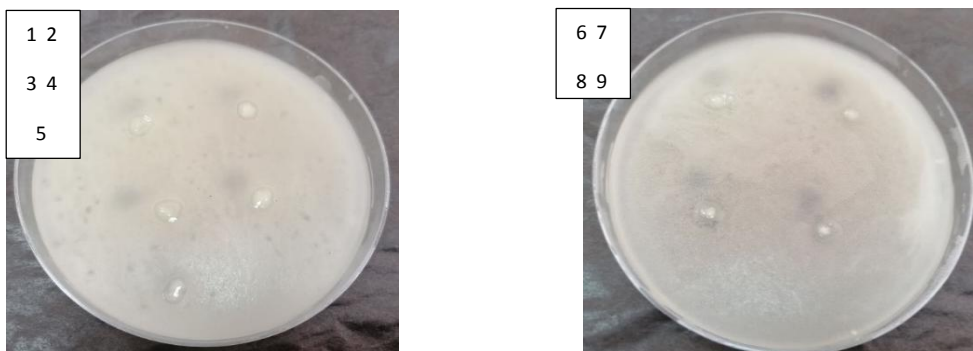


**Figure 22 :** Le profil fermentaires des sucres de la souche de *Leuconostoc* S1.

#### **4. Les caractéristiques biotechnologiques des isolats :**

##### **4.1. Activité protéolytique :**

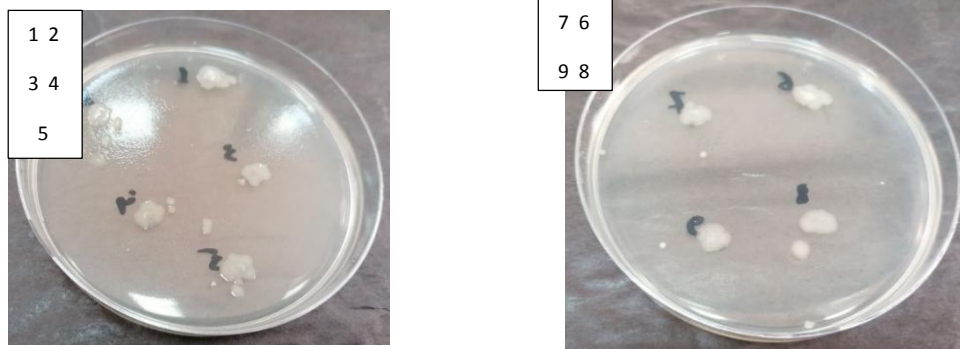
La protéolyse se traduit par l'apparition d'un halo clair dû à la dégradation de la caséine ; autour des souches ensemencées sur le milieu MRS solide additionné par le lait écrémé après 24h d'incubation. Toutes nos isolas de *Leuconostoc*, ne présentent pas une activité parotéolytique. (**Figure 23**).



**Figure 23 :** L'absence de l'activité protéolytique reflétée par l'absence des zones de protéolyse autour des puits sur la gélose au lait.

##### **4.2. Activité lipolytique :**

Il apparaît que l'ensemble des isolats ne présente pas une activité lipolytique (**Figure 24**).

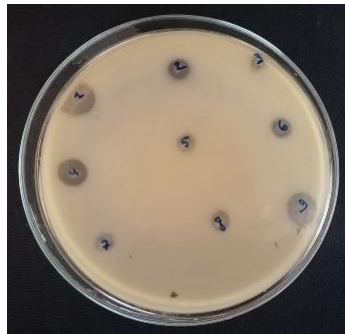


**Figure 24 :** L'absence des zones de lipolyse autour des puits sur la gélose nutritive au Tween80.

### 4.3. Étude des interactions :

#### 4.3.1. Méthode directe :

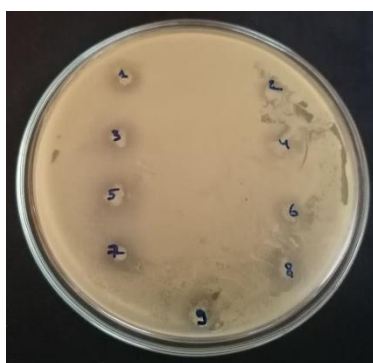
Tous nos isolats présentent une interaction négative qui correspond à une inhibition de la croissance et de l'activité métabolique envers les quatre souches pathogènes et/ ou d'altération et cela due soit par leur production des acides organiques dans le milieu de culture soit par la production de peroxyde d'hydrogène et d'autres composés antimicrobiens. (**Figure25, 26, 27**) et (**Tableau10**).



**Figure 25 :** Résultats du test de l'activité antibactérienne (Spot agar test) des souches de *Leuconostoc* : S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9 contre *Escherichia coli*.



**Figure 26** : Résultats du test de l'activité antibactérienne (Spot agar test) des souches de *Leuconostoc* : S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9 contre *Staphylococcus aureus*.



**Figure 27** : Résultats du test de l'activité antibactérienne (Spot agar test) des souches de *Leuconostoc* : S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8 et S9 contre *Pseudomonas aeruginosa*.

**Tableau 10** : Les diamètres des zones d'inhibition de la croissance des bactéries indicatrices en mm par les souches productrices.

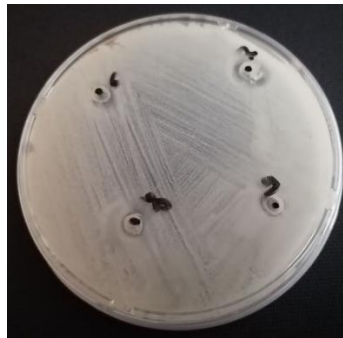
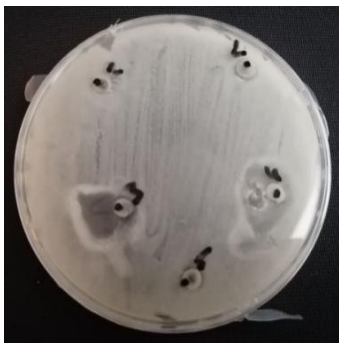
Souches indicatrices	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
<i>Staphylococcus Aureus</i>	15	10	11	10	12	15	9	11	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11	10	9	8	9	7	8	10	8
<i>Escherichia coli</i>	13	8	4	9	6	8	5	7	11

#### 4.3.2. Méthode indirecte :

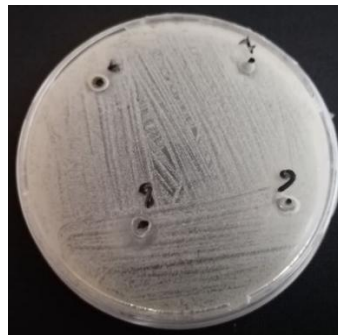
Pour déterminer si l'inhibition est provoquée par un agent exocellulaire, un 2ème test qui permet de mettre en contact le surnageant des isolats lactiques producteurs de substances antimicrobiennes avec les souches indicatrices.

Élimination de l'effet de l'acide lactique et de peroxyde d'oxygène :

À cette étape on a sélectionné que deux souches lactiques ont un spectre antibactérien contre la plupart des bactéries pathogènes et ont un diamètre d'inhibition  $\geq 2$ mm parmi les souches isolées de milieu lait cru de chèvre (S8 et S9) (Tableau11, 12 et 13) (Figure 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 et 36).



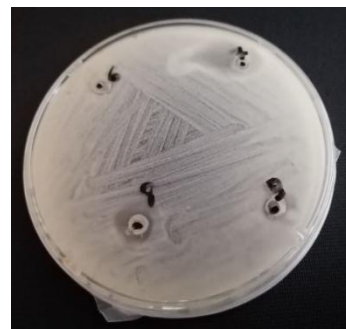
**Figure 28** : Résultats du test de l'activité antibactérienne (méthode indirecte : surnageant normal) des 09 souches de *Leuconostoc* contre *Staphylococcus aureus*.



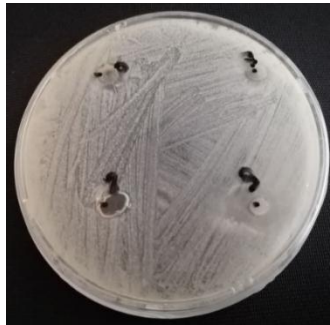
**Figure 29** : Résultats du test de l'activité antibactérienne (méthode indirecte : surnageant normal) des 09 souches de *Leuconostoc* contre *E. Coli*.



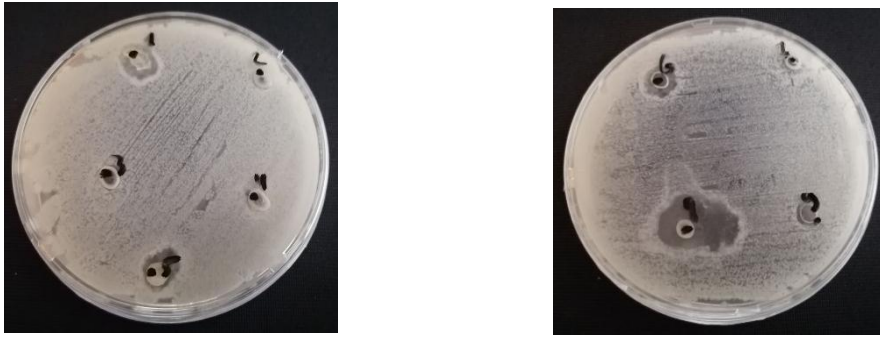
**Figure 30 :** Résultats du test de l'activité antibactérienne (méthode indirecte : surnageant normal) des 09 souches de *Leuconostoc* contre *Pseudomonas aeruginosa*.



