



Mémoire de fin d'études

EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLOME DE: Master 2

Filière: Biologie

**Option: Analyse et contrôle de qualité des denrées
alimentaires**

Thème

**Caractérisation physico-chimique et microbiologique des
laits crus de trois espèces laitières, caprine, bovine et ovine,
sélection des souches lactiques thermopiles, ayant un profil
probiotique et technologique.**

Présenté par:

BOUTAMDJET FAIZA

BENMAHMOUD ABIR

Jury de soutenance:

Président: Dr. Akbache M.

M.C.A CU: BBA.

Encadreur: Meribai A.

M.A.A CU: BBA.

Examineur: Sadrati N.

M.A.A CU: BBA.

Examineur: Dr. Bahloul A.

M.C.A CU: BBA.

Juin 2013

Remerciment

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce Modeste travail.

En second lieu, nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à notre encadreur Mr. Meribai A., pour son aide et ses précieux conseils au cours de ces années, pour sa sympathie, sa disponibilité, ses idées, ainsi que pour l'orientation, la confiance, la patience qui ont constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait jamais vu le jour.

Nous tenons à remercier tous les professeurs qui nous ont enseigné et qui par leurs compétences nous ont soutenu dans la poursuite de nos études.

Nos vifs remerciements vont également aux techniciens de laboratoire qui nous à apporter leur aide.

Je n'oublie pas mes parents pour leur contribution, leur soutien et leur patience.

Enfin, nous tenons également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Merci à tous et à toutes.

Dédicace:

Je dédie ce modest travail à

Mes très chers parents Qui m'ont appris tout ce que je sais:

Qui m'ont nourri d'amour, enveloppé de confort.

*Au symbol d'affection et d'amour à ma mère **Salha***

*A mon père **abdelkarim** qui a tout sacrifié que j'obtienne de fructueuse résultats.*

A mes chères sœurs: Nesrine, Amel et faiza.

A mes chers frères: Zakaria et Aymen.

a toute ma belle famille petits et grands

A mes meilleurs amies: Amina, Sarah, Yamina, meriem, yasmine, hadjer, wafa,

Mesouda, Ali, Rahim, Rafik, Djamel, Sami

Mon plus profond respect va tout droit à mon professeur et promoteur

Mr. Meribai A. et sa famille.

*A tous mes professeurs dans tous les cycles de ma scolarité qui mon éclairé la voie
du savoir.*

*A tous mes amies de Master 2 Analyse et contrôle de qualité des denrées
alimentaires.*

A tous ceux dont l'oubli du nom n'est pas celui du cœur.

A tout ce qui près ou loin m'apporté l'aide et le Soutien.

Abir.

Je dédie ce travail

A

La mémoire de ma grande mère maternel

Qui a été toujours dans mon esprit et dans mon cœur

Je vous dédie aujourd'hui ce travail.

Que Dieu, le miséricordieux

Vous accueille dans son éternel paradis.

A

A mes très chers parents Nadia & Farid

*A ma mère, qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour
mon bonheur et ma réussite.*

*A mon père, qui a été mon ombre durant toutes les années des études, et qui a
veillé à m'encourager, à me donner l'aide et à me protéger.*

Que dieu les garde et les protège.

A

Mes belles sœurs Abir & Yamina

Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

A

Mon seule et unique frère Oussama

Que dieu le garde et le protège

A

Mon encadreur, Mr. Meribai A.

*Je tiens à le remercier pour son encadrement, ses précieux conseils et sa
disponibilité tout au long de ce travail, qu'il trouve ici l'expression de ma
reconnaissance et de mon profond respect.*

A

Tous Mes enseignants

A

Ma belle famille

Mes grands parents, mes tantes, mes oncles ainsi que mes cousins et cousines.

*Veillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon
affection.*

A

*Mohamed pour sa générosité et son soutien. Que Dieu te procure tout le bonheur
que tu mérites.*

A

Mes chers amis

Amina, Sarah, Siham, Nesrine, Amel, Yasmie, Meriem, Sarah, Hanane, Houda,

Abed el Ali, Dounia

A tous ceux dont l'oubli du nom n'est pas celui du cœur.

FAIZA

Résumé:

Le lait, est un aliment complet, milieu de culture idéal, vecteur des zoonoses et des espèces pathogènes. Les bactéries lactiques thermophiles, homofermentaires, sont les plus utilisées en industrie laitière; comme levains starters dans des processus technologique thermophiles.

L'objectif de l'étude est, de réaliser un control comparatif microbiologique et physico-chimique et l'isolement des souches lactiques thermophiles, ayant des potentialités technologiques et probiotiques

L'étude a portée, sur (32) échantillons des laits crus (15 d'espèce Caprine, 09 d'espèce Ovine et 08 d'espèce Bovine), collectés des différentes fermes situées au Nord-est d'Algérie, (08) paramètres physico-chimiques étaient: pH (06,36 - 06,98), teneur en lactosérum (72%-90%), teneur en matière sèche (10%-28%), viscosité (02,5-03,3) mPa.s, conductivité (03,72-6,3) mS/cm, azote totale (02,42-04,25) g/l, protéines totales (15,45-27,15) g/l et la densité (01,02- 01,04). L'exploration des charges, en flores lactiques, thermophiles, à révéler; une richesse des échantillons, en espèces lactiques thermophiles. Leur sélection technologique, et leurs caractérisation physiologique et biochimique, à donner; des souches très acidifiantes, protéolytiques, ayant un métabolisme homofermentaire, avec croissance sur milieu hypersalés.

L'étude d'antagonisme in vitro, dirigé contre des souches cibles, eucaryotes et procaryotes; a montré, des effets bactériocinogéniques, plus accentués; contre des souches procaryotes à Gram positif et négatif (15mm de diamètre contre *Enterococcus* sp. 15 mm contre *Escherichia coli*), moins accentués, contre les eucaryotes (12 mm contre *Candida albicans*, *Fusarium* sp. et *Penicillium* sp.)

Les mots clés: Espèces laitières, Laits crus, Analyses microbiologiques, Physico-chimiques, Sélection, Antagonisme.

Abstract:

The milk is a complete food, ideal batch medium and vector of zoonosis and pathogenic species. The homofermentative and thermophilus lactic bacteria are the most used in the dairy industry as starters levins.

The aim of this study is to effectuate a comparative microbiological and physicochemical control and the isolation of the thermophilus strains which have technological and probiotic potentialities.

The study focused on (32) raw milk's samples of goat, sheep and cattle collected from different farms situated in the Algerian North-east. Eight parameters were studied: pH (6.36-6.98), lactoserum's content (72%-92%), dry matter's content (10%-28%), viscosity (2.5-3.3) mPa.s, conductivity (03.72-06.3) mS/cm, total Nitrogen (2.42-4.25) g/l, totals proteins (15.45-27.15) g/l and density (01.02-01.04).

Exploration expenses thermophilus lactic flora revealed the sample's wealth of thermophiles lactic bacteria in their selection, their physiological and biochemical characterization gave very acidifying and proteolytic strains with homofermentative metabolism and growth in hypersaline medium.

The study in vitro, of the antagonism among prokaryotic and eukaryotic strains showed a stronger bacteriocinogenic effect among Gram positive and Gram negative pocaryotic strains (15 mm of diameter among *Enterococcus* sp. and 15 mm of diameter among *E. coli*) and a lower one against eukaryotic strains (12 mm of diameter among *Candida albicans*, *Fusarium* sp. and *Penicellium* sp.)

Key words: Dairy species, Raw milk, Microbiological analysis, Physicochemical, Selection, Antagonism.

Sommaire

Introduction	01
--------------------	----

Analyse bibliographique

Chapitre I. Les aliments fermentés et le lait:

I.1. Les aliments fermentés	03
I.2. Définition Légale Du Lait cru	03
I.3. Composition Du Lait cru	04

Chapitre II. Les bactéries lactiques

II.1. Généralités sur les bactéries lactiques.....	06
II.1.1 Caractéristiques principales des bactéries lactiques	06
II.1.2. Habitat.....	08
II.1.3. Culture des bactéries lactiques.....	08
II.2. Classification des bactéries lactiques	08
II.2.1.Les Lactobacilles thermophiles.....	10
II.2.2. L'Espèce thermophile: <i>Streptococcus thermophilus</i>	11

Chapitre III. Les bactériocines

III.1. Les molécules à activité antimicrobienne et/ou antifongique synthétisées par les bactéries lactiques thermophiles	13
III.2. Production des bactériocines	14
III.3. Méthodes de quantification des bactériocines	15
III.3.1. Méthode de diffusion des puits	15
III.3.2 Méthode de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	16
III.4. Les mécanismes d'action des bactériocines	16
III.4.1 Classe 1: Les lantibiotiques	16
III.4.2 Les bactériocines de classe II	17
III.4.3 Les bactériocines de classe III	18
III.5.Intérêts des bactériocines en technologie alimentaire	18
III.5.1. Les propriétés des bactériocines pour une application alimentaire	18
III.5.2. L'application des bactériocines dans le secteur alimentaire	19
III.5.3. L'application de la bactérie productrice de bactériocines.....	19
III.5.4. Les facteurs influençant l'activité des bactériocines, dans les produits alimentaires.....	20
III.5.5. La combinaison de différentes bactériocines	21
III.5.6. La combinaison des bactériocines avec d'autres agents	21

Partie expérimentale

Matériels et méthodes

I. Matériels	22
I.1. Matériels biologiques	22
I.2. Produits chimiques et réactifs	23
I.3. Matériels de laboratoire.....	23
II. Méthodes.....	25
II.1. Lieu de l'étude.....	25
II.2. Echantillonnage.....	25
II.3. Contrôle de la qualité microbiologique des échantillons du lait cru.....	26
II.3.1. Réalisation des dilutions décimales.....	27
II.3.2. Recherche de la flore aérobie mésophile totale	27
II.3.3. Recherche des Coliformes totaux et Coliformes fécaux.....	27
II.3.4. Recherche de la flore indologène	27
II.3.5. Recherche des Clostridium Sulfito-Réducteurs(CSR).....	27
II.3.6. Recherche des Streptocoques fécaux	28
II.3.7. Recherche des <i>Staphylococcus aureus</i>	28
II.4. Isolement et dénombrement des bactéries lactiques thermophiles	28
II.4.1. Isolement des lactobacilles thermophiles	29
II.4.2. Isolement des lactocoques thermophiles	29
II.4.3. Dénombrement	29
II.5. Purification des bactéries lactiques isolées	29
II.6. Identification des souches isolées	30
II.6.1. La première étape	30
II.6.1.1. Examen macroscopique	30
II.6.1.2. Examen microscopique	30
II.6.2. La deuxième étape	30
II.6.2.1. Recherche de la catalase	30
II.6.2.2. Recherche de la β -galactosidase (Test d'ONPG)	30
II.6.2.3. Recherche de nitrate réductase	31
II.6.2.4. Recherche de type fermentaire.....	31
II.6.2.5. Test du milieu TSI (Triple SugarIron)	31
II.6.2.6. Test du mannitol mobilité	31
II.6.2.7. Test citrate de Simmons	31
II.6.2.8. Recherche de production d'indole	31

II.6.2.9. Recherche de l'uréase et du tryptophane désaminase	31
II.6.2.10. Recherche de L.D.C, O.D.C et A.D.H	32
II.6.2.11. Croissance à différentes températures	32
II.6.2.12. Détermination du pH optimum de croissance	32
II.6.2.13. Croissance sur milieu à différentes concentrations de Na Cl	32
II.6.2.14. L'activité protéolytique	32
II.7. Conservation des souches lactiques isolées.....	34
II.8. Etude des caractéristiques technologiques des souches lactiques thermophiles.....	34
II.9. Antibiogramme.....	35
II.10. Etude des interactions entre des souches pathogènes/phytopathogènes et les souches lactiques isolées.....	36
II.10.1. Etude des interactions entre des souches lactiques et la flore eucaryote pathogène et phytopathogènes	36
II.10.2. Etude des interactions entre des souches lactiques et la flore procaryote pathogène et d'altération des aliments.....	36
II.10.2.1. Revivification des souches procaryotes pathogènes et d'altérations des aliments	36
II.10.2.2. Revivification des souches lactiques thermophiles	37
II.11. Contrôle physico-chimique du lait cru.....	38
II.11.1. Potentiel d'hydrogène (pH)	38
II.11.2. Mesure de l'acidité titrable	39
II.11.3. La teneur en lactosérum et en matière insoluble	39
II.11.4. La viscosité.....	40
II.11.5. Conductivité électrique.....	40
II.11.6. Détermination de la teneur en azote et protéines totales	41
II.11.7. Mesure de la densité.....	42

I. Résultats

I.1. Contrôle de la qualité des échantillons du lait cru	44
I.1.1. La flore aérobie mésophile totale.....	46
I.1.2. Coliformes totaux et coliformes fécaux.....	46
I.1.3. Germes indologènes	46
I.1.4. Clostridiums sulfite-réducteurs (CSR)	46
I.1.5. Streptocoques fécaux	46
I.1.6. <i>Staphylococcus aureus</i>	47
I.2. Résultats d'isolement des bactéries lactiques	47

I.2.1. Evaluation de la charge des bactéries lactiques	47
I.2.2. Aspect macroscopiques des bactéries lactiques	49
I.2.3. Aspect microscopiques des bactéries lactiques.....	50
I.3. Purification des souches lactiques thermophiles.....	51
I.4. L'identification biochimique.....	53
I.5. Caractérisation technologique des souches lactiques.....	54
I.5.1. Mesure de pH.....	54
I.5.2. Mesure d'acidité en degré Dornic.....	56
I.6. L'antibiogramme.....	59
I.7. Interaction entre les souches lactiques et les eucaryotes et les procaryotes pathogènes et phytopathogènes	60
I.7.1. Interaction entre eucaryote et les bactéries lactiques.....	62
I.7.2. Interaction entre procaryote et les bactéries lactiques.....	63
I.8. Contrôle physico-chimiques du lait cru.....	67
I.8.1 Mesure de pH	70
I.8.2. Mesure de l'acidité en degré Dornic.....	70
I.8.3. Teneur en Lactosérum.....	71
I.8.4. Protéine et l'azote total.....	71

II. Discussion

11.1. La qualité hygiénique du lait cru	72
11.2. L'isolement et le dénombrement des bactéries lactiques	77
11.3. Conservation des souches lactiques isolées	79
11.4. Caractéristiques écologiques, biochimiques et technologiques Des bactéries lactiques	80
11.5 Résistance aux antibiotiques	84
V. Les analyses physicochimiques du lait cru	85
Conclusion	89
Perspectives	90

Références bibliographiques

Annexe

Liste des abréviations

%: Pourcent.