**Figure 31 :** Résultats du test de l'activité antibactérienne (méthode indirecte : surnageant à Ph 7) des 09 souches de *Leuconostoc* contre *Staphylococcus aureus*.



**Figure 32 :** Résultats du test de l'activité antibactérienne (méthode indirecte : surnageant à Ph 7) des 09 souches de *Leuconostoc* contre *Escherichia coli*.



**Figure 33 :** Résultats du test de l'activité antibactérienne (méthode indirecte : surnageant à Ph 7) des 09 souches de *Leuconostoc* contre *Pseudomonas aeruginosa*.



**Figure 34 :** Résultats du test de l'activité antibactérienne (méthode indirecte : surnageant à catalase) des 09 souches de *Leuconostoc* contre *Staphylococcus aureus*.



**Figure 35 :** Résultats du test de l'activité antibactérienne (méthode indirecte : surnageant à catalase) des 09 souches de *Leuconostoc* contre *Pseudomonas aeruginosa*.



**Figure 36 :** Résultats du test de l'activité antibactérienne (méthode indirecte : surnageant à catalase) des 09 souches de *Leuconostoc* contre *Escherichia coli*.

**Tableau 11 :** Diamètres des zones d'inhibition (mm) suite à la diffusion sur puits en gélose (méthode indirecte : surnagent normal).

Souches indicatrices	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	10	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	13	14	0	7	10	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15	8	14	15	9	0	11	10	12

**NB :** - Les résultats en vert présentent les isolats les plus performants isolés du lait cru de chèvre.

**Tableau 12 :** Diamètres des zones d'inhibition (mm) suite à la diffusion sur puits en gélose (méthode indirecte : surnagent à pH 7).

Souches indicatrices	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
<i>Escherichia coli</i>	0	9	0	0	0	0	0	0	15
<i>Staphylococcus aureus</i>	9	0	10	8	0	0	22	12	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	0	0	0	11	10	0	21	0

**Tableau 13 :** Diamètres des zones d'inhibition (mm) suite à la diffusion sur puits en gélose (méthode indirecte : surnagent à catalase).

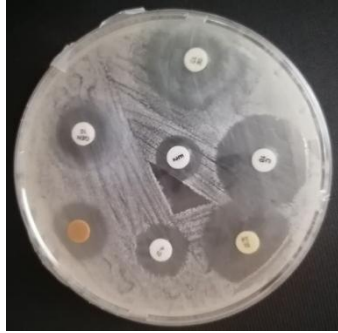
Souches indicatrices	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
<i>Escherichia coli</i>	9	0	12	0	21	8	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	0	11	0	0	0	8	22	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11	0	12	0	0	0	0	10	0

### 5. L'antibiogramme :

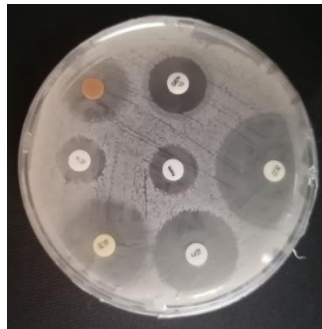
L'antibiogramme a été effectué sur les trois souches pathogènes: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*. En utilisant sept antibiotiques avec des doses différentes sur milieu MRS.

**Tableau 14 :** les résultats d'antibiogramme des souches pathogènes (mm).

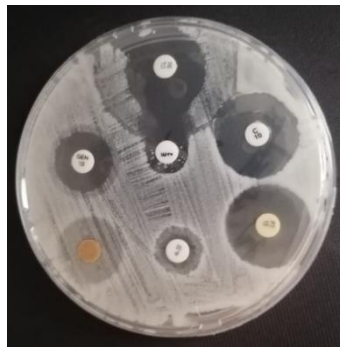
Antibiotiques	Charge du disque en µg	symbole	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Escherichia coli</i>	
<b>Pristinamycine</b>	15	PT15	23	R	26	R	24	R
<b>Chloramphénicol</b>	10	C10	22	S	14	R	25	S
<b>Céphalexine</b>	30	CL30	23	R	20	R	28	S
<b>Erythromycine</b>	2	E2	12	R	24	S	13	R
<b>Gentamicine</b>	10	GEN10	13	R	15	I	20	S
<b>Pénicilline G</b>	10	P10	20	S	18	S	15	S
<b>Tétracycline</b>	30	TE	19	R	35	S	27	S



**Figure 37** : l'antibiogramme de *Escherichia coli* vis-à-vis les antibiotiques E2, PT15, P10, C10, TE, GEN10, CL30.



**Figure 38** : l'antibiogramme de *Pseudomonas aeruginosa* vis-à-vis les antibiotiques E2, PT15, P10, C10, TE, GEN10, CL30.



**Figure 39** : l'antibiogramme de *Staphylococcus aureus* vis-à-vis les antibiotiques E2, PT15, P10, C10, TE, GEN10, CL30.



**Figure 40** : La croissance d'*E. Coli* sur milieu gélose nutritive après 24h d'incubation à 37°C.



**Figure 41** : La croissance de *Staphylococcus aureus* sur milieu Shapman après 24h d'incubation à 37°C.



**Figure 42** : La croissance de *Pseudomonas aeruginosa* sur milieu Mc Kay après 24h d'incubation à 37°C.

## 6. Discussion :

Les *Leuconostoc* se rencontrent dans la nature et font partie de la microflore de la plupart des champs cultivés. On les retrouve souvent sur les plantes et dans divers aliments comme le lait et les produits laitiers fermentés (fromages, kéfir), les végétaux fermentés (vin, cidre, olives, choucroute et la viande) (Wilhem et al., 2012).

Pour isoler *Leuconostoc*, on a pris notre échantillon du : lait cru de chèvre. Les *Leuconostoc* comme tous les bactéries lactiques ont besoin aux milieux riches en différents nutriments pour croître (sucres, acides aminés, acides gras, sels, vitamines) (Hammes et Hertel, 2006).

Elles sont essentiellement cultivées dans le milieu Man Rogosa Sharpe (MRS) est un milieu riche qui offre aux bactéries à culture difficile différentes sources de carbone et d'azote, telles que les peptones, le glucose et le Tween 80.

Pour assurer un isolement correct on a additionné 30µg/ml de vancomycine au milieu MRS selon Mathot et al. (1994) et le milieu hypersaccharosé de Mayeux et Sandine (MSE) (Badis et al., 2005).

- **L'étude de l'aspect macroscopique :**

L'étude de l'aspect macroscopique des souches lactiques isolées sur milieu MRS solide semblées des colonies petites, rondes, blanches, et lenticulaires (**Figure 7**). Par contre, sur milieu MSE apparaissent transparentes, gluantes et gélatineuses (**Figure 8**) suite à l'utilisation du saccharose et formation de dextrane nos résultats semblent à ceux trouvés par (Badis et al., 2005).

- **L'étude de l'aspect microscopique :**

L'observation microscopique montre que les cellules sont Gram positive et négative avec une forme ovoïde associées en paires ou en courtes chainettes (**Figure 12**) ;(Kihal, 1996 ; Carr et al, 2002).

- **Caractéristiques physiologiques et biochimiques :**

Tous les isolats présentent une activité catalasique négative, capables de produire du gaz à partir du glucose (hétérofermentaires), incapable de dégrader l'arginine ; (**Figure 11, 13 et 15**) ces isolats sont considérés du genre de *Leuconostoc* (Garvie, 1986 ; Badis et al., 2005 ; Ogier et al., 2008 ; Ghazi et al., 2009).

On a pu sélectionner 9 souches de ce genre comme souches pures isolées de Lait cru de chèvre codées par (S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8 et S9).

- **La croissance à différentes températures et la thermorésistance :**

Toutes nos souches isolées et purifiées ont poussé à 15°C, 30°C et 37°C mais pas à 4°C ni à 44.5°C. Ce constat confirme leur caractère mésophile. La thermorésistance a été aussi testé à 63.5°C pendant 30min où la croissance de nos souches est restée négative chez tous les isolats par contre les isolats ont pu résister à 55°C pendant 15min.

Nos résultats sont similaires à ceux trouvés par Garvie (1984) et (Dellaglio et al., 1994). Les *Leuconostoc* sont généralement mésophiles, avec une température optimale de croissance de 25 à 30°C.

- **La croissance à différents pH :**

Les isolats poussent à pH 6.5 et non pas à pH 4,8. Ce qui est confortable aux résultats de Mc Donald et al., (1990) qui a montré que les *Leuconostoc* "laitiers" se développent le mieux à un pH proche de celui du lait et sont inhibés en milieu acide (le pH interne de la cellule atteint 5,4-5,7).

- **La croissance à différentes concentrations de NaCl :**

Tous les isolats sont résistants à 3% de NaCl ; mais pas à 6.5% de NaCl.