≤: inférieur ou égale.

°C : Degré Celsius.

°D: Degré Dornic.

µg: micro gramme.

µl: Microlitre.

µm: Micromètre.

1^{ier}: Premier.

2^{ème}: deuxième.

Ac: Acide.

ADH: Arginine décarboxylase.

ADN: Acide desoxyribonucleique.

AK: Amikacin.

Al: Alimentaire.

AMC: AmoxicillineClavulanic.

ARN: Acide ribonucleique.

ARNr 16S:Acide ribonucléique ribosomique de 16 S.

At: Azote total.

ATB:Antibiotique.

ATP: Adenosine triphosphate.

B.L: Bactéries lactiques.

BCPL: Bromocrésol pourpre Lactosé.

BN: Bouillon nutritif.

C: Concentration.

C02: Dioxyde de carbone.

CMI: concentration minimale inhibitrice.

CO: Monoxyde de carbone.

CSR: Clostridium sulfito-réducteur.

Da: Dalton.

DMSO: Diméthyle Sulfoxyde.

DO: Doxycyline.

E. coli: *Escherichia coli*

E: Erythromycin.

EC: Extrait cellulaire.

EPS: Exopolysaccharide.

EPT: Eau peptonnée tamponnée.

FAMT: Flore aérobie mésophile totale.

FIL: Fédération international du lait.

g/L : Gramme par litre.

G+: Gram positif.

G+C: Teneur en guanine et cytosine.

GC: Giolliti Cantoni.

GN: Gélose Nutritive.

GRAS: Generally Recognized As Safe.

h: heure.

H⁺: ions d'hydrogène.

H₂O: L'eau.

H₂O₂: Peroxyded'hydrogène.

H₂SO₄: L'acide sulfurique.

H₃BO₃: Acideborique.

HFM: Homofermentaire.

HTM: Hétérofermentaire.

IN: Indénombrable.

IPM: Imipénème.

Jora: journal officiel de la république algérienne.

K.Da: Kilo Dalton.

KDa: Kilodalton.

LAB: Lactic acid bacteria.

***Lb. bulgaricus* :** *Lactobacillusdelbrueckii*ssp. *Bulgaricus*.

Lb: *Lactobacillus*.

Lc. lactis: *Lactococcus lactis*.

LDC: Lysine décarboxylase.

LEG: LaitécréméGélosé.

LER: Lait écrémé reconstitué.

m Pa.s: Milli Pascale. Seconde.

M.E.T: Microscope électronique à transmission.

M: médicale.

M17: Gélose de Terzaghi et Sandine.

mg: Milligramme.

MH: Mueller Hinton.

min : Minute.

ml: Millilitre.

mm: Millimètre.

Mpb: Milli Paire de base.

MRS: Gélose de Man, Rogosa, Sharpe.

mS/Cm: milli Simens par Centimètre.

n: Le nombre de ml d'acide sulfurique.

N: Normal.

n°: numéro.

NaCl: Chlorure de Sodium.

NaOH: Hydroxyde de Sodium.

NH₃: Ammoniac.

NH₄: Ammonium.

NR1: Nitrate réductase 1.

NR2: Nitrate réductase.2.

NTX: Nitroxoline.

O₂: Oxygène.

ODC: Ornithine décarboxylase.

ONPG: Ortho Nitro Para Galactosidase.

P.M: Poid moléculaire.

P/V: Poids par volume.

pH : Potentiel d'hydrogène.

Pt: Protéine total.

PTG: peptidoglycane.

rpm: Rotor par minute.

S. thermophilus: *Streptococcus thermophilus*.

S.beur: Souche beurre.

SBA: surnageant brutes actifs.

SLP: Souche de référence.

SO₄⁻²: Sulfate.

sp: espèce.

SP: Spiramycin.

ssp : Sous-espèce.

St: *Streptococcus*.

T°: Température.

TSE: Treptone Sel Eau.

TSI: Triple Sugar Iron.

UFC: Unité formant colonie.

UFT: Unité formant trouble.

UI: Unités internationales.

VF: viande foie.

Vit: Vitamine.

VRBL: Vert brilliant bilié Lactosé.

X40: Grossissement 40.

YMA: Yeast milk agar.

Zi: Zone d'inhibition.

Liste des figures:

Figure.01. <i>Lactobacillus Rosell-11</i> observé au microscope électronique à transmission (M.E.T.) (x.10000)	06
Figure.02. <i>Leuconostoc lactis</i> observé au M.E.T. (x 10000)	07
Figure.03. Arbre phylogénétique basé sur l'analyse comparative du gène ARN-16S, montrant les principaux groupes phylogénétiques de bactéries lactiques avec le pourcentage G+C% dans l'ADN et les bactéries Gram ⁺ du genre <i>Bifidobacterium</i> , <i>Propionobacterium</i> (Holzapfel et al., 2001).....	09
Figure.04. Test d'antibiogramme sur milieu Mueller Hinton.....	35
Figure.05. Mesure du pH du lait cru.....	39
Figure.06. Mesure de la conductivité électrique du lait cru	41
Figure.07. Variations des valeurs en UFT/ml, des germes dénombrés (Coliformes totaux et <i>Staphylococcus fécaux</i>), dans les échantillons du lait cru.....	45
Figure.08. Variations des valeurs en UFC/ml, des germes dénombrés (FAMT, Coliformes fécaux et <i>Staphylococcus aureus</i>), dans les échantillons du lait cru.....	45
Figure.09. Variations des valeurs en UFC/ml, des lactobacilles et lactocoques mésophiles... 48	
Figure.10. Variations des valeurs en UFC/ml, des lactobacilles et lactocoques thermophiles..... 48	
Figure.11. Aspect macroscopique des colonies Lactobacilles thermophiles sur milieu MRS après incubation de 48h à 44°C..... 49	
Figure.12. Aspect macroscopique des colonies Lactocoques thermophiles sur milieu M17 après incubation de 48h à 44°C..... 49	
Figure.13. Aspect microscopique des lactobacilles et les lactocoques à l'état frais (G×40).. 50	
Figure.14. Vue microscopique des Lactobacille et les lactocoques (bleu de méthylène) (Gx40)..... 50	
Figure.15. Aspect des Lactobacilles et des Lactocoques à la coloration de Gram (G×40)..... 51	
Figure.16. Aspects des colonies Lactobacilles thermophiles après séries de purification sur MRS..... 51	
Figure. 17. Repiquage sur milieu gélosé M17 des bactéries thermophilles. 1 ^{er} repiquage..... 52	
Figure.18. Aspect des colonies après purification sur milieu gélosé M17 des bactéries thermophilles: 4 ^{ème} repiquage..... 52	
Figure.19. Histogramme représentatif de la cinétique d'acidification (pH) pendant 24h..... 54	

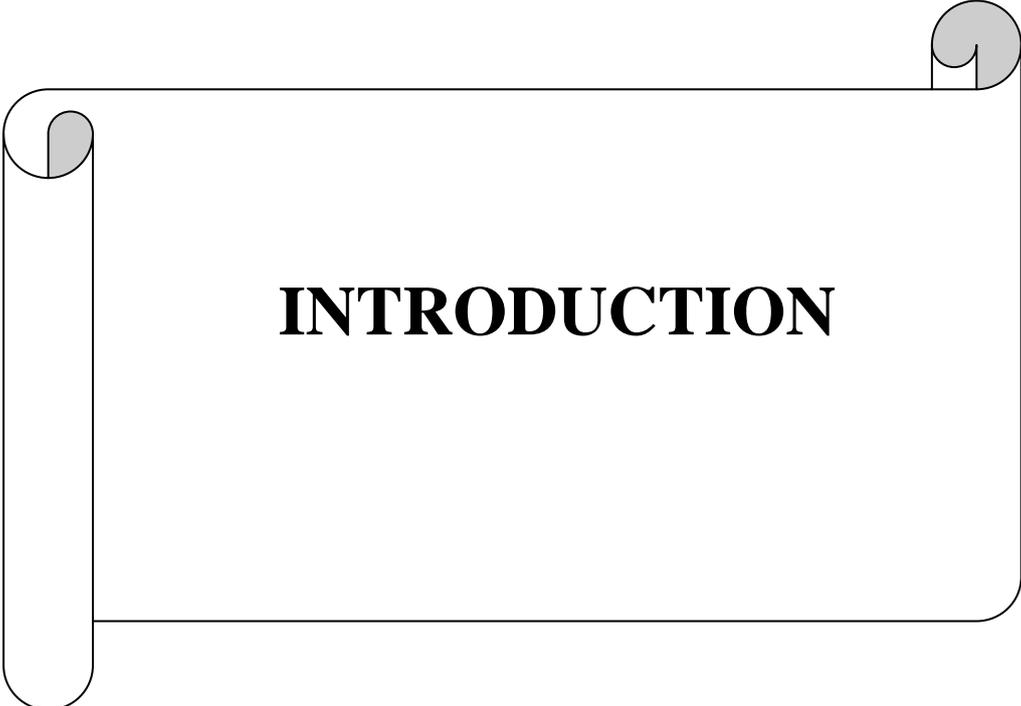
Figure .20. Histogramme représentatif de la cinétique d'acidification (pH) pendant 24h, par les. Souches SV et S beurre.....	55
Figure .21. Histogramme représentatif de la cinétique d'acidification (pH) pendant 24h, par les souches SB	56
Figure.22. Histogramme représentatif de la cinétique d'acidification en degré Dornic (°D) pendant 24h d'incubation à 42°C, par les souches lactiques thermophiles SCh.....	57
Figure.23. Histogramme représentatif de la cinétique d'acidification en degré Dornic (°D) pendant 24h d'incubation à 42°C, par les souches lactiques thermophiles SV et S.beur.....	58
Figure.24. Histogramme représentatif de la cinétique d'acidification en degré Dornic (°D) pendant 24h d'incubation à 42°C, par les souches lactiques thermophiles SB.....	59
Figure.25. La résistance et la sensibilité des souches lactiques vis-à-vis des antibiotiques....	60
Figure .26. Histogramme qui montre les diamètres des zones d'inhibition de 05isolats des <i>Lactobacillus thermophilus</i> , vis-à-vis des souches eucaryotes pathogènes et /ou phytopathogènes	62
Figure .27. Histogramme qui montre les diamètres des zones d'inhibition de 05isolats des <i>Streptococcus thermophilus</i> vis-à-vis des souches eucaryotes pathogènes et/ou phytopathogènes.....	62
Figure.28. Histogramme qui montre les diamètres des zones d'inhibition de 05 isolats des <i>Lactobacillus thermophilus</i> vis-à-vis des souches procaryote pathogènes a paroi Gram négatif.....	63
Figure.29. Histogramme qui montre les diamètres des zones d'inhibition de 05 isolats des <i>Lactobacillus thermophilus</i> vis-à-vis des souches procaryote pathogènes a paroi Gram positif.....	64
Figure .30. Histogramme qui montre les diamètres des zones d'inhibition de 05 isolats des <i>Streptococcus thermophilus</i> vis-à-vis des souches procaryote pathogènes a paroi Gram négatif.....	64
Figure.31. Histogramme qui montre les diamètres des zones d'inhibition de 05 isolats des <i>Streptococcus thermophilus</i> vis-à-vis des souches procaryote pathogènes a paroi Gram positif.....	65
Figure.32. Zones d'inhibition entre les souches lactiques et les levures (<i>Candida albicans</i>).	65
Figure.33. Zones d'inhibition entre les souches lactiques et les champignons.....	66
Figure.34. Zones d'inhibition entre les souches lactiques et les procaryotes pathogène à paroi Gram négatif.....	66
Figure.35. Zones d'inhibition entre les souches lactiques et les procaryotes pathogènes à paroi Gram positif.....	66

Figure.36. Variations des valeurs des pH des différents échantillons du lait cru comparés avec celles enregistré par l'étude d' Imran (2008)	70
Figure.37. Histogramme représentatif des variations de l'acidité en °D pour les échantillons des trois espèces laitières étudiées.....	70
Figure.38. Répartition du Lactosérum et la matière insoluble en % dans le lait des trois espèces laitières.....	71
Figure 39: Histogrammes descriptifs de la teneur en azote et protéine totale et dans les échantillons analysés.....	71

Liste des tableaux:

Tableau.01. composition d'un litre du lait cru (Le Berre, 1999).....	04
Tableau.02. principales caractéristiques biologiques et métaboliques des bactéries lactiques (Axelsson, 2004).....	07
Tableau.03. Les différents genres de bactéries lactiques et leur % en G+C.....	10
Tableau.04. Présentation des matériels lourds utilisés.....	24
Tableau.05. Illustratif des origines des échantillons des laits crus	25,26
Tableau.06. Illustratif des différents tests réalisés de contrôle de qualité microbiologique	26
Tableau.07. Différentes étapes réalisées pour l'isolement des souches lactiques (lactobacilles/lactocoques) Larpent et al, (1997); Guiraud, (1998; 2003)	28
Tableau.08. Tableau illustratif des différents tests biochimiques et physiologiques réalisés	33,34
Tableau.09. Liste des antibiotiques testés et leurs charges respectives en µg.....	36
Tableau.10. Présentations des souches pathogènes et/ou phytopathogènes utilisées.....	37
Tableau.11. Résultats de contrôle de la qualité microbiologique des 13 échantillons des laits cru	44
Tableau.12. Dénombrements des charges en bactéries lactiques thermophiles et mésophiles pour chaque échantillon.....	47
Tableau.13. Différents tests biochimiques et physiologiques réalisées.....	53
Tableau.14. Valeurs du Suivi de la cinétique d'acidification (pH) du LER pendant 24h d'incubation à 42°C, par des souches lactiques (SCh) isolées du lait d'espèce caprine.....	54
Tableau.15. Valeurs du Suivi de la cinétique d'acidification (pH) du LER pendant 24h d'incubation à 42°C, par des souches lactiques (SV et S beurre); isolées du lait d'espèce Bovine.....	55
Tableau.16. Valeurs du suivi de la cinétique d'acidification (pH) du LER pendant 24h d'incubation à 42°C, par des souches lactiques (SB); isolées du lait d'espèce Ovine.....	56
Tableau.17. Valeurs du Suivi de la cinétique d'acidification en degré Dornic (°D) du LER pendant 24h d'incubation à 42°C, par des souches lactiques (SCh); isolées du lait d'espèce Caprine.....	57
Tableau.18. Valeurs du Suivi de la cinétique d'acidification en degré Dornic (°D) du LER pendant 24h d'incubation à 42°C, par des souches lactiques (SV et S.beurre); isolées du lait d'espèce Bovine.....	58
Tableau.19. Valeurs du Suivi de la cinétique d'acidification en degré Dornic(°D) du LER pendant 24h d'incubation à 42°C, par des souches lactiques (SB); isolées du lait d'espèce Ovine.....	59

Tableau.20. Résultat de l'antibiogramme (Résistance et Sensible) des souches lactiques étudiées vis-à-vis des ATB.....	60
Tableau .21. Illustratif des diamètres des zones d'inhibitions obtenus après interactions sur gélose MH.....	61
Tableau .22. Résultats de contrôle de la qualité physico-chimique des échantillons de l'espèce Caprine	67
Tableau .23. Résultats de contrôle de la qualité physico-chimique des échantillons de l'espèce Bovine	68
Tableau .24. Résultats de contrôle de la qualité physico-chimique des échantillons de l'espèce Ovine	69



INTRODUCTION

Introduction:

Les bactéries lactiques, ont été utilisées, pour la fabrication et la conservation de nombreux aliments. La découverte de leur action sur le lait, fut probablement accidentelle; mais leur utilisation fut perpétuée sous forme de levains naturels (**Gisele et al., 2006; Zamfir et al., 2000**). Elles sont impliquées dans un grand nombre de fermentations des produits alimentaires; où elles permettent, d'améliorer certaines caractéristiques organoleptiques et d'augmenter la durée de leur conservation (**Stiles et Holzapfel, 1997**).

Les bactéries lactiques thermophiles, jouent un rôle essentiel dans la fermentation des matières premières animales et végétales (**Auclair et Accolas, 1983; Stiles et Holzapfel, 1997**). Leur capacité à fermenter les hydrates de carbone, de dégrader les protéines et les lipides; mène à la synthèse d'une gamme de composés, tels que: les acides organiques, les peptides. Ces métabolites, peuvent contribuer aux caractéristiques organoleptiques, technologiques et nutritionnelles des aliments fermentés (**Mozzi et al., 2010**).

Par leur acidification rapide du lait, avec abaissement du pH, assurant ainsi, une protection de l'aliment contre les germes d'altération (**Chomba et Prost, 1989; Zourari et al., 1991; Thomas et Chamba, 2000; Cachon et al., 2002**).

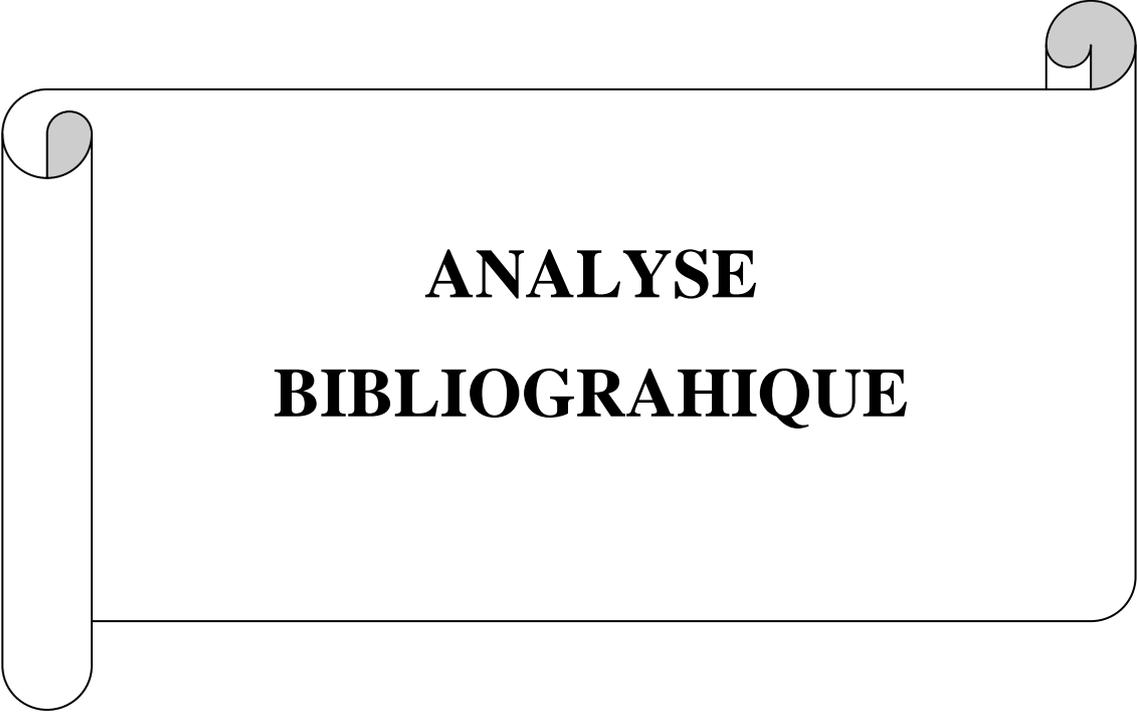
Les bactéries lactiques thermophiles, sont largement utilisées en technologie laitière (**Auclair et Accolas, 1983**), notamment, dans les processus industriels à température élevée, vue leur résistance aux bactériophages (**Le tort et al., 2002; Hols et al., 2005**), leur métabolisme homofermentaires thermophiles, producteur des composés aromatiques (**Chavez et al., 2003; Helink et al., 2004, Mozzi et al., 2010**), améliorant les caractéristiques gustatifs du produit, avec production des exopolysaccharides, qui renforcent la consistance et améliorent, la rhéologie du produit final; par l'augmentation de la viscosité, et la diminution de Synérèse: caractéristiques, de plus en plus exigées par le consommateur (**Vinderolla et Reinheimer, 2003; Awad et al., 2005**).

D'autre part, ces bactéries lactiques thermophiles, sont connues pour leur production des bactériocines, ayant large spectre d'activité, inhibitrice, dirigée contre la flore eucaryote et procaryote à paroi Gram positif et à paroi Gram négatif (**Zamfir et al., 1999; Yamato et al., 2003; Vinod Kumar et al., 2006**).

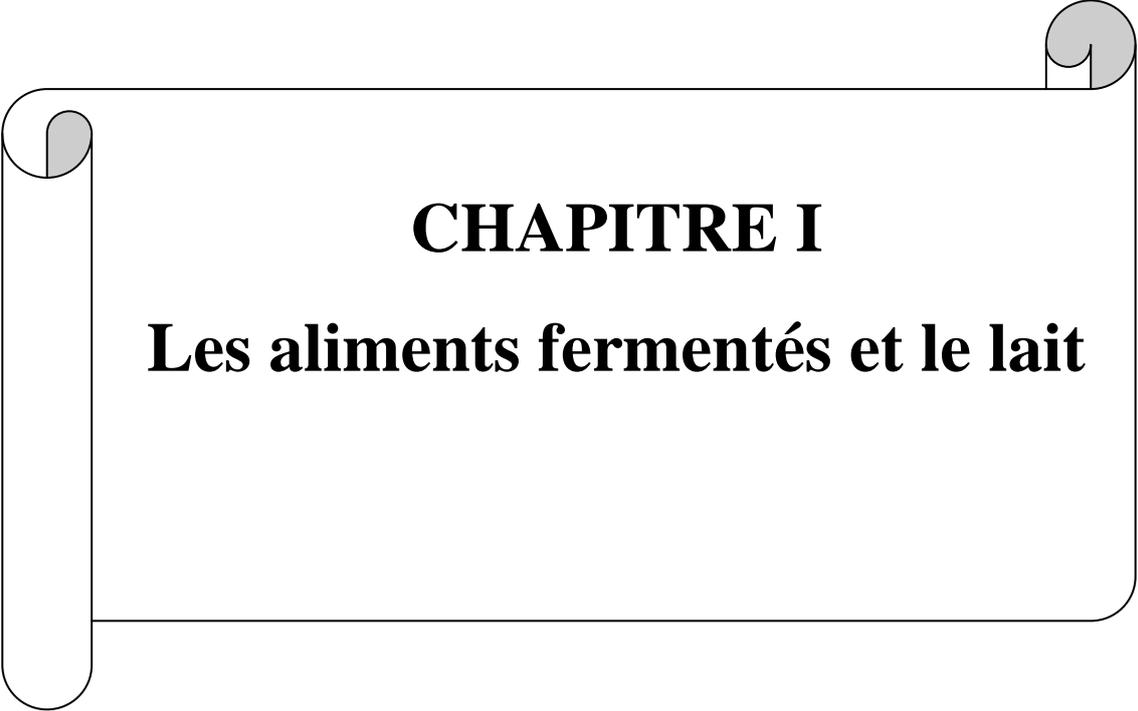
Du fait de leur importance technologique, les bactéries lactiques, sont sujet à d'intenses investigations scientifiques, en vue de sélectionner des souches dotées de performances en milieu industriel. Plusieurs travaux, ont focalisés la sélection des souches lactiques, dotées de performances technologiques, à partir des du laits cru de différentes espèces laitières: à l'exemple du lait de chamelle: (**Kacem et Karam, 2006**;

Hassaine *et al.*, 2007; Khedid *et al.*, 2008; Drici, 2010; Drici *et al.*, 2010; Boublenza *et al.*, 2011); à partir du lait d'espèce bovine: (Chekruon et Bensoltane, 2007; Ghazi *et al.*, 2009; Guessas *et al.*, 2012); à partir du lait d'espèce ovine: (Rouissat et Bensoltane, 2006; Chograni *et al.*, 2006; 2008; Idoui *et al.*, 2009), et du lait d'espèce caprine (Badis *et al.*, 2005; Moulay *et al.*, 2006; Cherigene *et al.*, 2006; 2007).

Dans ce cadre précis, se situe l'objectif de notre étude, préalablement établi; qui consiste à collecter 32 échantillons des laits crus, des trois espèces laitières; caprine, ovine et bovine, dans différentes fermes d'élevages; situées dans diverses localités de la wilaya de Bordj Bou Arreridj (Nord-est d'Algérie), de réaliser des analyses physicochimiques, microbiologiques, d'estimer les charges des échantillons, en flore lactique thermophiles, en fin de sélectionner des souches d'intérêt technologique et d'explorer leur antagonisme *in vitro*, destiner contre des flores eucaryotes et procaryotes pathogènes et/ou phytopathogènes.



ANALYSE
BIBLIOGRAPHIQUE



CHAPITRE I

Les aliments fermentés et le lait

I.1. Les aliments fermentés et le lait

I.1. Les aliments fermentés

La fermentation des aliments, est une technique de conservation, couramment employée de nos jours et qui dérive de procédés millénaires. Les acteurs essentiels, en sont les bactéries, les levures et les moisissures. Il s'agit d'un processus strictement anaérobie. Ce terme désigne, aujourd'hui; dans le langage courant, à la fois, les processus aérobie et anaérobie de dégradation des dérivés carbonés.

La fermentation garantit, d'une part, l'amélioration de la durée de vie et de la qualité microbiologique des aliments (inhibition des microorganismes contaminants), et permet, d'autre part, d'en améliorer les propriétés nutritionnelles (meilleure digestibilité du lactose, du lait, diminution de la toxicité des racines de manioc...etc) et organoleptiques (flaveur, arôme, texture, apparence.....etc).

De nombreuses classifications des fermentations alimentaires, ont été établies suivant des critères différents:

Stein Kraus, (1997) distingue sept classes de fermentations alimentaires:

1. les fermentations à base de protéines végétales, provenant de mélanges de végétaux et utilisées comme des substituts de viandes.
2. les sauces et les pâtes fermentées salées, riches en acides aminés et en peptides.
3. les fermentations lactiques de végétaux (choucroute, olive), de lait (yaourt, fromages, de mélanges à base de poissons ou de viandes.
4. les fermentations alcooliques produisant les vins, les bières, les alcools asiatiques (alcool de riz), les alcools à base de sucre de canne.
5. les fermentations acétiques produisant les cidres et différents vinaigres.
6. les fermentations alcalines.
7. les fermentations à base de levains de panification.

I.2. Définition légale du lait cru

Le lait, est un liquide, sécrété par les glandes mammaires des femelles, comme la vache, la chèvre et la brebis après la mise bas. Il s'agit d'un fluide, aqueux, opaque, blanc, légèrement bleuté ou plus ou moins jaunâtre, selon la teneur en β -carotène de sa matière grasse, d'une saveur douceâtre et d'un pH (06,6 à 06,8), légèrement acide, proche de la neutralité (**Alais, 1984**).

Du point de vue physicochimique, le lait, est un produit très complexe. La connaissance approfondie de sa composition, de sa structure et de ses propriétés physiques et chimiques, est indispensable à la compréhension des transformations du lait et des produits

obtenus, lors des différents traitements industriels (**Amior et al., 2002**).

I.3. Composition du lait cru

Le lait, a été défini en 1908, au cours du Congrès International de la Répression des Fraudes à Genève comme étant: «Le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Le lait doit être recueilli proprement et ne doit pas contenir de colostrum» (**Alais, 1984**).

Il y'a autant des différents laits, qu'il existe de mammifères au monde (**Alais, 1984**). Les principaux constituants du lait sont donc par ordre décroissant (**Pougheon, 2001**), de l'eau très majoritairement, des glucides représentés principalement, par le lactose, des lipides, essentiellement des triglycérides, rassemblés en globules gras, des protéines: caséines rassemblées en micelles, albumines et globulines solubles, des sels et minéraux à l'état ionique et moléculaire et des éléments à l'état de traces mais au rôle biologique important: enzymes, vitamines, oligo-éléments (**Walstra, 1978; Brule, 1987; Blanc, 1982; Adrian, 1987; Cartier et Chilliard, 1984**) (Tableau 01).

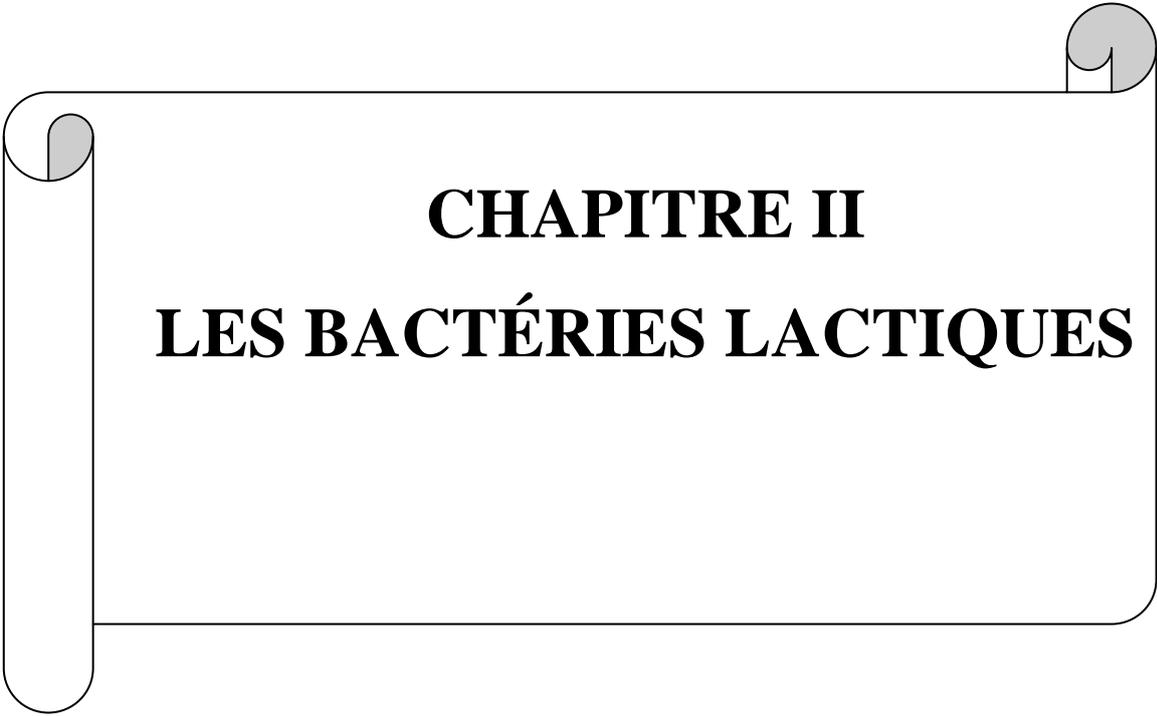
Tableau 01: Composition d'un litre du lait cru (**Le Berre, 1999**).

Espèces Composition	Vache	Chèvre	Brebis	Références
Protéines (g)	32	34,1	57,2	(Lais et Blanc, 1975)
Caséine (g)	26,0	26,0	44,6	(Cayot et Lorient, 1998)
Glucides (g)	46	48	44	(Maurer et Schaeren, 2007)
Lipides (g)	37	42	75	(Bocquier et Caja, 2001)
Cholestérol (mg)	14	11	11	(Le berre, 1999)
Vit B1 (mg)	0,42	0,41	0,85	(Fil, 1981)
Vit E (mg)	01,1	01,8	01,6	(Enjalbert, 1993)
Ac. nicotinique (mg)	0,92	03,28	04,28	(Jenness et Sloan, 1970)
Ac. folique (mg)	0,053	0,006	0,006	(Jenness et Sloan, 1970)
Calcium (mg)	01,25	01,35	02,0	(Mahieu et Jaouen, 1977)
Magnésium (mg)	0,12	0,14	0,18	(Wehrmüller et Ryffel, 2007)
Fer (mg)	0,20-0,50	0,2	0,55-01,5	(Guenguen, 1995)
Zinc (mg)	03-06	03,20	01-10	(Guenguen, 1995)
Manganèse (mg)	0,010-0,030	0,06	0,08-0,36	(Guenguen, 1995)

Les laits sécrétés, par les différentes espèces de mammifères, présentent des caractéristiques communes et contiennent les mêmes catégories de composants: eau, protéines, lactose, matières grasses (lipides) et minérales. Cependant; les proportions respectives de ces composants, varient largement d'une espèce à l'autre (**Alves D'Oliviera, 2007**)

Le lait, obtenu par une traite aseptique, n'est pas stérile. Après la traite, il contient 1000 à 5000 microorganismes par millilitre, essentiellement des lactobacilles et des streptocoques lactiques, commensaux du pis et des canaux galactophores (flore originelle du lait).

Le lait, peut être contaminé par divers microorganismes, de l'environnement: Entérobactéries, *Pseudomonas*, *flavobacterium*, Microcoques, et ceci par l'intermédiaire, du matériel de la traite et du stockage, par le sol ou la laitière. Des contaminations d'origine fécale, peuvent entraîner la présence des Clostridium, d'Enterobacteries, coliformes fécaux et éventuellement d'Entérobactéries pathogènes: *Salmonella*, *Yersinia*, *Campylobacter*. (Alais, 1984).



CHAPITRE II
LES BACTÉRIES LACTIQUES

II. Les bactéries lactiques

II.1. Généralité sur les bactéries lactiques

II.1.1 Caractéristiques principales des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques (B.L.), sont regroupées dans un ensemble, dont le nom lui-même, est évocateur de leur caractéristique métabolique principale: la production d'acide lactique (Vandamme *et al.*, 1996). Sont des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes (De Roissart, 1986). Les B.L, sont définies comme étant, des bactéries, à Gram positif, non mobiles, à sporogènes (Rouissat et Bensoltane, 2006), se présentant, sous forme de coques ou de bacilles, (figures 01 et 02), capables de fermenter, les sucres en acide lactique (Stiles et Holzappel, 1997). Ce sont des bactéries anaérobies, mais aérotoleérantes (Dellaglio *et al.*, 1994). Elles ne produisent pas de catalase, en raison de l'absence de chaîne respiratoire (Hardie, 1986), en présence d'oxygène, elles sont incapables, de réaliser la phosphorylation oxydatives, car elles ne peuvent pas synthétiser les cytochromes et les enzymes à noyau hème. Enfin, les bactéries lactiques, utilisées dans l'alimentation, sont considérées comme, non pathogènes et se font attribuer, le qualificatif anglo-saxon d'organismes GRAS (Generally Regarded As Safe) (Adams et Marteau, 1995; Aguirre et Collins, 1993). Elles ont des besoins nutritionnels complexes, en facteurs de croissance, acides aminés, peptides, bases puriques et pyrimidiques, des vitamines B et des acides gras. C'est la raison, qui explique leur abondance dans le lait (Larpen, 1989; Novel, 1993).

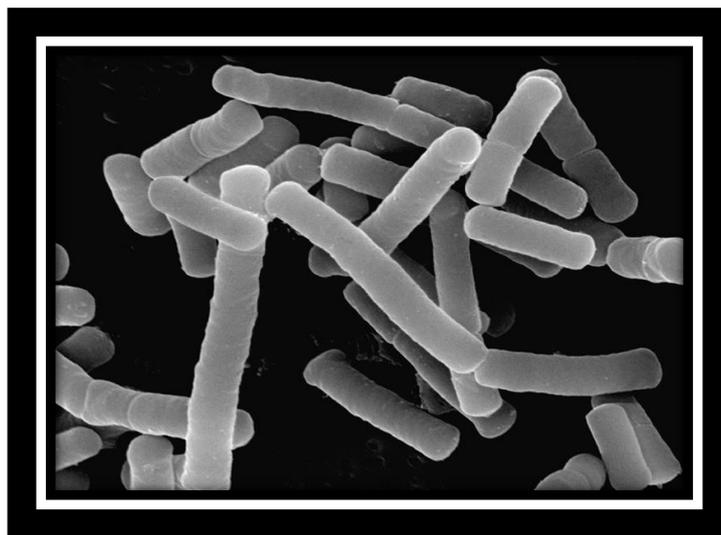


Figure 01: *Lactobacillus Rosell-11* observé au microscope électronique à transmission (M.E.T.) (x10000).

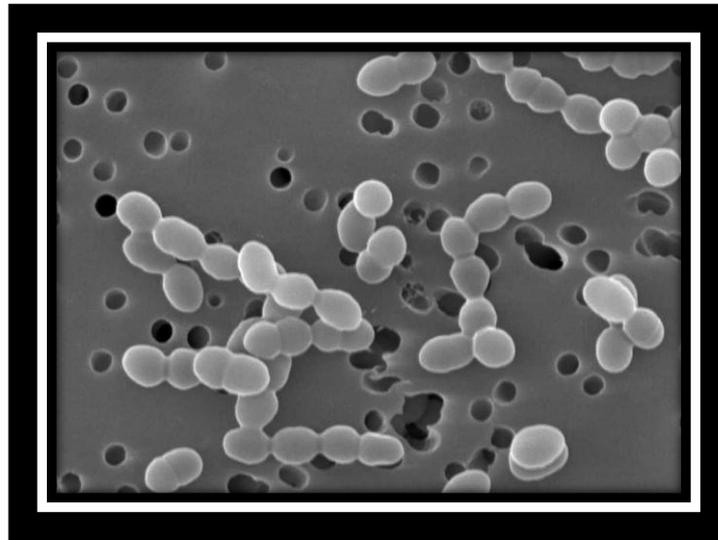


Figure 02: *Leuconostoc lactis* observé au M.E.T. (x10000).

Les B.L. sont, généralement mésophiles; certains sont psychrotolérantes ou thermotolérantes. Elles se développent majoritairement, à pH 4,0-4,5 et certaines sont, encore actives à pH 9,6 ou pH 3,2. Elles ont des tolérances très variables, vis à vis des sels (tableau 03). En fin, les bactéries lactiques possèdent de faibles activités protéolytiques et lipolytiques, et ont une exigence marquée, en acides aminées, dérivées de bases puriques et pyrimidiques et vitamines B (**Caplice et Fitzgerald, 1999**).

Tableau 02: Principales caractéristiques biologiques et métaboliques des bactéries lactiques (**Axelsson, 2004**).

	<i>Lactobacillus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Aerococcus</i>
Morphologie	B	C	C	C
Croissance à 10°C	+/-	+	+	+
Croissance à 45°C	+/-	-	-	-
Croissance à pH 4,4	+/-	+	+/-	-
Croissance à pH 9,6	-	+	-	+
Croissance à 6,5% NaCl	+/-	+	-	+
Croissance à 18% NaCl	-	-	-	-
Production de CO ₂	+/-	--	-	-
Production d'acide lactique	DL, DL	L	L	L

B: bacilles; **C:** Coques; +/-: variables selon les espèces. **DL:** Acide lactique mixte.

Parmi ces bactéries, les probiotiques représentent les «microorganismes vivants qui, à travers leur ingestion, à une certaine concentration, exercent un effet positif sur la santé humaine, au-delà de la nutrition traditionnelle» (**Guarner et Schaafsma, 1998**).

La concentration conseillée, pour obtenir un effet bénéfique, pour la santé, est de l'ordre de 10^8 à 10^9 UFC/g, par jour, et une consommation journalière de 100g du lait fermenté contenant 10^6 UFC/g, apporte cette concentration (**Sondergaard, 2005**).

Leur ADN, présente, un pourcentage de G+C%, compris entre 30% et 60% (**Stiles et Holzapfel, 1997**) et une taille de génome comprise entre: 01,8 et 03,3 Mpb. Cependant; parmi elles, quelques espèces du genre *Streptococcus* et *Enterococcus*, sont considérées comme, des pathogènes opportunistes (**Aguirre et Collins, 1993**).

II.1.2. Habitat

Les bactéries lactiques, sont ubiquistes: elles sont retrouvées, dans différentes niches écologiques, comme le lait, les produits laitiers, les végétaux, les viandes, les poissons, les muqueuses humaines et animales, ainsi que dans le tractus digestif, ce qui explique leur température de croissance hétérogène.

II.1.3. Culture des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques, nécessitent des milieux riches, en différents nutriments pour croître (sucres, acides aminés, acides gras, sels, vitamines) et pauvres en oxygène (**Hammes et Hertel, 2006**). Elles sont essentiellement, cultivées dans le milieu MRS, (**De Man et al., 1960**). Le MRS; est un milieu riche, qui offre aux bactéries, à culture difficile, différentes sources de carbone et d'azote, telles que les peptones, le glucose et le Tween 80, (Le Tween 80; était initialement, utilisé comme, émulsifiant, dans la préparation des milieux de culture, avant d'être considéré comme source de carbone pour les bactéries) (**De Man et al., 1960**).

II.2. Classification des bactéries lactiques

La taxonomie, a longtemps reposé; sur les critères morphologiques et biochimiques permettant de différencier, les espèces et de caractériser, des variantes au sein d'une même espèce. Ces tests sont:

- Le type de Gram, la morphologie et la disposition cellulaire.
- Les différents métabolismes glucidiques, protéiques, lipidiques et le caractère fermentaire.
- La croissance des cellules, sur des milieux hostiles. La Figure 03, illustre, l'arbre phylogénétique des relations évolutives, supposées dans un groupe d'espèces des B.L.
- La synthèse d'enzymes (de protéases), de métabolites (exopolysaccharides), de bactériocines, et la résistance aux bactériophages.