Ces caractéristiques physiologiques et biochimiques sont confortables aux résultats de (Dellaglio et al., 1994).

- **La production de dextrane sur le milieu MSE :**

Est un caractère important, nos 9 isolats sont capables de dégrader le saccharose et de produire le dextrane.

A) De grosses colonies gluantes, devenant rapidement confluentes au fur et à mesure que l'incubation se prolonge.

B) de petites colonies (2 mm environ de diamètre) bombées et adhérant fortement à la surface de la gélose, ce qui a été montré par (Mayeux et Lliker, 1962 ; Garvie, 1984 ; Carr et al., 2002 ; Badis et al., 2005).

- **L'utilisation de citrate :**

La fermentation des citrates est un phénomène important chez *Leuconostoc* puisqu'elle est en relation très étroite avec l'activité aromatique de ces microorganismes. (Raynaud et al., 2003).

Les neuf souches présentent un résultat positif sur le milieu KMK par une formation des colonies bleues ce qui a été déjà démontré par (Bellengier et al., 1994 ; Kihal et al., 1996 et Guirraud, 1998).

- **L'utilisation des carbohydrates :**

Même si les souches lactiques se développent dans une variété d'habitat, elles exigent des carbohydrates fermentescibles, des acides aminés et des acides gras, des sels et de vitamines pour leurs croissances (Hemme et al., 1980).

L'établissement des profils fermentaires de nos souches, nous permet de constater que toutes les souches fermentent l'amidon, le galactose, le saccharose, le fructose, le maltose, tandis qu'elles possèdent une lente ou bien ne fermentent pas le mannitol, la xylose.

- **Les caractéristiques biotechnologiques des isolats :**

Les principales fonctions demandées aux levains lactiques sont : la production d'acide, la protéolyse, la lipolyse, la production de gaz et d'arôme et l'inhibition des bactéries indésirables (pathogènes entre autres). (Stadhouders, 1974).

- **Pouvoir protéolytique :**

Les résultats obtenus dans cette étude montrent l'absence d'activité protéolytique sur MRS additionné avec 1% de lait écrémé ces résultats sont en concordance avec ceux de (Garvie, 1986).

- **Pouvoir Lipolytique :**

Nos résultats montrent l'absence d'activité lipolytique en milieu MRS additionné par tween 80. Ces résultats sont en accord avec ceux de (Stackebrandt et al., 2002) qui a montré que la lipolyse est relativement faible chez les ferments lactiques ainsi selon (Meyers et al., 1996 ; Karam N-E, 2012 ; Belkheir K. et al., 2012) qui ont montré que l'activité lipolytique en milieu MRS additionné par les substrats lipidiques comme le Tween 80 comme unique source lipidique était absente chez les *Leuconostoc*.

- **Etude des interactions :**

### **1. Méthode directe :**

Tous nos 09 isolats présentent une interaction négative qui correspond à une inhibition de la croissance et de l'activité métabolique envers les trois souches pathogènes et/ ou d'altération. Cependant, l'étude des interactions entre les bactéries lactiques (*Leuconostoc*) a révélé une

interaction positive qui se caractérise par la symbiose entre les bactéries (Les souches sont regroupées sous le terme de coopération) ;(Figures 25, 26 et 27) et (Tableau10).

Les résultats exposent que les diamètres d'inhibitions varient selon les espèces. ;(Figures 25, 26 et 27) et (Tableau10). Dont on a marqué:

-S1 comme la souche la plus performante contre *E. Coli* avec un diamètre d'inhibition égale à 13mm ;

-S1 comme la souche la plus performante contre *Staphylococcus aureus* avec un diamètre d'inhibition égale à 15mm ;

-S1 comme la souche la plus performante contre *Pseudomonas aureginosa* avec un diamètre d'inhibition égale à 11mm ;

-S1 et S6 comme les souches les plus performantes contre *Staphylococcus aureus* avec un diamètre d'inhibition égale à 15mm.

-S2, S4 et S9 n'ont pas fait une action antimicrobienne contre les 3 souches pathogènes à cause de l'absence du peroxyde d'hydrogène qui est la cause de cette action antimicrobienne.

Cette action antimicrobienne est expliquée par la synthèse des molécules comme les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyle et les bactériocines (Vuyst et Vandamme 1994).

## **2. Méthode indirecte :**

Le criblage pour la production de substances antagonistes a été réalisé dans des conditions excluant toute inhibition éventuelle qui pourrait être due à l'acidité ou à la production du peroxyde d'hydrogène, en utilisant respectivement des milieux de cultures tamponnés et la catalase. (Alakomi et al., 2000).

Ce test a montré que six isolats ont un pouvoir antibactérien assez remarquable et qui sont les suivants : (S1, S3, S4, S7, S8, S9). Ce qui indique la synthèse d'autre substance antibactérienne et exclut donc la présence d'eau oxygénée ou de diacétyle dont l'activité antibactérienne persiste après contact avec l'enzyme non protéolytique (catalase).

- **Antibiogramme :**

La mise en évidence d'un antibiogramme des trois souches pathogènes *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. Coli* obtenu comme référence a été réalisé afin de s'assurer que les antibiotiques fonctionnent correctement. Les diamètres obtenus ont été comparé avec les diamètres critiques pour les diverses classes d'antibiotiques recommandés pour certaines espèces ou certains groupes bactériens proposés par le comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (2009), afin de classer les souches comme résistante (R), Intermédiaire (I), sensible (S). Cet antibiogramme a été effectué sur un milieu MRS.

Les trois souches testées sont quasiment sensibles à la chloramphénicol, cephaléxine, pénicilline G ce qui est semblable avec les travaux de Milliere et al., (1989) ; Kihal, (1996). Tandis que *Pseudomonas aeruginosa* possède un profil intermédiaire vis-à-vis la gentamicine et *Staphylococcus aureus* est résistante à la tétracycline contrairement aux autres souches qui sont sensibles.

Les résultats observés indiquent que toutes les souches sont résistantes à la pristinamycine, selon Hemme et al., (2004), cette résistance est généralement une caractéristique intrinsèque, elle est liée à la présence deux facteurs A et B qui agissent en synergie (synergistines ou streptogramines), Cet antibiotique a une activité essentiellement dirigée contre les bactéries Gram positif. Cette résistance acquise est largement répandue dans de nombreuses espèces initialement sensibles (LECLERCQ R et al., 1991). En 1977, les premiers cas de résistance plasmidique concernant les deux facteurs des streptogramines ont été rapportés sur des souches de *Staphylococcus aureus* impliquées en pathologie (LE GOFFIC F et al., 1977).

Pour l'ensemble d'antibiotiques testés, on n'observe pas une grande différence entre les souches étudiées. Nos résultats de l'antibiogramme sont semblables avec ceux trouvés par Milliere et al., (1988) ; Swenson et al., (1990) ; Kihal, (1996) ; Philippon et al., (2008).

**CONCLUSION**

**GENERALE**

## CONCLUSION GENERALE

Les espèces de *Leuconostoc* sont des bactéries lactiques exigeantes sur le plan nutritionnel, qui se caractérisent par la production du CO<sub>2</sub> et l'incapacité d'hydrolyser l'arginine. Leur utilisation est apparue empiriquement dans la fabrication des aliments fermentés divers comme les fromages, les charcuteries, les boissons fermentées, l'ensilage, les saumures etc. Leur aptitude de produire les exopolysaccharides « Le dextrane » et le diacétyle leur donne un rôle important dans la modification de la saveur et la texture des aliments.

Les principaux objectifs de ce travail ont été réalisés avec succès, des informations de base sur les caractéristiques ont été conclues. Toutefois, beaucoup de travail reste à réaliser avant de comprendre et de maîtriser totalement ces bactéries.

Nous avons entamé notre travail par l'isolement de *Leuconostoc* isolé du lait cru de chèvre.

L'utilisation des milieux sélectifs MSE et MRS à 30µg/ml de vancomycine nous a permis d'éliminer les autres bactéries lactiques qui peuvent se confondre avec les *leuconostocs*.

On note que neuf souches de *Leuconostoc* ont été isolées dont du lait de chèvre.

Par la suite les neuf isolats ont fait l'objet des tests d'inhibition vis-à-vis *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia Coli*. Les trois souches pathogènes ont été inhibées par les neuf souches de *Leuconostoc*.

Il apparaît alors dans les résultats que plusieurs cas d'activité antagonistes ont été décelés, ainsi la recherche de la nature de l'agent inhibiteur, ce composé antimicrobien qui constitue une arme efficace contre les germes d'altération ou les pathogènes, nous a permis de constater que l'inhibition peut être due à :

- La production d'acide lactique ce qui été le cas des souches S3, S5, S6, S7 et S8.
- La synthèse du peroxyde d'hydrogène cas des souches S2, S4 et S9.

On a remarqué aussi que le peroxyde d'hydrogène produit par les souches S2, S4, et S9 a donné des inhibitions importantes vis-à-vis des trois souches pathogènes *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia Coli*.