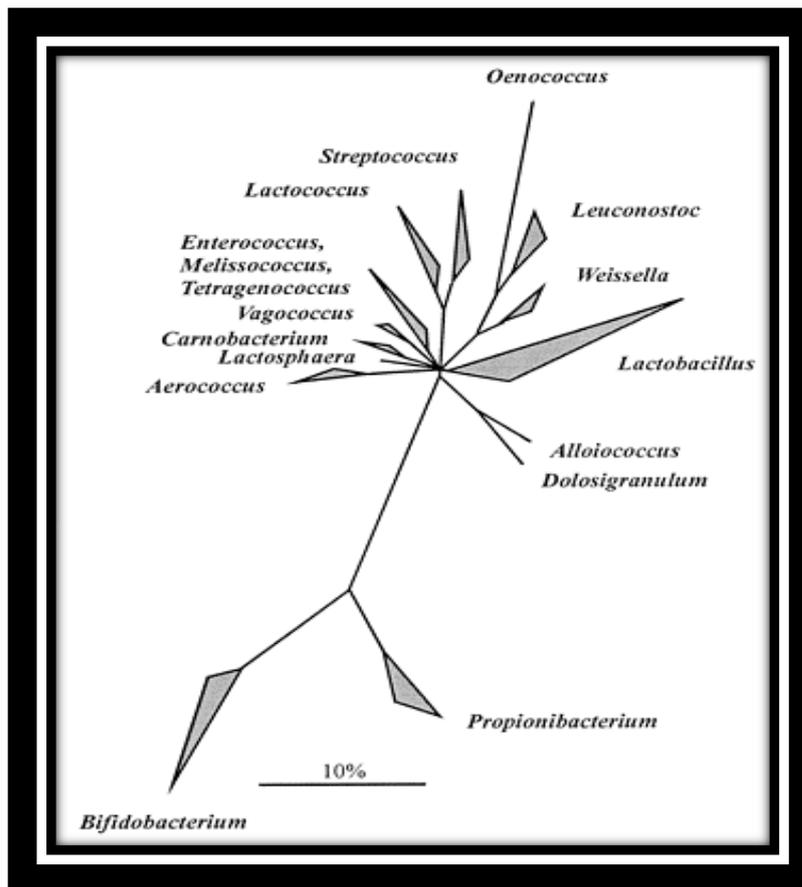


Figure 03: Arbre phylogénétique basé sur l'analyse comparative du gène ARN-16S, montrant les principaux groupes phylogénétiques de bactéries lactiques avec le pourcentage G+C dans l'ADN et les bactéries Gram⁺ du genre *Bifidobacterium*, *Propionibacterium* (Holzapfel *et al.*, 2001).

Des études basées, sur les critères moléculaires, ont permis de classer les espèces; selon les critères suivants: La détermination de la composition des peptidoglycanes (PTG); permet d'observer le type d'espèce, selon la nature de la liaison peptidique, la composition de l'ADN mesurée, par hybridation; permet de différencier les genres et les espèces entre eux et le pourcentage en bases Guanine+Cytosine (G+C%); permet le rapprochement des genres *Streptococcus* (34-46%), *Leuconostoc* (36-43%) et *Pediococcus* (34-42%) (Schleifer *et al.*, 1985; Schleifer, 1986; Farrow *et al.*, 1989). Le pourcentage de G+C des espèces du genre *Lactobacillus*, est très hétérogène et varie d'une espèce à une autre de 32 à 53% (Tableau 03) (Scardovi, 1986).

Cependant, les espèces des genres *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* ou *streptococcus*, dont le G+C% de l'ADN, est inférieur à 50%, peuvent être regroupées dans la branche des *Clostridium* avec *Bacillus*, et séparées de la branche des Actinomycétales au G+C%, supérieur à 50%, comprenant *Propionibacterium* et *Bifidobacterium* (Stackebrandt *et al.*, 1983; Kandler et Weiss, 1986b; Stackebrandt et Teuber, 1988).

Tableau 03: Les différents genres de bactéries lactiques et leur % en G+C.

Genres	Cellules		Fermentation	ADN	Références
	Forme	Arrangements		G+C(%)	
<i>Streptococcus</i>	Coques	Chaînes	Homolactiques	34-46	(Schleifer, 1986)
<i>Leuconostoc</i>	Coques	Chaînes	Hétérolactiques	36-43	(Farrow <i>et al.</i> , 1989)
<i>Pediococcus</i>	Coques	Tétrade	Homolactiques	34-42	(Schleifer, 1986)
<i>Lactobacillus</i>	Bacilles	Chaînes	Homolactiques et Hétérolactiques	32-53	(Kandler et weiss, 1986a et b)

II.2.1. Les Lactobacilles thermophiles

Le genre *Lactobacillus* est, quantitativement, le plus important des genres du groupe des bactéries lactiques. Les lactobacilles sont très hétérogènes, les diverses espèces présentent des caractères phénotypiques et génotypiques variés. Cette variété, se reflète dans le pourcentage de G+C, qui peut aller de 32 à 53%, le spectre, le plus large, des bactéries lactiques. Elles sont considérées comme GRAS (Generally Regarded As Safe), Gram +, et présentent une réponse négative au test de la cytochrome oxydase, de la catalase et de la nitrate réductase (Falsen *et al.*, 1999). Ces bactéries, ont une morphologie en forme de bacilles longs et fins (parfois incurvés), allant de 0,5-0,12 à 0,1-10 µm, mais sous certaines conditions, de croissance elles peuvent prendre, une forme de coccobacilles, qui forment fréquemment des chaînes.

Elles sont de formes régulières, non pigmentées, non sporulantes et non mobiles. Ce sont des souches généralement anaérobies, facultatives, c'est-à-dire, qu'elles poussent sous une atmosphère pauvre en oxygène et par conséquent, leur métabolisme est fermentaire; quelques espèces, sont aérotolérantes et peuvent utiliser l'oxygène, à l'aide d'enzymes (flavoprotéine oxydase), alors que d'autres sont strictement anaérobies (Kandler et Weiss, 1986).

Leur croissance est optimale, pour une température de 30 à 40°C et à un pH de 5,5 à 5,8. Cependant d'une manière générale, elles peuvent se développer à un pH inférieur à 5,0 et sur une gamme de température allant de 05 à 53°C (Hofvendahl et Hahn-Hägerdal, 2000).

De plus, ces organismes, ont des besoins nutritifs complexes, ce qui rend leur culture difficile, ces besoins, vont varier, d'une espèce à l'autre (Rogosa *et al.*, 1961; Aasen *et al.*, 2000; Charalampopoulos *et al.*, 2002). En effet, les bactéries lactiques sont auxotrophes, pour de nombreux facteurs de croissance (Dellaglio *et al.*, 1994;

Fitzpatrick et O’Keeffe, 2001), comme; les acides aminés; les peptides; les vitamines; les dérivés d’acides nucléiques; les sels minéraux; les esters d’acides gras; et les hydrates de carbone.

II.2.2. L’espèce thermophile: *Streptococcus thermophilus*

Le genre *Streptococcus*, fait partie de la division des *Firmicutes* -l’un des deux grands phyla du microbiote, digestif avec les *Bacteroides*-, de la classe des *Coccus* et de l’ordre des *Lactobacillales*. Il désigne des bactéries à Gram positif et comprend de nombreuses espèces pathogènes, mais aussi des commensaux, très présents dans l’environnement. Parmi cette grande diversité, *Streptococcus thermophilus*; est une bactérie, alimentaire, habituelle, du milieu laitier, animal ou maternel, retrouvée dans le tractus gastro-intestinal, très précoce chez les nourrissons (**Solis et al., 2010**) et chez 90% des individus (**Qin et al., 2010**).

Streptococcus thermophilus, est phylogéniquement, proche de deux bactéries en particulier: *Lactococcus lactis*, le ferment laitier majeur et le plus étudié, et *Streptococcus salivarius*, une bactérie commensale, isolée de la cavité buccale et dont *Streptococcus thermophilus*, était considéré comme, une sous-espèce jusqu’en 1991 (**Schleifer et al., 1991**). Le sujet taxonomique relatif à l’espèce, constitue, encore, des controverses (**Hols et al., 2005**).

Streptococcus. thermophilus, est une bactérie lactique homofermentaire, elle tire son énergie de la fermentation lactique des sucres, en produisant, majoritairement, du lactate, son métabolisme atteint son maximum d’efficacité autour de la température corporelle des animaux à sang chaud. (**De Roissart et Luquet, 1994**).

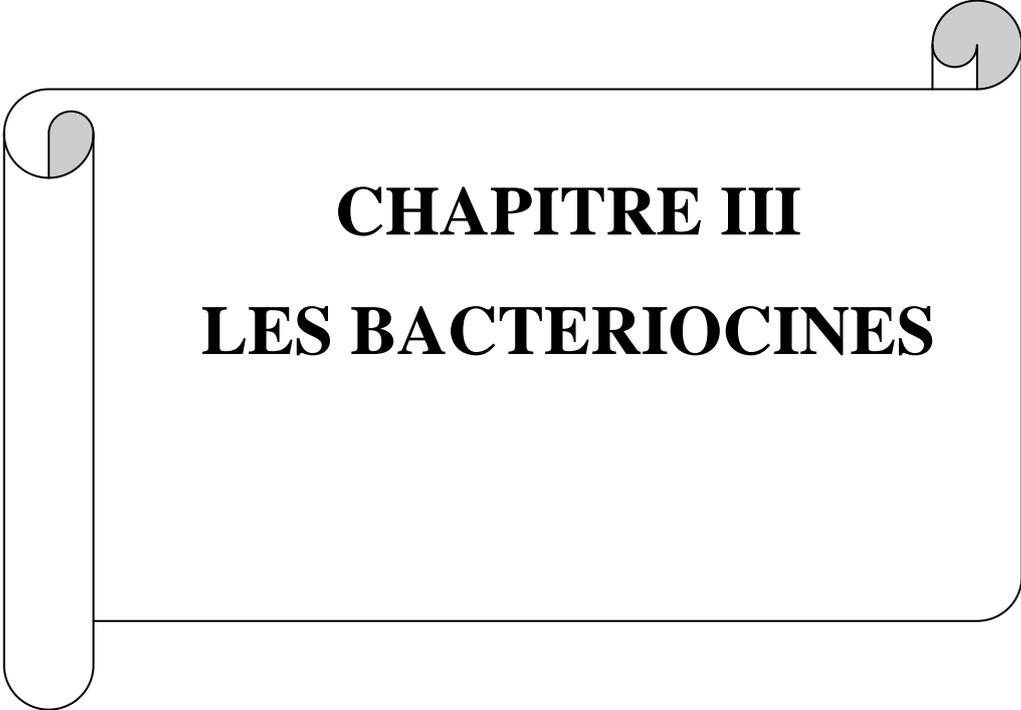
On considère que, l’innocuité de *Streptococcus. thermophilus*, a été démontrée, par sa consommation dans les laits fermentés, depuis les premiers procédés de fermentations du lait en Egypte ancienne antique, il y’a 9000 ans, en parallèle avec l’apparition de l’élevage des espèces laitières, l’espèce, est reconnue comme GRAS par CEE et les Etats-Unis (**FDA 2002; Delorme 2007; FDA 2012**). Cette bactérie, est la seule espèce streptococcique, isolée des produits laitiers, présentant un intérêt industriel, au sein du genre *Streptococcus* (**Hols et al., 2005**). Il est important de souligner ici l’importance de l’espèce *Streptococcus thermophilus*, pour la production du yaourt, dont il est l’une des deux bactéries entrant dans la définition selon le Codex Alimentarius, et la législation française (**n°88-1203 1988**) à la condition qu’au moins 10^7 UFC/g des produits soient dénombrables (**Jo 43/2004**).

De nombreuses souches de *Streptococcus thermophilus*, ont été utilisées dans les procédés agroalimentaires; dont plusieurs, ont été isolées et étudiées, et cinq ont été

séquencées: CNRZ1066, LMG 18311, LMD-9, ND03, JIM8232 (**Bolotin *et al.* 2004; Makarova *et al.*, 2006; Delorme *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2011**).

Cependant; **Hols *et al.*, (2005)**, avaient suggéré, un nombre limité de bactériocines, produits par cette espèce, en se basant, sur des conclusions des études, des gènes codant, pour la synthèse des protéines extracellulaires chez la même espèce (**Delorme *et al.*, 2011**).

Cette bactérie présente, une compétence naturelle de transformation, lui permettant d'internaliser de l'ADN libre présent dans le milieu et de l'intégrer dans son génome. Cette propriété, est employée, pour la construction de souches recombinantes (**Gardan *et al.*, 2009**).



CHAPITRE III
LES BACTERIOCINES

III. Bactériocines

III.1. Les molécules à activité antimicrobienne et/ou antifongique synthétisées par les bactéries lactiques thermophiles

Les bactéries lactiques, synthétisent des molécules à action bactéricide ou bactériostatique comme, les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyl, la reutérine et les bactériocines (**De Vuyst et Vandamme, 1994**). Ces mécanismes antimicrobiens, ont été exploités pour améliorer la préservation des aliments.

Les acides organiques, comme l'acide lactique, l'acide acétique ou l'acide propionique, produits pas les bactéries lactiques, au cours du processus de fermentation alimentaire. Leurs effets antimicrobiens, sont bien connus à l'heure actuelle (**Davidson et al., 1996**). Ces acides organiques, sous leurs forme dissociées ou non dissociées, agissent au niveau de la membrane cytoplasmique bactérienne, en perturbant le maintien du potentiel de la membrane, en inhibant les systèmes membranaires de transport actif (**Alakomi et al., 2000**). L'activité antimicrobienne, d'un acide organique, dépend de sa nature (acide fort, acide faible). L'acide acétique, par exemple, est plus inhibiteur que l'acide lactique; il inhibe les levures, les moisissures et les bactéries (**Blom et Mortvedt, 1991**).

Les bactéries lactiques, sont dépourvues de catalases, enzyme catalysant la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), en eau et en oxygène. En conséquence, l' H_2O_2 produit, s'accumule, dans l'environnement et peut inhiber certains microorganismes présents (**Condon, 1987**). L'action inhibitrice du peroxyde d'hydrogène est principalement due, à son fort effet oxydant, sur les lipides membranaires et les protéines cellulaires (**Caplice et Fitzgerald, 1999**).

Les bactéries lactiques hétérofermentaires, synthétisent du **dioxyde de carbone** (CO_2) comme, métabolite secondaire. Son accumulation dans le milieu extérieur, crée une anaérobiose, qui peut être toxique pour les microorganismes aérobies, présents dans l'aliment. Toutefois, le dioxyde de carbone, peut aussi, à faible concentration, stimuler la croissance de certaines, espèce lactières, à l'exemple des Lactobacilles (**Lindgren et Dobrogosz, 1990**).

Le diacétyl, est un produit du métabolisme du citrate, qui est responsable de l'arôme (gout noisette) des beures, des produits laitiers fermentés. Les bactéries à Gram négatif, les levures et les moisissures, sont plus sensibles au diacétyl, que les bactéries à paroi Gram positif. Le diacétyl, inhibe la croissance bactérienne, en interférant probablement, avec les mécanismes gouvernant l'utilisation de l'arginine (**Motlagh et al., 1991**).

Toutefois, le diacétyl, est rarement présent, dans l'aliment en quantité suffisante, pour y exercer une activité antimicrobienne importante (**Caplice et Fitzgerald, 1999**).

Les bactériocines, la première, découverte des bactériocines, a été rapportée en 1925 par Gratia, à partir d'un antibiotique spécifique produit par une souche de *Escherichia. Coli*, dont on a proposé le nom «Colicine». Ensuite, il s'est avéré que, la synthèse de ces composés n'était pas limitée à cette bactérie seulement, mais également par d'autres micro-organismes, c'est ainsi qu'on a généralisé le nom bactériocine, aux protéines antibactériennes spécifiques produites par certaines souches de bactéries et active contre d'autres souches taxonomiquement proche de l'espèce productrice (**Mohamed et al., 1996**).

Différentes définitions, des bactériocines, ont été données au cours du temps. Cependant; la définition qui reste la plus largement acceptée, est celle de **Klaenhammer, (1988)**, définissant 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 leurs spectres 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 positif. Aucune bactériocine produite par des bactéries lactiques, avec une activité contre des bactéries Gram négatif n'a été décrite, la membrane externe des bactéries Gram négatif, ne permettant pas aux bactériocines d'atteindre la membrane interne, siège de leur activité (**Onda et al., 2003**). D'une façon, plus générale: les bactériocines, sont des polypeptides antimicrobiens, synthétisés le plus souvent, par des bactéries lactiques. Elles exercent leurs effets antibactériens, sur des espèces, occupant, la même niche écologique ou celles qui sont phylogéniquement proche de l'organisme producteur (**Klaenhammer, 1988**).

III.2. Production des bactériocines

Les bactéries lactiques, ont la faculté de produire, des substances antibactériennes ou bactériocines; cette caractéristique, de production, des agents antimicrobiens, est sujet à d'intenses investigations scientifiques; plusieurs revues de littérature scientifique, étaient réservées à ce sujet. (**Klaenhammer, 1988; Klaenhammer et al., 2003**). D'autres travaux, ont focalisées les techniques, permettant, la mise en évidence et la quantification des bactériocines dans un milieu de culture (**Tagg et Mc Given, 1971; Tagg et al., 1973; Daba et al., 1994; Rodriguez et al., 2002; Savadogo et al., 2006; Aslim et Beyati, 2004; Aslim et al., 2005**).

De l'analyse de la littérature scientifique, relative au sujet de bactériocines, il ressort que, les bactériocines ou les agents antimicrobiens, produits par, les bactéries lactiques thermophiles. **Klaenhammer, (1993)**, avait distingué (04) classes:

Classe 01: Les Lantibiotics: leur membranes, renferme, des acides aminés non courantes comme: *Lanthionines* et *β-methylanthionines*, exemple: la Nisine.

Classe 02: Des bactériocines ne renferment pas de résidus «Lanthionines», sont thermostables, ces bactériocines ont, un PM supérieur à 10 KDa.

Classe 03: Bactériocines thermolabiles ou «large haet labile » bactériocines, (exemple: helviticin J; Lactacines A et B).

Classe 04: Cette classe renferme les protéines complexe ou «Complexe Bacteriocins» exemple: «Lactacin 27», «LeucocinS».

III.3. Méthodes de quantification des bactériocines

Pour la mise en évidence des bactériocines; deux méthodes classiques étaient utilisées:

III.3.1. The agar well diffusion test; ou la méthode de diffusion sur L'agar (**Tagg et Mc Given, 1971**).

Méthode de diffusion des puits: L'activité antimicrobienne, du surnageant brut actif (SBA), ainsi que de l'extrait cellulaire (EC), est testé par la méthode de diffusion sur gel.

Le milieu gélosé approprié (la gélose Mueller Hinton), estensemencé à raison de 01% avec la souche cible (généralement une bactérie pathogène ou phytopathogène), 10 ml de cette gélose sont coulés, dans des boites de Pétri. Des puits de 06 mm de diamètre, sont creusés stérilement, sur la surface du milieu et seront remplies avec 100 µl du surnageant (SBA) de cultures ou d'extrait cellulaire (EC), de la souche productrice de bactériocine. Ces boites Pétri, sont mises à une température de (+4°C) pendant 04h, pour permettre la bonne diffusion de la bactériocine, ou de la substance antibactérienne. Les cultures seront mises, dans leurs conditions optimales de croissance (incubation). La lecture, se fait par la mesure du diamètre en (mm) des zones d'inhibition formées autour des puits. Une inhibition, est considérée positive, si le diamètre est supérieur à 02 mm (**Thompson et al., 1996; Cadirici et Citaks, 2005**).

La mesure du diamètre de la zone d'inhibition (Z_i), est effectuée, selon la formule suivante:

$$Z_i \text{ (mm)} = \text{diamètre de la zone d'inhibition obtenue (mm)} - \text{diamètre du puits.}$$

III.3.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) ou détermination of the inhibitory minimal concentration (**Ten Brink *et al.*, 1994; Thompson *et al.*, 1996; Grade *et al.*, 2004**).

Méthode de la concentration minimale inhibitrice (CMI): Le but de cette méthode, est de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI), en bactériocine, capable de provoquer, une inhibition complète, de la croissance de la bactérie cible. Les cellules de la souche cible, en présence de bactériocine à différentes concentrations, sont étuvés pendant 24h à une température optimale de croissance; Une courbe de corrélation entre la croissance de la souche cible, en fonction de la concentration en bactériocine est établie (**Daba *et al.*, 1994; Nunez *et al.*, 1996; Grade *et al.*, 1997; Rodriguez *et al.*, 1998**).

III.4. Les mécanismes d'action des bactériocines

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

III.4.1. Classe 01: Les lantibiotiques

Les lantibiotiques, interagissent avec la membrane cellulaire, par des interactions électrostatiques ou par liaison à des récepteurs spécifiques tels que, le lipide II (un decaprenyl – pyrophosphoryl – MurNAc – pentapeptides - GlcNAc), un précurseur de peptidoglycanes. Suite à cette liaison, les lantibiotiques; peuvent former des pores larges et non spécifiques, dans la membrane cytoplasmique, ce qui va causer l'efflux rapide des petits composés cytoplasmiques, tels que les ions, les acides aminés, l'ATP...etc. Cette augmentation, de la perméabilité membranaire, va conduire, à la dissipation des deux composantes de la force proton motrice, à la cessation rapide des activités cellulaires et à la mort de la cellule. L'interaction avec le lipide II, permet d'augmenter la stabilité des pores formés et de réduire la concentration du lantibiotique, nécessaire à la formation des pores, mais peut également conduire à l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire (**Mc Auliffe *et Hill*, 2001; Twomey *et al.*, 2002; Bauer *et al.*, 2005; Patton *et al.*, 2005**).

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

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

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

III.4.2. Les bactériocines de classe II

Le mécanisme d'action supposé des bactériocines de classe IIa, est l'interaction de la bactériocine avec la membrane ou un récepteur spécifique, la «mannose perméase», pour ensuite former un pore, dans la membrane de la cellule, ce qui induit la perméabilisation de la membrane, la dissipation des deux composantes de la force proton motrice et la mort de la cellule (Dalet *et al.*, 2000; Héchard *et al.*, 2001; Gravesen *et al.*, 2002; Arous *et al.*, 2004; Vadyvaloo *et al.*, 2004; Bauer *et al.*, 2005). Le mécanisme de formation des pores, n'est pas connu, même si l'hypothèse la plus courante, est l'association de différentes molécules de la bactériocine (Ennahar *et al.*, 2000; Fimland *et al.*, 2000; Diep *et al.*, 2007).

Les bactériocines de classe IIb, ont en général, un spectre d'action inhibant, une large gamme de bactéries Gram positif. Elles forment des pores et rendent la membrane perméable à différentes petites molécules, des cations monovalents ou des anions, ce qui dissipe une ou les deux composantes de la force proton motrice. Les ions transportés sont spécifiques de la bactériocine (Oppegard *et al.*, 2007). La ration optimal d'activité, entre les deux sous-unités, est en général de 01:1 mais il est de 04:1 pour la lactocine 705 (Castellano *et al.*, 2007; Oppegard *et al.*, 2007). Néanmoins, les mécanismes d'interaction des deux bactériocines, entre elles et avec la membrane cellulaire, ne sont que très peu connus. Il a été montré, qu'il n'y avait pas de liaison au même récepteur que pour les bactériocines de classe IIa, «la mannose perméase».

Diep *et al.*, 2007; Castellano *et al.* 2007; ont récemment montré que les deux peptides composant la lactocine 705, ont des activités bien spécifiques. La lactocine 705 α interagit avec la surface de la membrane cellulaire et la déshydrate, ce qui permet à la lactocine 705 β de former des pores.

III.4.3. Les bactériocines de classe III

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

III.5. Intérêts des bactériocines en technologie alimentaire

Dans leur grande majorité, les bactériocines peptidiques de bactéries lactiques, sont thermorésistantes (120°C pendant 10 min), stables dans des zones du pH de 3 à 8 et sensibles à l'action d'enzymes protéolytiques (présentes dans le tractus intestinal).

De plus, contrairement à certains autres peptides antimicrobiens d'invertébrés et vertébrés, elles ne montrent pas d'activité hémolytique vis à vis des cellules eucaryotes (Nes et Holo, 2000).

Parmi les applications réelles, ou envisagées, pour les bactériocines de bactéries lactiques, on peut citer, l'utilisation de ferments producteurs de bactériocines, dans l'industrie laitière. Cependant; peu de ferments, de ce type sont utilisés (Cleveland *et al.*, 2001).

La fixation des bactériocines, sur des polymères pour l'emballage des aliments, pourrait aussi être, un mode de conservation des aliments (Sebti, 2002).

Différentes bactériocines, trouvent des applications dans les domaines, médicaux et vétérinaires. Par exemple, la nisine, a fait l'objet d'un brevet (Blackburn et Projan, 1994), quant à son utilisation, dans la prévention et le traitement d'ulcère causé par *Helicobacter pylori*. Elle est, de plus, connue pour être un agent thérapeutique, potentiel, des mastites bovines, et est déjà utilisée comme agent prophylactique. Différentes études ont été réalisées sur l'utilisation de la nisine en solution buccale. Elle a démontré une action préventive contre la plaque dentaire et les inflammations gingivales chez le chien (Howell *et al.*, 1993).

III.5.1. Les propriétés des bactériocines pour une application alimentaire

Les bactériocines sont, habituellement reconnues comme sûres, sont sensibles aux protéases digestives, ne sont pas toxiques, pour les cellules eucaryotes (Wijaya *et al.*, 2006). Elles ont, une grande tolérance aux variations de pH et aux traitements thermiques.

Leur spectre d'action, antimicrobien, peut-être, large ou étroit, elles peuvent donc cibler sélectivement, des bactéries pathogènes ou altérantes, sans inhiber les bactéries indispensables et ont un mode d'action bactéricide (Galvez *et al.*, 2007).

Les bactériocines, doivent cependant, être considérées, comme un moyen de préservation complémentaire à ceux déjà existant (Deegan *et al.*, 2006).

III.5.2. L'application des bactériocines dans le secteur alimentaire

Les bactériocines, peuvent être appliquées, sous une forme purifiée, semi-purifiée ou sous la forme d'un concentré, obtenu, après fermentation d'un substrat alimentaire. Les bactéries productrices peuvent également être appliquées, dans les produits alimentaires, la bactériocine sera alors produite in situ. Les bactériocines purifiées ou semi-purifiées, sont appliquées après production en fermenteur, purification ou semi-purification et conditionnement par les techniques adéquates, qui peuvent être relativement coûteuses. D'un point de vue législatif, une telle préparation, est considérée comme un additif alimentaire, seule la nisine, un lantibiotique, est acceptée comme additif alimentaire (E234) (**Guinane et al., 2005**).

Les bactériocines peuvent, également, être appliquées sous la forme d'un concentré obtenu après fermentation, par la souche productrice et atomisation d'un substrat alimentaire, tel que le lait, par exemple. Cette préparation, sera considérée comme, un ingrédient fermenté. Elle contiendra la bactériocine, mais également d'autres métabolites microbiens, tels que l'acide lactique. La pédiocine, une bactériocine de classe IIa, est commercialisée, sous cette forme, sous le nom ALTA 2341. Des essais ont été récemment réalisés, avec la lacticine 3147, un lantibiotique (**Deegan et al., 2006; Galvez et al., 2007**).

Un autre mode d'application, des bactériocines, consiste en leur immobilisation, sur les cellules productrices, dans des gels ou des films telle que l'alginate de calcium, la gélatine, la cellulose, les protéines de soja, des films de polysaccharides.... etc. La bactériocine sera alors, libérée dans le produit, au cours de la conservation. Depuis peu, des emballages en polyéthylène ou d'autres films plastiques, contenant des bactériocines ont été développés. Ces emballages permettent de réduire la croissance, des microorganismes pathogènes ou indésirables, pouvant se développer, en surface, durant la conservation du produit (**Luchansky et Call, 2004; Deegan et al., 2006; Ghalfi et al., 2006; Galvez et al., 2007**).