La sensibilité des souches aux antibiotiques a été évaluée avec 07 antibiotiques, cet antibiogramme nous permet de conclure que les trois souches (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Escherichia coli* ATCC 25922) sont

résistantes à la pristinamycine. Tandis que, les trois souches testées sont quasiment sensibles au chloramphénicol, céphalexine, pénicilline G.

Egalement, *Pseudomonas aeruginosa* possède un profil intermédiaire vis-à-vis la gentamicine et *Staphylococcus aureus* est résistante à la tétracycline contrairement aux autres souches qui sont sensibles.

Les résultats apportés par notre travail nous ont permis de mettre en valeur plusieurs aspects technologiques des *leuconostocs* et d'observer que même au sein du même genre et de la même espèce il existe de grande variation autant au niveau de l'aptitude acidifiante que l'activité antimicrobienne. La détermination de ces deux fonctions est cependant un bon outil pour la prédiction de la capacité des souches testés a donné un bon produit fermenté ayant les qualités désirer.

Les tests utilisés pour évaluer les différentes activités sont simples et rapides pour le développement d'un modèle prédictif et également un bon outil pour la sélection et le développement de nouveau ferment ayant de très bonnes aptitudes fermentaire. Une meilleure caractérisation des activités enzymatiques des souches bactériennes est donc une approche simple qui peut être très utile à l'industrie, car la qualité des produits fermentés reflète la bonne connaissance des activités métaboliques des levains utilisés.

Enfin, en extension à ces perspectives, notre ambition porte maintenant sur un autre volet de recherche plus vaste ; nous suggérons l'utilisation des techniques moléculaires afin de confirmer l'identification de nos souches, l'extraction de l'ADN plasmidique et le clonage des gènes responsables des propriétés technologiques. Nous espérons ainsi donner suite à l'étude de la substance inhibitrice de l'isoler, là purifiée et l'identifiée avec précision pour permettre son exploitation dans la bio-préservation d'aliment ou d'ensilage et dans la biothérapie.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Achemchem F. et Abrini J.**, 1997. Production de bactériocines par des bactéries lactiques à partir du jben de chèvre du Nord du Maroc. *Journal of Applied Microbiology*, 70, 660-669.
- Ahoyo A A.T, Baba-Moussaa L, Anagob A.E, Avogbea P, Missihouna T.D, Loko, F, Prevost G, Sannia A, Dramane K.** (2007). Incidence d'infections liées à *Escherichia coli* producteur de bêta-lactamase à spectre élargi au Centre hospitalier départemental du Zou et Collines au Bénin. *Médecine et maladies infectieuses*; 746-752.
- Alain R., Bernard J.** (2002). *Entérobactéries*. Ed lavoisier. 29-38.
- Amiot J et Lapointe-vignola C.** 2002. *Science et technologie du lait : transformation du lait*. Presses intl. Olytechnique. Quebec. 600.
- Amiot J., Fournier S., Lebeuf Y., Paquin P. et Simpson R.,** 2002: composition, propriétés physicochimique, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait. Chapitre I.
- Ammor M.Salim, Tauveron Grégoire, Dufour Eric, Chevallier Isabelle,** 2006. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. 1-Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control.*, 17: 454-461
- Ammor Mohammed Salim,** 2004. Ecosystème microbien d'un atelier fermier de salaison : Identification et propriétés des bactéries lactiques. Thèse de Doctorat en physico-chimie et qualité des bioproduits. Université de Rennes 1-France.
- Ammor S., Tauveron G., Dufor E. et Chevalier I.,** 2006. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 1- Screening and characterization of antibacterial compound. *Food Control.* 17 : 454-461.
- Andre Eck, Jean-Claude Gillis (Coord.),** 2006. *Le fromage, De la science à l'assurance-qualité*, TEC&DOC, lavoisier, (ISBN 978-2-7430-0891-8), chap. 10 (« Les phénomènes microbiens par C. Choisy, Desmazeaud, Gueguen, Lenoir, Schmidt, Tourneur »).
- Atmani S, Aouragh R, Bouharrou A, Hida M.** (2007). L'infection des voies urinaires du nouveau-né : à propos de 23 cas. *Journal de pédiatrie et de puériculture* ; 20 :70- 73.
- Avril J. M., Dabernat H. et Monteil D. H.** (2000). *Bactériologie clinique*. 3ème Ed., Ellipses. Paris. 602.
- Axelsson Lars,** 2004. *Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology In Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects*. Salminen S., Wright A.v., Ouwehand A. 3<sup>e</sup> Ed., Marcel Dekker, pp: 1-66.

- Badis A., Laouabdia-Sellami N., Guetarni D .Kihal M.et Ouzrout R.** 2005. Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales “Arabia et Kabyle”. *Sciences et technologie*. 23,30-37.
- Barefoot S.F. et Klaenhammer T.R.,** 1983. Detection and activity of lacticin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *App. Env. Microbiol.* 45 : 1808-1815.
- Bauer A.N., Kirby W.M.M., Sherris J.S. et Turk M.** 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disc method. *Ann. Clin. Pathol.* 45 : 493-496.
- Benkerroum N. Ghouati Y.Sandine W.E. Tantaoui-Elaraki A.** 1993. Methods to demonstrate the bactericidal activity of bacteriocins. - *Lett. Appl. Microbiol.*, 17(2), 78-81.
- Berche. P, Gaillard. J.L, Simonet.M,** 1989 : *Bactériologie, les bactéries des infections humaines*. Flamario médecine-France, 230-245.
- Bergey et al.** (1994) de 9<sup>ème</sup> Edition; *BERGEY’S Manual of determinative bacteriology*.
- Bottazzi V.,** 1988. An introduction to rod-shaped lactic bacteria, *Biochimie*, 70: 303-315.
- Bourel G., Henni S., KrantarK., ORABY M., DIVIES C., GARMYN D.,** 2001 *Métabolisme sucre-citrate chez Leuconostoc mesenteroides*. *Le lait* 81,75-82.
- Bourgeois P., Renault P., De Roissart H., Rouvier C.,** 1994. Méthodes d’identification des bactéries lactiques In *Bactéries lactiques*. De Roissart H., Luquet F.M. Tome 1, Loriga. pp: 141-160.
- Bover-Cid, S., Holzappel, W.H.,** 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 53, 33-41.
- Brooker B.E.,** 1977. Ultrastructural surface changes associated with dextran synthesis by *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Baeteriol.*, 131, 288-292.
- Brul S., Coote P.,** 1999. Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms. *Int. J. Food Microbiol.*, 50(1-2): 1-17.
- Caplice E., Fitzgerald G.,** 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 50(1-2) : 131-149.
- Carr Frank J., Chill Don, and Maida Nino,** 2002. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28(4): 281–370.
- Chilliard Y et Sauvant D.** 1987. La sécrétion des constituant du lait. In : *INRA-CEPIL. Le lait, Matière première de l’industrie laitière*. Paris. P13-26.
- Choisy C., Desmazeaud M., Gueguen M., Lenoir J., Schmidt J. L. et Tourneur C.,** 1997. Les phénomènes microbiens. In : *Le fromage* (Eck A. et Gillis J.C.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 377-446.
- Chomarar M., Gerard A., Jehl F. et Weber M.** (2004). *De l’antibiogramme à la prescription*, 2<sup>ème</sup> Ed, Biomérieux, Paris.

**Cibik, R., Lepage, E., et Tailliez, P.,** 2000. Molecular diversity of *Leuconostoc mesenteroides* and *Leuconostoc citreum* from traditional french cheeses as revealed by RAPD fingerprinting, 16S rDNA sequencing and 16S rDNA fragment amplification. *Journal of Systematic and Applied Microbiology* 23: 267-278.

**Cogan T.M.,** 1975. Citrate utilization in milk by *Leuconostoc cremoris* and *Streptococcus diacetylactis*. *J. Dairy Res.*, 42, 139-146.

**Cogan T.M.,** 1980. Les levains lactiques mésophiles. Une revue. *Lait*, 60, 397-425.

**Collins M.D., Farrow J.A.E., Phillips B.A., Feresu S. et Jones D.,** 1987. Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola*, and some catalase-negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus, *Carnobacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 37: 310-316.

**Dalache F., Kacem M. et Karam N.E.** 2003. Antibiorésistance de bactéries lactiques isolées de laits crus de vache, chèvre, brebis et chamelle d'Algérie. *Renc. Rech. Ruminants*. p 231.

**De Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E.,** 1960. A medium for the cultivation of *Lactobacillus*. *J. Appl. Bacteriol.*, 23, 130-135.

**De Moss R.D.,** 1954. A triphosphopyridine nucleotide-dependent alcohol dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*. 1. *Bacteriol.*, 68, 252-257.

**De Roissart H.** 1986. Bactéries lactiques In Ecosystème microbien d'un atelier fermier de salaison identification et propriétés des bactéries lactiques. Thèse de doctorat. Université de Rennes-France.

**De Vuyst L., Avonts L., Markras E.,** 2004. Probiotics, prebiotics and gut health. In : Remacle C. (Ed.), *Functional Foods, Ageing and Degenerative Disease*. Taylor & Francis : London, 416-482. DEA présenté à l'ENSAIA, Nancy, France.

**De Vuyst Luc, Leroy Frédéric,** 2007. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications. *J. Mol. Microbiol Biotechnol.*, 13: 194-199.

**Dellaglio F., De Roissart H., Torriani S., Curk M.C. et Janssens D.,** 1994. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In : *Bactéries lactiques* (De Roissard H. et Luquet F.M.). Loriga, Uriage. 1 : 25-116.

**Delmotte A. ,**1958. L'activité lipolytique microbienne décelée par la méthode de SIERRA avec référence spéciale au *M. pyogenes*. 309-330.

**Desjeux, J.F.** 1993. Valeur nutritionnelle du lait de chèvre. *Lait*. 73: 573-58.

**Desmazeaud M.J. et De Roissart H.,** 1994. Métabolisme général des bactéries lactiques. In *Bactéries lactiques*. De Roissart H., Luquet F.M. Tome 1, Loriga. Pp : 169-207.

**Desmazeaud Michel,** 1998. Bactéries lactiques et qualité des fromages. Laboratoire de recherches laitières, INRA Jouy-en-Josas. France.

- Devoyod, J.J. Françoise Poullain.,** 1988. « Les leuconostocs, Propriétés : leur rôle en technologie laitière », *Le lait*, vol. 68, no 3. 249-280.
- Devoyod J.J., Muller M.,** 1969. La flore microbienne du fromage deRoquefort. III. Les streptocoques lactiques et les leuconostoc. Influence de différents microorganismes de contamination. *Lait*, 49, 369-399.
- Dortu C., Thonart P. ,**2009.Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 13 143-154.
- El Marrakchi A., Tantaoui-Elaraki A., Hamama A. & Grini A.** (1988). La flore microbienne du smen marocain. Flore lipolytique et caséolytique. *Le lait.* 68, 333-348.
- Eom H-J., Seo D.M., Han N.S.,** 2007. Selection of psychrotrophic *Leuconostoc* spp. producing highly active dextransucrase from lactate fermented vegetables. *Int .J. Food Microbiol.*, 117: 61-67.
- Fleming, H. P, Erchells, J.L. etCaslilow R.N. ,** 1975. Microbial inhibition on isolate *Pediococcus* from cucumber bunc. *Appl. Environ. Microbiol.* 30, 1040-1042.
- Galeslootte.,** 1962. The bacteriology and biochemistry of starters and ripened cream. 16th Int. Dairy Congr., Copenhagen, D, 143-161.
- Garvie E.I. ,**1984. Separation of species of the genus *Leuconostoc* and differentiation of the leuconostocs from other lactic acid bacteria. *Methods Microbiol.* 16, 147-178.
- Garvie E.I.,** 1967. The growth factor and amino acid requirements of species of the genus *Leuconostoc* including *Leuconostoc paramesenteroides* (sp. nov) and *Leuconostoc oenos*.*J. Gen. Microbiol.*, 48, 439-447.
- Garvie E.I.,** 1986. Gram positive cocci - Genus *Leuconostoc*. In: *Bergeys'Manual*, 9th edit., the Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp: 1071-1075.
- Gessard Carle.** (1984). "Classics in infectious diseases. On the blue and green coloration that appears on bandages". *Rev Infect Dis* 6, S775-776.
- Giraffa G., Carminati D., Neviani E.,** 1997. Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. *J. Food Prot.*, 60: 732-737.
- Gonzalez De Llano, D., Cuesta, P., Rodriguez, A.,** 1998. Biogenic amine production by wild lactococcal and *Leuconostoc* strains. *Letters in Applied Microbiology.* 26, 270-274.
- Gonzalez L., Sandoval H., Sacristan N., Castro J.M., Fresno J.M., Tornadijo M.E.,** 2007. Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. *Food Control.*, 18: 716-722.
- Grappin et al. ,** 1981, Etude des laits de chèvre : teneur du lait de chèvre en matière grasse, matière azotée et fractions azotées, *Lait*61, 117-133.
- Gratia A.,** 1925. C R Seanc Soc Biol 93:1040-1041, In Mayr-Harting and others. 1972.

**Grinont P.A.** (1987). Taxonomie des *Escherichia coli*. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 6-10.

**Gu, C.T., Wang, F., Li, C.Y., Liu, F., et Huo, G.C.**, 2010. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *suonicum* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62 : 1548-1551.

**Gueguen B., Chamba J.F., Coulon J. et Perreard E.** 1996. Effect of milk chemical composition and clotting characteristics on chemical and sensory properties of Reblochon de Savoie cheese. *J. dairy sci.*, 64: 157-162.

**Guessas B. et Kihal M.**, 2004. Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goat's milk. *African Journal of Biotechnology* Vol. 3(6) ,339-342.

**Guessas B., Hadadji M., Saidi N. & Kihal, M.** 2005. Inhibition of *Staphylococcus aureus*. 1984. *Science du lait, principes des techniques laitières*. Ed. SEPAIC. Paris.

**Guiraud J.P.**, 1998. *Microbiologie alimentaire*, Ed. Dunod, Paris, 1998. 282-290.

**Guiraud J.P.**, 2003. *Microbiologie Alimentaire*. Tec & Doc, Dunod. Paris. 90-29.

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

**Hadadji M.** 2006. Caractérisations technologiques des bifidobactéries à intérêt thérapeutique. Thèse de Doctorat d'Etat. Université d'Oran Algérie.

**Hammes, W. P., et Hertel, C.**, 2006. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., and Stackebrandt, E. (Eds). *The prokaryotes*, Vol. (4). Springer Science and Business Media. New York, USA. pp320-403.

**Hanes D., Nontyphoid S. Miliotis N., Bier J.** (2003). *International Handbook of Food borne Pathogens*, Marcel Dekker: New York, 137-149.

**Hegazi F.Z., Abo-Elnaga I.G.**, 1980. Degradation of organic acids by dairy acid bacteria. *Zentralbl. Bakteriol. II Abt.*, 135, 212-222.

**Helist P. et Korpela T.** ,1998. Effect of detergents on activity of microbial lipases as measured by the nitro phenyl alkanoate esters method. *Enzyme and microbial technology*. 23: 113-117.

**Hemme Denis, Foucaud-Scheunemann Catherine**, 2004. *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy Journal*., 14: 467-494.

**Ho Thi Nguyet Thu**, 2008. Étude de la flore lactique du Nem Chua, produit carné fermenté cru traditionnel du sud Vietnam et maîtrise du processus de fermentation par ajout de souches lactiques sélectionnées spécifiques du produit. Thèse de Doctorat en Sciences des Aliments et Nutrition. Université Bordeaux 1- France.

**Holzappel W.H.**, 2002. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *Int. J. Food Microbiology*. 75 : 197-212.

**Ignacio Sanchez, J., Martínéz, B et Rodriguez, A.** (2005). Rational selection of *Leuconostoc* strains for mixed starters based on the physiological biodiversity found in raw milk fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 105:377- 387.

**Ito S., Kobayashi T., Ohta Y., Akiyama Y.**, 1983. Inhibition of glucose catabolism by aeration in *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Ferment. Technol.*, 6, 353-358.

**Jacob F., Siminovitch L., Wollman E.**, 1953. Comparison between the induced biosynthesis of colicine and of bacteriophage and between their mode of action. *Ann. Inst. Pasteur*, 84(1): 313-318.

**Jaubert J. et Mourre V.** 1996. Growth of yeast contaminants in an immobilized lactic acid bacteria system. *Lett. Ppl. microbiol.* 8:207... 313-341. *Staphylococcus aureus* growth in milk by lactic acid bacteria. *Dirassat*, 32: 53-60.

**Joffraud J.-J., Cardinal M., Cornet J.**, 2006. Effect of bacterial interactions on the spoilage of cold smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, 112: 51-61.

**Joly B. et Reynaud A.** (2002). *Entérobactéries: Systématique et méthodes de diagnostic*. Ed TEC & DOC et Ed médicales Inter Nationales. Paris. 356.

**Kadri M et al.**, (2010). Pathogénie d'*Escherichia coli*. *BACTERIOLOGIE MEDICALE*. Médecine-Science, 2ème Ed., Flammarion, Paris.

**Kandler O., Weiss N.**, 1986. Regular, non-sporing gram-positive rods In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G., Williams and Wilkins (Eds), Baltimore, 2: 1208-1234.

**Keenan T.W., Lindsay R.C.**, 1966. Removal of green flavor from ripened butter cultures, *J. Dairy sci.*, 49,1563-1565.

**Kempler G.M., McKay L.L.**, 1980. Improved medium for detection of citrate fermenting *Streptococcus lactis* ssp *diacetylactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 39, 926-927.

**Kempler G.M., McKay L.L.**, 1981. Biochemistry and genetics of citrate utilization in *Streptococcus lactis* ssp *diacetylactis*. 1. *Dairy sci.*, 64, 1527-1539.

**Khaoua Saida, Elhaloui Nour Eddine & Lefebvre Gerard .**, 1997 .Caractérisation, purification et détermination de la structure partielle d'une bactériocine de la souche *Lactococcus lactis* C16. *Actes Inst. Agron. Veto (Maroc)*, Vol. 17. 1,15-25 © Actes Éditions, Rabat.