III.5.3. L'application de la bactérie productrice de bactériocines

Les bactéries productrices de bactériocines, peuvent être ajoutées, comme starter, dans des produits fermentés, ou comme culture protectrice. Elles doivent être, capables de croître et de produire des bactériocines, dans l'aliment à conserver. La composition du produit (nutriments accessibles, pH, additifs alimentaires ...etc) et les conditions de stockage (température, atmosphère, activité d'eau, etc.) doivent donc permettre la croissance et la production de bactériocines. Cette production étant souvent sous le contrôle d'un système de la concentration en molécule inductrice, doit être suffisante, son interaction avec la matrice alimentaire, peut donc être, un facteur limitant. Si les bactéries sont ajoutées en tant que starter, dans des produits fermentés, elles doivent pouvoir conférer au produit, les propriétés

organoleptiques désirables, tout en produisant des bactériocines. Les bactéries productrices de bactériocines, peuvent être également, ajoutées en combinaison, avec un autre starter, qui conférera les propriétés organoleptiques désirables. Dans ce cas, la bactérie productrice de bactériocines, ne doit pas détériorer les qualités organoleptiques de l'aliment fermenté et la bactériocine produite, ne doit pas avoir d'activité contre le starter (**Deegan *et al.*, 2006; Galvez *et al.*, 2007**). Si la bactérie est appliquée en tant que culture protectrice, elle doit être capable de produire sa bactériocine, sans modifier les propriétés organoleptiques (**Rodgers, 2001**).

III.5.4. Les facteurs influençant l'activité des bactériocines, dans les produits alimentaires

Lors d'une application alimentaire, la composition du produit, est un des premiers facteurs pouvant réduire potentiellement ou totalement dissiper l'activité de la bactériocine, de par son adsorption, sur des composantes, du produit, la limitation de sa solubilité et de sa diffusion, sa dégradation par des protéases, l'interaction avec des additifs alimentaires ou des ingrédients et/ou un pH inapproprié. Les traitements appliqués aux produits, constituent un deuxième facteur pouvant limiter l'activité inhibitrice, dans un produit alimentaire. En effet, des traitements thermiques trop élevés, peuvent dégrader les bactériocines présentes. La température de stockage pourra également réduire l'activité des bactériocines, qui varie en fonction de la température (**Galvez *et al.*, 2007**).

Un autre facteur limitant l'activité des bactériocines, est la flore autochtone, principalement sa concentration, la présence de bactéries résistantes, la présence de microorganismes produisant des protéases, dégradant la bactériocine et l'état physiologique de cette flore. Un état physiologique stationnaire ou stressé ainsi que la formation de spores peut conduire à une résistance accrue (**Schöbitz *et al.*, 2003**). En outre, dans les produits solides, les bactéries forment des microcolonies ou des biofilms, dont la résistance aux bactériocines peut être plus élevée (**Schöbitz *et al.*, 2003**). D'autre part, il sera également important de considérer l'impact de la bactériocine, sur la flore résidente favorable des aliments. Si celle-ci est sensible à la bactériocine, son déséquilibre pourra conduire, à la croissance de microorganismes résistants aux bactériocines, pathogènes et/ou altérants avec des conséquences sanitaires et/ou organoleptiques défavorables. Ces phénomènes peuvent conduire à:

- Une absence totale d'activité antimicrobienne.
- Une inhibition partielle des bactéries cibles.
- Une diminution initiale de la concentration des bactéries cibles sous la limite de détectabilité suivie d'une reprise de croissance, au cours du stockage.

–Un effet inacceptable sur l'état sanitaire et/ou sur les qualités organoleptiques (**Bouttefroy et al., 2000; Vignolo et al., 2000; Schöbitz et al., 2003; Kouakou et al., 2008**).

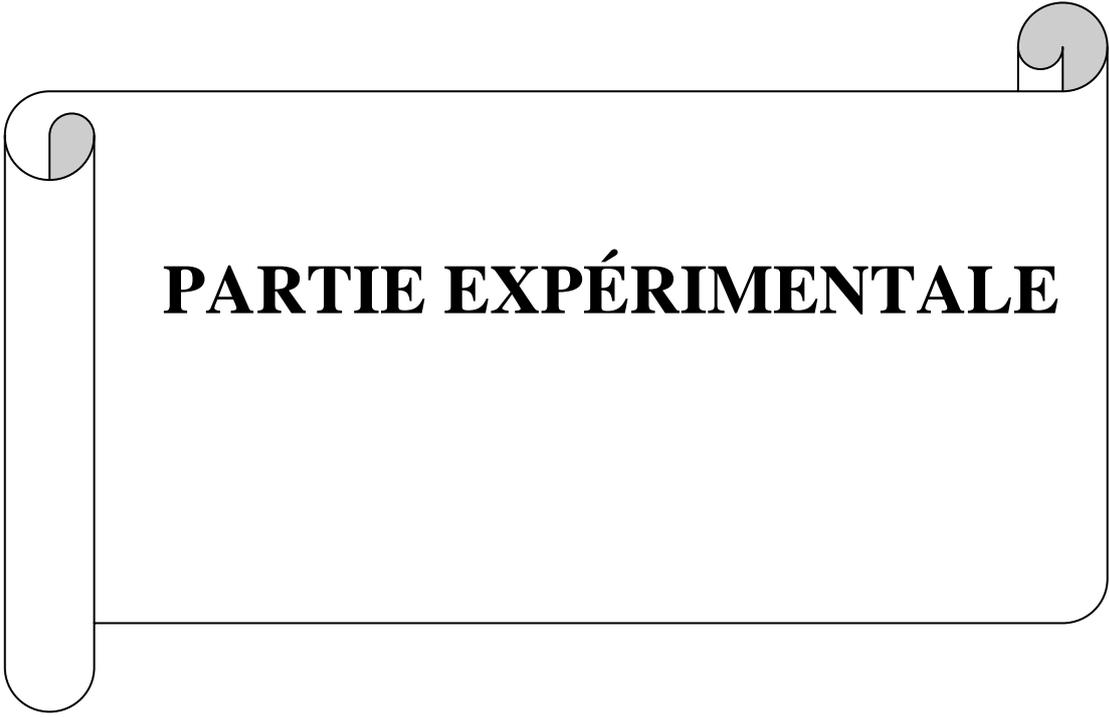
III.5.5. La combinaison de différentes bactériocines

Pour augmenter la durée de vie du produit, La combinaison de différentes bactériocines, permet d'augmenter l'activité et le spectre d'action, tout particulièrement, en combinant des bactériocines, appartenant à des classes différentes (**Vignolo et al., 2000**). Cependant, une attention particulière, devra être portée au développement de résistances chez les bactéries cibles. Le mécanisme de résistance aux bactériocines de classe IIa, par exemple, semble être identique, pour toutes les bactériocines de cette sous-classe.

Une bactérie résistante, à une bactériocine de classe IIa, sera donc résistante à d'autres bactériocines de classe IIa. D'autre part, des «cross-resistances», c'est-à-dire l'apparition de résistance à des bactériocines de classes différentes chez une bactérie cible, peuvent également être observées (**Deegan et al., 2006; Naghmouchi et al., 2007**).

III.5.6. La combinaison des bactériocines avec d'autres agents

La combinaison des bactériocines avec d'autres traitements de conservation chimique ou physique, donne des résultats prometteurs, pour la conservation des aliments. Les molécules chimiques, peuvent être des acides organiques, le nitrite, le chlorure de sodium, l'éthanol, des huiles essentielles (l'impact sur les propriétés organoleptiques doit être soigneusement évalué) ou des agents chélatants tel que, l'EDTA, le phosphate trisodique, le citrate. Ces agents chélatants permettent de séquestrer, les ions magnésium des lipopolysaccharides de la membrane externe, des bactéries Gram négatif permettant aux bactériocines d'atteindre, la membrane interne, siège de leur activité. Les traitements physiques peuvent être des traitements thermiques, le stockage sous atmosphère contrôlé, l'application de champs électriques ou l'application des hautes pressions (**Deegan et al., 2006; Galvez et al., 2007**). D'autre part, l'utilisation d'inhibiteurs de protéases ou de protéines de soja, a été suggérée afin de prévenir la dégradation des bactériocines, par les protéases présentes dans le produit à conserver (**Kouakou et al., 2008**).



PARTIE EXPÉRIMENTALE



MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. Matériels

Pour la réalisation des différentes étapes expérimentales, le matériel suivant a été utilisé:

I.1. Matériels biologiques

I.1.1. Souches de références: Les souches lactiques témoins suivantes, ont été utilisées, comme souches de références:

1/- Les lactobacilles thermophiles, ont été isolés d'un médicament «Probiotique»: souches lyophilisées, commercialisées, sous forme de gélule, sous la dénomination «Ultrabiotique», par les laboratoires: Nutrisanté, sis à-IRB-85612 Montaigu-France.

2/- La souche *Streptococcus thermophilus*, isolée d'un ferment, lyophilisé, destinée à la fabrication du yaourt, importé par le groupe Gip lait.

I.1.2. Les souches indicatrices: Eucaryotes (champignons/levures), procaryotes (souches bactériennes pathogènes et d'altérations des aliments).

Il s'agit de dix-huit souches, indicatrices, représentées par les espèces suivantes:

-Levures: *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae*.

-Champignons: *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nidulans*, et *Penicillium* sp.

-Bactéries à paroi Gram négatif: *Pseudomonas* sp., *E. coli*. M., *E. coli*. Al., *Vibrio* sp. et *Proteus* sp.

-Bactéries à paroi Gram positif: *Micrococcus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* sp. à *coagulase* (-), *Enterococcus* sp et *Bacillus* sp.

I.1.3. Les disques d'antibiotiques

Pour étudier le comportement des bactéries lactiques, vis-à-vis des antibiotiques, sept disques (Institut Pasteur d'Alger), ont été utilisés, pour réaliser un antibiogramme, sur milieu solide, Mueller Hinton, il s'agit de: NTX, IPM, E, AK, DO, AMC, SP.

I.1.4. Milieux de culture

Plusieurs milieux de culture ont été utilisés, au cours de cette étude expérimentale, il s'agit des milieux suivants:

-Les géloses: Gélose de Man-Rogosa et Sharp(MRS), gélose de Tarazaghi et Sandine (M17), Mueller-Hinton (M.H), gélose Agar au lait écrémé (LEG), Yeast milk agar (YMA), VRBL, Chapman Stone, gélose viande foie (VF). gélose Sabouraud, gélose Citrate de Simmons et gélose Triple Sugar Iron. (TSI).

-Les bouillons: MRS, M17,Eva-litsky, Rothe, Giolitti Cantoni, eau peptonée exempte d'indole, BCPL, eau peptonée, TSE, urée indole, bouillon nitraté, l'eau physiologique stérile

0.9%, les bouillons; Falkaw (L.D.C, O.D.C et A.D.H), Bouillons nutritif, et bouillon sabouraud

-Autres milieux: Lait écrémé reconstituée (LER) à 10% P/V.

I.2. Produits chimiques et réactifs

Les produits chimiques et réactifs, utilisés au cours de cette étude, sont les suivants :

-Les additifs: Alun de fer, Sulfite de sodium.

-Les colorants: Violet de Gentiane, fuschine, cristal violet, bleu de méthylène, phénolphtaléine à 01%.

-Les acides et bases: La soude dornic N/9, l'acide borique et l'acide sulfurique 0.1N.

-Les réactifs: réactif de Kovacs.

-Alcool et autres : Ethanol, eau de Javel, lugol, eau oxygénée, sulfate de potassium, l'oxalate de potassium, et les sucres (glucose, lactose, saccharose).

I.3. Matériels de laboratoire

I.3.1.Verreries

Béchers, entonnoirs, éprouvette graduée, erlenmeyers, fiole jaugée, flacons, lames/lamelles, pipettes pasteur, pipettes graduées, tubes à centrifuger, tubes à essai, flacons à différents volumes: 250 ml; 200 ml, 180 ml et burette à 10ml.

I.3.2. Ustensiles

Anses de platine, boites de Pétri, cuillères, distributeur, pinces, ciseau, pissettes, poires, portoirs, spatules, papier Josef, papier aluminium, rubans du parafilm, scotch et la règle.

I.3.3. Matériels lourds

Tableau 04: Présentation des matériels lourds utilisés.

Noms	Marques	Lieu de fabrication
Bain Marie.	Memmert	Germany
Etuve 30,37et 42°C.	Memmert	Germany
Congélateur horizontale.	ENIEM	
Vortex	Top Mix	
Centrifugeuse	Funk-gerber	Germany
Hotte microbiologique	Steril-gemmini Vertical laminar flow	Milan Italy
Hotte chimique	Equip LABO	SAINT –GOBAIN
Plaque chauffante	Agimatic-selecta	E.U
Autoclave-manuel	Sanoclav	Turkey
Autoclave industriel		Turkey
Microscope	B-350 OPTIKA	
pH mètre	Inolab pH 730	Germany
Conductimètre	Inolabcond 730	Germany
Distillateur	Buchi distillation unit	
Distillateur Kjaldahl	Buchi distillation unit	
Minéralisateur	K-424	
Balance analytiques		
Bec Bunsen		
Micropipette		
Compteur de colonies	Selecta	Espagne
Viscosimètre		
Densitomètre		
Spectrophotometre		
Thermomètre		

II. Méthodes

II.1. Lieu de l'étude

Toutes les analyses microbiologiques et physicochimiques, ont été réalisées dans le laboratoire de microbiologie et biochimie relevant de l'université de Bordj Bou Arreridj.

II.2. Echantillonnage

L'analyse a portée sur 32 échantillons, des laits crus, provenant de trois espèces laitières (caprine, bovine et ovine), appartenantes à des races locales, dans des fermes d'élevage, libre (extensif) et d'élevage sédentaire (Tableau 05). Les échantillons ont été prélevés, durant la saison printanière (le mois de mars et avril), dans différentes régions de la wilaya de Bordj Bou Arreridj, par une traite aseptique des animaux, effectuée le matin, avant la sortie du troupeau au pâturage (**Sbouï *et al.*, 2009**). L'échantillonnage, a été effectué à partir des animaux sains, non traités par des antibiotiques. Les échantillons, ont été prélevés dans des flacons en verre de 250 ml, préalablement autoclavés.