**Khedid, K., Faid, M., Mokhtari, A., Soulaymani, A et Zinedine, A.** (2006). Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. *Microbiol. Res.*10:10-16.

- Kihal M**, 1996. Etude de la production du dioxyde de carbone par *Leuconostoc mesenteroides*, éléments d'application en technologie fromagère type fromage bleu. Thèse de Doctorat d'Etat. Université d'Oran Algérie.
- Kihal M, Prevost H, Lhotte M.E, Huang D.Q, Divies C.** 1996. Instability of plasmid-encoded citrate permease in *Leuconostoc*. *J. Appl. Microbiol.* 22, 219–223.
- Klaenhammer T.R.**, 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie.*, 70: 337-349.
- Klaenhammer T.R., Fremaux C., Hechard Y.**, 1994. Activité antimicrobienne des bactéries lactiques In *Bactéries lactiques*. De Roissart H., Luquet F.M. Tome 1, Loriga. Pp: 353-366.
- Klein G., Pack A., Bonaparte C., Reuter G.**, 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria *International Journal of Food Microbiology.* 41: 103-125.
- Kobayashi M., Matsuda K.**, 1974. The dextransucrase isoenzymes of *Leuconostoc mesenteroides*. *Biochim. Biophys. Acta*, 370, 441-449.
- Kobayashi M., Matsuda K.**, 1986. Electrophoretic analysis of the multiple forms of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides*. 1. *Biochem.*, 100, 615-621.
- Kozak W., Bardowski J., Dobranski W.T.**, 1978. Lactostrepcins-acid bacteriocins produced by lactic streptococci. *J. Dairy Res.*, 45, 247-257.
- Lancefield R.C.**, 1933. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J. Exper. Med.*, 57: 571-595.
- Larpent J-P.**, 1996a. Les bactéries lactiques In *Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentation alimentaires*. Bourgeois C.M., Larpent J-P. Tome 2, Tec & Doc, Lavoisier, pp: 4-33.
- Lawrencer .C., Thomas T.D., Terzaghi B.E.**, 1976. Reviews of the progress of Dairy Science: heese starters. 1. *Dairy Res.*, 43, 141-193.
- Le Goffic F., Capmau M.L., Bonnet D., Soussy C., Dublanchet A., Duval J.** - Plasmid-mediated pristinamycin resistance. *J Antibiot.* 1977; 30: 665-9.
- Leclercq R., Courvalin P.** - Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991; 35: 1267-72.
- Lee M. T., Chen F.Y., et Huang, H.W.**, 2004. Energetics of pore formation induced by membrane active peptides. *Biochemistry.* 43, 3590-3599.
- Lees G.J., Jago G.R.**, 1976. Acetaldehyde: an intermediate in the formation of ethanol from glucose by lactic acid bacteria. *J. Dairy Res.*, 43, 63-73.
- Leveau J-Y., Bouix Mrielle, De Roissart H.**, 1991. La flore lactique In *Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires*. Bourgeois C.M., Leveau J Y. Tec & Doc, Lavoisier, pp: 152-186.
- Liebefeld**, 2002. *Microbiologie des cultures*. Unité de recherche « lait, fromage ».

- Lindsay R.C., Day E.A., Sandine W.E.,** 1965. Green flavor defect in lactic starter cultures. *J. Dairy Sci.*, 48, 863-869.
- Lister, P. D., D. J. Wolter, et al.** (2009). "Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms." *Clin Microbiol Rev* 22(4): 582-610.
- Liu S.,** 2003. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 83(2): 115-131.
- Lucey C.A., Condon S.,** 1986. Active role of oxygen and NADH oxydase in growth and energy metabolism of *Leuconostoc*. *J. Gen. Microbiol.*, 132, 1789-1796.
- Ludwig W., Schleifer K-H., Whitman W.B.,** 2008. *Bergey's taxonomic outlines – Revised Road Map to the Phylum Firmicutes.*, vol. 3.
- Mathot A. G. Kihal M. Prevost H. et Divies C.** 1994. Selective enumeration of *Leuconostoc* on Vancomycin agar medium. *International Dairy Journal*, 4, 459-169.
- Mathot A.G., Beliard E., Thnault D.,** 1996. Propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques In *Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentation alimentaires*. Bourgeois C.M., Larpent J-P. Tome 2, Tec & Doc, Lavoisier, pp: 432-450.
- Mathot, A. G., Kihal, M., Prévost, H et Diviés, C.** (1994). Selective enumeration of *Leuconostoc* on vancomycin agar medium. *Int. J. Dairy*, 4:459-469.
- MAYEUX J., SANDINE W., ELLIKER P.,** 1962. A selective medium for detecting *Leuconostoc* organisms in mixed strain starter cultures. *J. Dairy Sci.*, 45, 655-656.
- Mayeux, J.V., Sandine, W.W.E et Elliker, P.R.,** (1962): A selective medium for detecting *Leuconostoc* organisms in mixed strain starter cultures". *J. Dairy.Sci.*45:655-656.
- Mc Donald L.C., Flemming H.P. & Hanssen H.M.,** 1990. Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2120-2124.
- Melzer Mark, Petersen Irene.** (2007). Mortality following bacteraemic infection caused by extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *E. coli* compared to non- ESBL producing *E. coli*. *Journal of Infection.* 55: 254-259.
- Mesaros, N., P. Nordmann, et al.** (2007). "*Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium." *Clin Microbiol Infect* 13(6): 560-578.
- Metchnikoff E.,** 1908. *Prolongation of life: Optimistic studies.* William Heinemann, London. pp: 161-183.
- Milliere J. B., Mathot A. G., Schmitt P. et Divies C.** 1989. Phenotypic Characterization of *Leuconostoc* species. *Journal of applied bacteriology* 67, 529-542.
- Minor L. et Richard C.** (1993). *Méthodes de laboratoire pour l'identification des entérobactéries.* Institut Pasteur, Paris.

**Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C., Jorganes, F., Munoz, R.,** 2003. Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *International Journal of Food Microbiology* 84, 117-123.

**Moulay, M.** (2005) : Etude de la flore lactique protéolytique du lait cru de chèvre de la collection du laboratoire de microbiologie appliquée (LMA). Thèse de magister. Université d'Oran Es-Senia.

**Novel G.,** 1993. Les bactéries lactiques In *Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel*. Leveau J-Y., Bouix M. Tec & Doc, Lavoisier, pp : 170-374.

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

**Ogier, J.C., Serror, P.,** 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology* 126, 291-301.

**Orla-Jensen S.,** 1919. *The Lactic Acid Bacteria*. Dairy Bacteriology, Fred Host and Son, Copenhagen.

**Pederson C.S., Albury M.N.,** 1955. Variation among the heterofermentative lactic acid bacteria. *J. Bacteriol.*, 70, 702-708.

**Pellerin, P.,** 2001. Mise au point Intérêt nutritionnel de lait de chèvre Connaissances actuelles et perspectives. *Ann Pharm Fr.* 59: 51-62.

**Penaud Stéphanie,** 2006. Analyse de la séquence génomique et étude de l'adaptation à l'acidité de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* ATCC11842. Thèse de Doctorat en Agronomie, Institut National Agronomique de Paris-Grignon.

**Philippon A. et Poyart C.** 2008. Autres coques à Gram positif catalase négative d'intérêt médical : *Aerococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*. EMC Elsevier Masson SAS. Biologie clinique. 90-05-0120. p 1-11.

**Pilet M-F., Magras Catherine et Michel Federighi,** 2005. Bactéries lactiques In *Bactériologie alimentaire "compendium d'hygiène des aliments"*. Federighi M. Economica, pp: 219-242.

**Plou F. G., Ferrer M., Nuero O. M., Calvo M. V., Alcalde M., Reyes F. & Ballesteros A.,** 1998. Analysis of Tween 80 as an esterase/lipase substrate for lipolytic activity assay. *Biotechnology techniques*. 12, 183-186.

**Prescott L. M., Harley J. P., Klein D. A.,** 1999. *Microbiology*, 4th edn. New York: WCB/McGraw-Hill.

**Robyt J.F., Walseth T.F.,** 1978. The mechanism of acceptor reactions of *Leuconostoc mesenteroides* B-512 F dextranucrase. *Carbohydr. Res.*, 61, 433-445.

**Rodolphe B., Yoon SS, Frederick B., Henry P.F., Todd R.K.,** 2002. Identification and Characterization of *Leuconostoc fallax* Strains isolated from an Industrial Sauerkraut Fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2877-2884.

- Salminen S., Gorbach S., Yuan-Kun L., Benno Y.,** 2004. Human studies on probiotics: What is scientifically proven today? In *Lactic Acid bacteria: Microbiological and functional Aspects*. Eds salimen S., von Wright A., Ouwerhand A., New york Dekker M. pp: 515-530
- Samelis, J., Maurogenakis. F et Metaxopoulos, J.** (1994). Characterization of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented greek dry salami. *Int. J. food Microbiol.*23:179-196.
- Sanchez J.I., Martinez B. & Roriguez A. ,**2005. Rational selection of *Leuconostocs* strains for mixed starters based on the physiological biodiversity found in raw milk fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 105, 377-387.
- Sandine W.E., Elliker P.R., Hays H.,** 1962. Cultural studies on *Streptococcus diacetilactis* and other members of the lactic streptococcus group. *Cano J. Microbiol.*, 8: 161-174.
- Sandine W.E., Radich P.C., Elliker P.R.,** 1972. Ecology of the lactic streptococci. A review. *J. Milk Food. Techn.*, 35: 176-185.
- Schillinger U., Lücke F-K.,** 1987. Identification of lactobacilli from meat and meat products. *Food Microbiology.* 4: 199-208.
- Schleifer K.H., Kraus J., Dvorak C., Kilpper-Bälz R., Collins M.D., Fischer W.,** 1985. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Syst. Appl. Microbial.*, 6: 183-195.
- Schleifer K.H., Stackebrandt E.,** 1983. Molecular systematics of procaryotes. *Annu. Rev. Microbiol.*, 37: 143-187.
- Schleifer K.H.et Kilpper-Bälz R.,** 1987. Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of Streptococci, Enterococci and Lactococci: a review. *Syst. Appl. Microbiol.*, 10: 1-19.
- Sharpe M.E.,** 1981. The genus *Lactobacillus* In *The Procaryotes. A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria.* Starr M.P., Stolp H., Truper H.G., Balows A., Schlegel H.G., Springer-Verlag (Eds) Berlin, 1653-1674.
- Sierra G.,** 1957. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Lecuwenhoek Ned. Tijdschr. Hyg.* 23,15-22.
- Smith E.E.,** 1970. Biosynthetic relation between the soluble and insoluble dextrans produced by *Leuconostoc mesenteroides* NRLL B. 1299. *FEBS Lett*, 12, 33-37.
- Sneath P.H.A.,** 2001. The Archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria - Bacterial Nomenclature. In *Bergey's manual of systematic bacteriology.* Garrity G.M., Boone D.R., Castenholz R.W. 2e Ed., 721: 83-88.
- Sondergaard A.K.,** 2005. Application of probiotics in food. In *Bacteries lactiques et probiotiques.* Luquet Francois-Marie, Corrieu Georges. Tec & Doc, Lavoisier, pp: 195-209.
- Stadhouders J.,** 1974. Dairy starter cultures. *Milchwissenschaft*, 29, 329-337.

- Stiles Michael E., Holzapfel Wilhelm H.**, 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Inter. J. Food Microbiol*, 36: 1-29.
- Stover, C. K., X. Q. Pham, et al.** (2000). "Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen." *Nature* 406(6799): 959-964.
- Sutherland W.**, 1982. Biosynthesis of microbial exopolysaccharides. *Adv. Microb. Physiol.*, 23, 79-142.
- Swartling Per F.**, 1951. Biochemical and serological properties of some citric acid fermenting streptococci from milk and dairy products. *J. Dairy Res.*, 18, 256-267.
- Swenson J.M., Facklam R.R. et Thornsberry C.** 1990. Antimicrobial Susceptibility of Vancomycin-Resistant *Leuconostoc*, *Pediococcus*, and *Lactobacillus* Species. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, Apr. p. 543-549.
- Tagg J.R., Dajani A.S., Wannamaker L.W.**, 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 40: 722-756.
- Tagg J.R., Mcgiven A.R.**, 1971. Assay System for Bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 21:943.
- Tailliez Patrick**, 2001. Mini-revue : les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y a près de 3 milliards d'années. *Lait.*, 81: 1-11.
- Teuber Michael, Geis Arnold**, 2006. The Genus *Lactococcus*. *Prokaryotes* 4: 205-228.
- Thomas, T.D.**, (1973). Agar medium for differentiation of *Streptococcus cremoris* from the other bacteria. *N.Z.J. Dairy. Sci. Tech.* 8:70-71.
- Van Alst, N. E., M. Wellington, et al.** (2009). "Nitrite reductase NirS is required for type III secretion system expression and virulence in the human monocyte cell line THP-1 by *Pseudomonas aeruginosa*." *Infect Immun* 77(10): 4446-4454.
- Van Den Berg, J.C., Smits A., Pot, B., Ledebor, A.M., Keresters, K., Verbakel, J.M.A. et Verrips, C.T.** (1993). Isolation, screening and identification of lactic acid bacteria from traditional food, fermentation processes and culture collection. *Food Biotechnology*, 7, 183-205.
- Van Tieghem P.E.L.**, 1878. Sur la gomme de sucrerie. *Ann. Sei. Nat. Bot.*, 6: 180-202.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., et Swings J.** , 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev.* 60: 407-438.
- Vedamuthu E. R.** 1994. The dairy *Leuconostoc*: Use in dairy products. *Journal of Dairy Science*, 77, 2725-2737.
- Verhaegen Jan.** (2004). *Les Entérobactéries. Bactériologie.* Elsevier.
- Vollenweider S.**, 2004. 3-hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biotech.*, 64: 16-27.

**Wheater M.D., Hirsch H., Mattick A.T.R.,** 1951. Possible identity of « lactobacilline » with hydrogen peroxide produced by Lactobacilli. *Nature*, 170: 623.

**Whitehead H.R., Riddet W.,** 1933. Slow development of acidity in cheese manufacture. Investigation of a typical case of “non-acid” milk. *N Z J Agric.*, 46: 225-229.

**Williams, E. P. and K. Cameron** (1894). "Infection by the *Bacillus Pyocyaneus* a Cause of Infantile Mortality." *Public Health Pap Rep* 20: 355-360.

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

## **ANNEXES**

### **Milieux de culture :**

#### **❖ Milieu MRS (Man Rogosa et Sharpe, 1960)**

Extrait de levure 5 g

Extrait de viande 10 g

Polypeptone 10 g

Citrate de sodium 2 g

Acétate de sodium 5 g

Glucose 20 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g

MgSO<sub>4</sub> 0,25g

MnSO<sub>4</sub> 0,05 g

Agar-Agar 15 g

Eau distillée 1000 ml

pH 6.2

#### **❖ Milieu MSE (Mayeux, Sandine et Elliker, 1962)**

Tryptone 20 g

Gélatine 2.5 g

Extrait de levure 5 g

Saccharose 100 g

Glucose 5 g

Citrate de sodium 1 g

Acide de sodium 0.075 g

Agar-Agar 15 g

Eau distillée 1000 ml

pH 6,8

#### **❖ Milieu KMK (Kempeler et Mc Kay, 1980)**

Extrait de levure 3 g

Biopolytone 2,5g

Glucose 5 g

Agar 15 g

Eau distillée 1000 ml

pH 6.6

Le milieu est réparti à raison de 100 ml par flacon, puis autoclavé 15 minutes à 121°C.

Au moment de l'emploi on ajoute : 1 ml d'une solution aqueuse de ferricyanide de potassium 10 % (p/v) et 1 ml d'une solution aqueuse à 2.5 % (p/v) de citrate ferrique et citrate de sodium (p/p). Ces solutions sont stérilisées par filtration sur filtre millipore 0.22 µm et sont conservées à l'obscurité à 4°C.

❖ **Milieu M16 BCP (Thomas, 1973)**

Extrait de levure 2,5 g

Extrait de viande 5 g

Peptone 10 g

Acide ascorbique 0,5 g

Lactose 2 g

L-arginine 4 g

Pourpre de Bromocrésol 0,05 g

Agar-Agar 15 g

Eau distillée 1000 ml

pH 6,8

❖ **Milieu Mueller-Hinton (Mueller et Hinton, 1941)**

Infusion de viande de boeuf 3000 cm<sup>3</sup>

Peptone de caséine 17,5 g

Amidon de maïs 1,5 g

Agar-Agar 17 g

pH 7.4

❖ **Gélose nutritive**

Extrait de viande 1 g

Extrait de levure 2 g

Peptone 5 g

Chlorure de sodium 5 g

Agar-Agar 15 g

Eau distillée 1000 ml

pH 7,4

❖ **Bouillon Nutritif**

Extrait de viande 1 g

Extrait de levure 2 g

Peptone 5 g

Chlorure de sodium 5 g

Eau distillée 1000 ml

pH 7,4

❖ **Lait Ecrémé**

Lait en poudre 110 g

Eau distillée 1000 ml

Extrait de levure 3g

❖ **Eau Physiologique**

Chlorure de sodium 8,5 g

Peptone 0,5 g

Eau distillée 1000 ml

pH 7,0

❖ **Agar au Tween 80**

Peptone 10g

NaCl 5g

CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub> 0,1 g

Agar-agar 20g

Eau distillée 1000ml

2,5ml de tween 80 est stérilisé séparément puis ajouté au milieu, le pH est ajusté à 6.

❖ **Gélose Chapman :**

Peptone 10,0 g

Extrait de viande de bœuf 1,0 g

Chlorure de sodium 75,0 g

Mannitol 10,0 g

Rouge de phénol 0,025 g

Agar-Agar 15,0 g

Eau distillée 1000 ml

pH 7,4

Tous les milieux sont stérilisés par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes sauf ceux contenant le lait (110°C pendant 10 minutes).

## **LISTE DES TABLEAUX**

**Tableau 1** : Composants de lait de différentes espèces (Alais, 1984 et Amiot et al., 2002).

**Tableau 2** : Composition en lipides des laits de différentes espèces (Chilliard, 1987).

**Tableau 3** : Composition moyenne du lait en éléments minéraux majeurs de différentes espèces (Gueguen, 1996).

**Tableau 4** : Composition moyenne du lait en principaux oligo-éléments indispensables aux différentes espèces (Gueguen, 1996).

**Tableau 5** : Composition vitaminique du lait de différentes espèces (Jaubert, 1996).

**Tableau 6** : Principaux produits issus de la fermentation des bactéries lactiques (Penaud, 2006).

**Tableau 7** : Tests évaluant l'innocuité des bactéries lactiques probiotiques (d'après Salminen et al., 1996).

**Tableau 8** : Les caractéristiques physiologiques et biochimiques des souches de *Leuconostoc* isolées.

**Tableau 9** : le profil fermentaire des 09 souches isolées vis-à-vis des 8 sucres.

**Tableau 10** : Les diamètres des zones d'inhibition de la croissance des bactéries indicatrices en mm par les souches productrices.

**Tableau 11** : Diamètres des zones d'inhibition (mm) suite à la diffusion sur puits en gélose (méthode indirecte : surnagent normal).

**Tableau 12** : Diamètres des zones d'inhibition (mm) suite à la diffusion sur puits en gélose (méthode indirecte : surnagent à pH 7).

**Tableau 13** : Diamètres des zones d'inhibition (mm) suite à la diffusion sur puits en gélose (méthode indirecte : surnagent à catalase).

**Tableau 14** : les résultats d'antibiogramme des souches pathogènes (mm).

## TABLE DES ABRÉVIATIONS

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique

**ARN** : Acide Ribonucléique

**Lb.** : *lactobacillus*

**Lc.** : *Lactococcus*

**Ln.** : *Leuconostoc*

**PCR**: Polymerase chain reaction

**ATP** : Adénosine Triphosphate

**ADH** : Arginine dihydrolase

**pH** : Potentiel d'hydrogène

**Pi** : Phosphate inorganique

**Kpb**: Kilo paire de base

**Ufc** : Unité formant colonie

**PM** : Poids moléculaire

**°D** : Degré dornic

**°C** : Degré Celsius

**µg** : Microgramme

**g** : Gramme

**h** : Heure

**ml**: Millilitre

**CO<sub>2</sub>** : Dioxyde de carbone

**EMP** : Embden Meyerhoff Parnas

**Fe<sup>3+</sup>**: ion de manganèse

**GC%** : Pourcentage guanine +cytosine

**H<sub>2</sub>O** : Hydroxyde d'hydrogène

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Dioxyde de carbone

**kDa** : kilo Dalton

**mg**: milligramme

**Mg<sup>2+</sup>**: ion, de magnésium

**MRS BCP:** Man Rogosa Sharp additionné de pourpre de bromocrésol

**MRS :** Man Rogosa Sharp

**MSE:** Mayeux sandine er Elikar

**NaCl :** chlorure de sodium

**pH :** Potentiel d'hydrogène

**PM :** Poids moléculaire

**Rpm :** Rotation par minute

**T° :** Température

**UFC :** Unité formant colonie.

**V :** Volume

**µl :** microlitre

## LISTE DES FIGURES

**Figure 1 :** Principales voies assurant le transport et le métabolisme du glucose par les bactéries lactiques (Desmazeaud et De Roissart, 1994).

**Figure 2 :** Schéma montrant l'arbre phylogénique des bactéries lactiques y compris des genres apparenté (Axelsson, 2004).

**Figure 3 :** Structure de la reutérine, 3-hydroxypropanal (Axelsson, 2004).

**Figure 4 :** Images de *Leuconostoc*.

**Figure 5 :** Schéma simplifié du cométabolisme sucre-citrate de *Leuconostoc mesenteroides* (Bourel et al., 2001).

**Figure 6 :** Facteurs de virulence d'*Escherichia coli* (Holzapfel et al., 1998).

**Figure 7 :** Aspect macroscopique des cultures bactériennes (*Leuconostocs*) ensemencée en profondeur avec MRSv.

**Figure 8 :** Aspect macroscopique des cultures bactériennes (*Leuconostocs*) ensemencée en profondeur avec MSE.

**Figure 9 :** L'aspect macroscopique des souches S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8 et S9 sur le milieu MRS (ensemencé en surface).

**Figure 10 :** Aspect des souches pures S1, S2 et S3 sur MRS liquide.

**Figure 11 :** Test de catalase des souches S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8 et S9.

**Figure 12 :** L'observation microscopique des cellules bactériennes (*Leuconostoc*) après fixation (Coloration de Gram) (Gx1000).

**Figure 13 :** Type fermentaire des 9 isolats (*Leuconostoc*) sur milieu MRS liquide glucosé contenant la cloche de Durham. Incubées à 30°C/24h.

**Figure 14 :** Type fermentaire des 9 isolats (*Leuconostoc*) sur milieu lait UHT.

**Figure 15 :** Test de l'hydrolyse de l'arginine.

**Figure 16 :** Test de croissance à différentes températures.

**Figure 17 :** Test de croissance à pH 4.8 et pH 6.5.

**Figure 18 :** Test de croissance à 3% NaCl et à 6.5% NaCl.

**Figure 19 :** L'aspect des colonies productrices de dextrane par les souches S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8 et S9 sur milieu MSE.

**Figure 20 :** l'utilisation de citrate révèle par les colonies bleues sur le milieu KMK de nos 09 isolats.

**Figure 21 :** Le profil fermentaires des 09 isolats effectué sur une galerie classique et sur plaque d'Elisa: 1- Xylose, 2- Maltose, 3- Fructose, 4- Mannitol, 5- Saccharose, 6- Galactose, 7- Amidon, 8- Arabinose.

**Figure 22 :** Le profil fermentaires des sucres de la souche de *Leuconostoc* S1.

**Figure 23 :** L'absence de l'activité protéolytique reflétée par l'absence des zones de protéolyse autour des puits sur la gélose au lait.

**Figure 24 :** L'absence des zones de lipolyse autour des puits sur la gélose nutritive au Tween80.

**Figure 25 :** Résultats du test de l'activité antibactérienne (Spot agar test) des souches de *Leuconostoc* : S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9 contre *Escherichia coli*.

**Figure 26 :** Résultats du test de l'activité antibactérienne (Spot agar test) des souches de *Leuconostoc* : S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9 contre *Staphylococcus aureus*.

**Figure 27 :** Résultats du test de l'activité antibactérienne (Spot agar test) des souches de *Leuconostoc* : S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8 et S9 contre *Pseudomonas aeruginosa*.

**Figure 28 :** Résultats du test de l'activité antibactérienne (méthode indirecte : surnageant normal) des 09 souches de *Leuconostoc* contre *Staphylococcus aureus*.

**Figure 29 :** Résultats du test de l'activité antibactérienne (méthode indirecte : surnageant normal) des 09 souches de *Leuconostoc* contre *E. Coli*.

**Figure 30 :** Résultats du test de l'activité antibactérienne (méthode indirecte : surnageant normal) des 09 souches de *Leuconostoc* contre *Pseudomonas aeruginosa*.

**Figure 31 :** Résultats du test de l'activité antibactérienne (méthode indirecte : surnageant à Ph 7) des 09 souches de *Leuconostoc* contre *Staphylococcus aureus*.

**Figure 32 :** Résultats du test de l'activité antibactérienne (méthode indirecte : surnageant à Ph 7) des 09 souches de *Leuconostoc* contre *Escherichia coli*.

**Figure 33 :** Résultats du test de l'activité antibactérienne (méthode indirecte : surnageant à Ph 7) des 09 souches de *Leuconostoc* contre *Pseudomonas aeruginosa*.

**Figure 34 :** Résultats du test de l'activité antibactérienne (méthode indirecte : surnageant à catalase) des 09 souches de *Leuconostoc* contre *Staphylococcus aureus*.

**Figure 35 :** Résultats du test de l'activité antibactérienne (méthode indirecte : surnageant à catalase) des 09 souches de *Leuconostoc* contre *Pseudomonas aeruginosa*.

**Figure 36 :** Résultats du test de l'activité antibactérienne (méthode indirecte : surnageant à catalase) des 09 souches de *Leuconostoc* contre *Escherichia coli*.

**Figure 37 :** l'antibiogramme de *Escherichia coli* vis-à-vis les antibiotiques E2, PT15, P10, C10, TE, GEN10, CL30.

**Figure 38** : l'antibiogramme de *Pseudomonas aeruginosa* vis-à-vis les antibiotiques E2, PT15, P10, C10, TE, GEN10, CL30.

**Figure 39** : l'antibiogramme de *Staphylococcus aureus* vis-à-vis les antibiotiques E2, PT15, P10, C10, TE, GEN10, CL30.

**Figure 40** : La croissance d'E. Coli sur milieu gélose nutritive après 24h d'incubation à 37C.

**Figure 41** : La croissance de *Staphylococcus aureus* sur milieu Shapman après 24h d'incubation à 37C.

**Figure 42** : La croissance de *Pseudomonas aeruginosa* sur milieu Mc Kay après 24h d'incubation à 37C.