Le transport des échantillons, a été validé, dans une glacière +4°C, jusqu'au laboratoire. Dès l'arrivée, des échantillons, au laboratoire, la température a été mesurée à l'aide, d'un thermomètre (**Blains, 2004**). Chaque échantillon, a été partagé en 02 volumes:

-Le 1^{ier} a servi aux analyses microbiologiques.

-Le 2^{ème} aux analyses physico-chimiques.

Les échantillons ont été conservés à +4°C. (**Poutrel, 2004; Bidaud *et al.*, 2007**).

Tableau 05: Illustratif des origines des échantillons des laits crus.

Espèces	Echantillons	Régions	Dates de traite	Heures de traite
caprine	Ch1	Ouled Dahman	24/03/2013	06:19
	Ch2	Hassnaoua	24/03/2013	07:19
	Ch3	Bir Gassed Ali	23/03/2013	07:13
	Ch4	Bir Gassed Ali	04/03/2013	07:15
	Ch5	Ain Taghrout	12/04/2013	07:36
	Ch6	Ain Taghrout	12/04/2013	07:40
	Ch7	Taza	16/04/2013	07:05
	Ch8	Taza	20/04/2013	07:05
	Ch9	Taza	25/04/2013	07:05
	Ch10	Ouled Mahdi	10/04/2013	07:15
	Ch11	Ouled Mahdi	10/04/2013	07:25
	Ch12	Ouled Dahman	24/03/2013	06:10
	Ch13	Ouled Dahman	24/03/2013	06:15
	Ch14	Ouled Dahman	24/03/2013	06:20
	Ch15	Ouled Dahman	24/03/2013	06:25

bovine	V1	Bir Gassed Ali	23/03/2013	06:45
	V2	Bir Gassed Ali	23/03/2013	08:45
	V3	Lachbor	23/03/2013	06:42
	V4	Charchar	10/04/2013	06:52
	V5	Ain Taghrout	17/03/2013	07:14
	V6	Sidi Mbarek	12/03/2013	06:40
	V7	Ain Taghrout	21/03/2013	07:00
	V8	Mansoura	19/03/2013	07:00
	V9	Ain Taghrout	11/05/2013	06:00
	Beurre	El ache	10/04/2013	08:00
ovine	B1	Bir Gassed Ali	23/03/2013	07:10
	B2	Hassnaoua	23/03/2013	07:00
	B3	Charchar	22/03/2013	06:50
	B4	Ain Taghrout	11/04/2013	06:45
	B5	Tizi	16/03/2013	07:12
	B6	Ain Taghrout	22/03/2013	06:30
	B7	Rabta	11/04/2013	07:30
	B8	Ouled Mahdi	10/04/2013	07:05

II.3. Contrôle de la qualité microbiologique des échantillons du lait cru

Pour chaque échantillon, nous avons réalisé les tests de contrôle de qualité microbiologique (Tableau 06), selon la méthode préconisée par: **Beerens et Luquet, (1987); Larpent *et al.*, (1997); Guiraud, (2003).**

Tableau 06: Illustratif des différents tests réalisés de la contrôle de qualité microbiologique.

Groupes microbiens recherchés	Milieux des tests présomptifs	Milieux des tests confirmatifs	T°C d'incubation
La flore aérobie mésophile totale (FAMT)	Gélose au lait écrémé (LEG)		30°C
Coliformes totaux (37°C)/fécaux (44°C)	Bouillon BCPL à 37°C	Gélose VRBL à 44°C	37°C et 44°C
Les germes indologènes	A partir des BCPL ensemencement sur l'eau peptonée exempte d'indole		37°C
Clostridium Sulfite réducteurs (CSR)	Gélose Viande foie (VF)		37°C
Streptocoques fécaux	Bouillon Rothe	Bouillon Eva-Litsky	37°C
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bouillon Giolliti Cantoni (GC)	Chapman stone	30°C

II.3.1. Réalisation des dilutions décimales

Des dilutions décimales, allant de 10^{-1} à 10^{-6} , à l'aide d'une solution TSE stérile (Tryptone sel eau), ont été réalisées, tous les échantillons du lait cru, collectés, ont été analysés, selon le protocole préconisé, par **Larpen et al., (1997) et Guiraud, (2003)**, parfois modifiés.

II.3.2. Recherche de la flore aérobie mésophile totale

Le dénombrement de la flore aérobie mésophile totale (FAMT), a été effectué sur le milieu solide Gélose au lait écrémé (voir composition de ce milieu en annexe 01) à 01% P/V, par ensemencement de 01ml des dilutions 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} .

Après incubation à 30°C, on a procédé aux dénombrements.

II.3.3. Recherche des Coliformes totaux et Coliformes fécaux

a. Recherche des Coliformes totaux

Cette recherche, a été effectuée sur le bouillon BCPL (Bromo Crésol Pourpre Lactosé), (voir composition de ce milieu en annexe 01); milieu d'enrichissement pour les coliformes totaux; par inoculation de 01ml à partir des dilutions 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} . La lecture, a été réalisée après 48 heures d'incubation à 37°C.

b. Recherche des Coliformes fécaux

Les coliformes fécaux, ont été dénombrés sur la gélose VRBL (le milieu de culture renfermant le vert brillant, la bille, rouge neutre, (voir composition de ce milieu en annexe 01), par étalement de 01 ml, à partir des tubes BCPL positifs, après incubation pendant 48h à + 44°C.

II.3.4. Recherche de la flore indologène

Tous les tubes BCPL positifs, ont été ensemencés, par l'ajout de 01 ml, dans un tube de 10 ml, contenant le milieu eau peptonée exempte d'indole. Après incubation à 44°C; pendant 24h. La lecture a été faite par, l'ajout au tube d'eau peptonée exempte d'indole, quelques gouttes de réactif de Kovacs, (Voir composition de l'eau peptonée et de réactif de Kovacs en annexe 01). Une réaction positive se traduit par la formation d'un anneau rouge.

II.3.5. Recherche des Clostridium Sulfite-Réducteurs (CSR)

Après un choc thermique, de 20 ml de la solution mère, à 80°C pendant 10 min environ, puis un refroidissement rapide, sous courant d'eau froide. Le volume du lait chauffé, est stérilement versé dans un tube contenant la gélose viande foie (VF), (voir composition de ce milieu en annexe 01), préalablement fondue et additionnée des deux additifs (alun de fer et sulfite de sodium), et incubé à 37°C. La lecture a été faite après 24, 48 et 72h.

II.3.6. Recherche des Streptocoques fécaux

Pour la recherche des Streptocoques fécaux, on a utilisés le milieu de présomption, milieu Rothe (voir composition de ce milieu en annexe 01). (Par ensemencement de 01 ml de la solution mère et de la dilution 10^{-1}) et l'ensemencement des tubes positifs dans le milieu de confirmation: Eva Litsky (voir composition de ce milieu en annexe 01). La lecture a été réalisée après 24h d'incubation à 37°C .

II.3.7. Recherche des *Staphylococcus aureus*

01 ml de la solution mère et de la dilution 10^{-1} , ont été ensemencés, dans des bouillons Giolliti Cantoni, après incubation pendant 24h à 30°C , 01 ml de chaque tube, est étalé sur la surface du Gélose Chapman Stone (voir la composition de ces deux milieux en annexe 01). On procède au dénombrement, après 24h d'incubation à 30°C .

II.4. Isolement et dénombrement des bactéries lactiques thermophiles

L'isolement sélectif des bactéries lactiques thermophiles (lactobacilles/lactocoques), par culture sur plusieurs milieux, a été réalisé selon les méthodes décrites par **la Fédération Internationale du Lait (FIL), Larpent et al., (1997); Bedar, (2007); Rasolofo, (2010)** (Tableau 07).

Tableau 07: Différentes étapes réalisées pour l'isolement des souches lactiques (lactobacilles/lactocoques) (**Larpent et al., 1997; Guiraud, 1998; 2003**):

Etape 01	Réalisation des dilutions de 10^{-1} à 10^{-7} , à l'aide d'une solution stérile TSE.
Etape 02	Ensemencement en profondeur et en surface sur milieu M17 gélosé, incubation à 42°C pendant 48h à 72h
Etape 03	Ensemencement sur MRS liquide et en profondeur sur milieu MRS gélosé, incubation anaérobique à 42°C pendant 48h à 72h.
Etape 04	Examen macroscopique des boîtes Pétri, et dénombrement des colonies.
Etape 05	Observation microscopique, test de catalase, coloration de Gram, et au bleu de méthylène.
Etape 06	Purifications des souches par plusieurs repiquages successifs, réalisation des stries, sur des milieux de culture correspondants: MRS et M17 à 42°C .
Etape 07	Sélection des souches, par incubation sur du lait écrémé reconstitué pendant 48h, on retient que des souches qui coagulent le lait pendant 24h. Les souches intéressantes, sont sélectionnées, conservés dans des bouillons M17 et MRS à 20% de glycérol, mode de conservation préconisée par Gyosheva et al., (1995) .
Etape 08	Identification des souches par réalisation des différents tests physiologiques et biochimiques selon Guiraud, (1998) .

II.4.1. Isolement des lactobacilles thermophiles

L'isolement a été réalisé, sur gélose MRS (**De Man et al., 1960**), (Voir composition du milieu en annexe 01; milieu adapté à la recherche spécifique des lactobacilles, l'ensemencement se fait en profondeur; 01 ml de la dilution, est introduit au fond de la boîte de Pétri, ensuite un volume de 10 ml de la gélose MRS est ajouté, gardée en surfusion, une homogénéisation par des mouvements en circuits ∞ a été réalisée, la lecture a été faite après 72°C d'incubation à 42°C.

II.4.2. Isolement des lactocoques thermophiles

L'isolement a été réalisé, sur gélose M17 (**Tarazaghi et Sandine, 1975**); milieu adapté à la recherche spécifiques des lactocoques, préalablement coulé et solidifié dans des boîtes de Pétri, ensemencés par 01ml des dilutions (**larpent et al., 1997**), à la surface du milieu, suivi d'un étalement (**Guiraud, 1998**). L'incubation a été faite à 42°C (pour un isolement des thermophiles) et 37°C (pour un isolement des mésophiles), pendant 72h, en conditions d'anaérobiose, pour les lactobacilles et en aéroanaérobiose, pour les lactocoques.

II.4.3. Dénombrement

Toute bactérie vivante, introduite dans la masse ou en surface d'un milieu gélosé favorable, donne, en principe, naissance après incubation, à une colonie macroscopique. Le dénombrement des lactobacilles, sur le milieu MRS et lactocoques sur milieu le M17, après 24h-48h d'incubation, est effectué à l'aide d'un compteur des colonies microbiennes (Selecta, Espagne). Les colonies ayant un retard de croissance ont été dénombrées après 72h. Les résultats sont exprimés en, nombres de cellules par ml (**UFC/ml**) pour chaque dilution en utilisant la formule suivante (**Guiraud, 1998**):

$$\text{UFC/ml} = \text{nombre de colonies formées sur gélose} \times \text{l'inverse du facteur de dilution} \\ \times \text{le volume ensemencé}$$

II.5. Purification des bactéries lactiques isolées

La purification consiste, à réaliser des repiquages successifs (série de 03-04 repiquages), sur gélose et bouillon MRS, pour les lactobacilles, gélose et bouillon M17, pour les lactocoques, avec une incubation à 37°C/42°C, pendant 24h, jusqu'à l'obtention de colonies de même taille, même forme et même couleur, renseignant sur la pureté des souches. (**Karam et Karam, 1994; Larpent et al., 1997; Idoui et al., 2009**).

II.6. Identification des souches isolées

L'identification des isolats, des bactéries lactiques, est établie en se basant sur les deux étapes suivantes:

II.6.1. La première étape

Consiste, à tester tous les isolats, par la détermination des caractères morphologiques (macroscopiques/microscopiques), la coloration au bleu de méthylène, la coloration de Gram, qui ont été décrite par **Larpent, (1997); Idoui et Karam, (2008); Gusils *et al.*, (2010).**

II.6.1.1. Examen macroscopique: L'observation à l'œil nu, est une première clé d'identification (**Philippon *et al.*, 2007**). La lecture des ensemencements, vise à noter: l'aspect, la forme, le contour, la surface, la consistance, la taille, l'odeur et la couleur des colonies, sur milieux M17 et MRS.

II.6.1.2. Examen microscopique: Après l'examen macroscopique, des colonies sur gélose MRS, et dans le but d'écartier tout ce qui ne peut pas être une bactérie lactique, il a été effectué sur un frottis bactérien, préparé à partir des colonies suspectes, en cultures pures, les isolats ont été soumis à la coloration de bleu de méthylène (voir annexe 03), et la coloration de Gram (voir annexe 03), celle-ci permet de différencier les bactéries à paroi Gram positif de celles à paroi Gram négatif, les bâtonnets, les coques et les modes des regroupements.

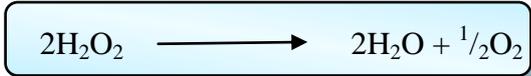
II.6.2. La deuxième étape

Est fondée, sur l'étude de divers caractères biochimiques; qui consiste en la réalisation de plusieurs tests biochimiques, selon des méthodes préconisées par: **De Roissart et Luquet, (1994)** (Tableau 08).

II.6.2.1. Recherche de la catalase

Sur une lame, une goutte d'eau oxygénée, est déposée, puis on ajoute une colonie purifiée, un résultat est considéré positif, par un dégagement de bulles gazeuses.

La catalase (Ferroporphyrine, de PM élevé); enzyme ayant la propriété de décomposer l'eau oxygénée (H_2O_2), avec dégagement d'oxygène (O_2) (**Djelouat, 1990**). Selon la réaction suivante:



II.6.2.2. Recherche de la β -galactosidase (Test d'ONPG)

L'attaque de lactose, par une bactérie dépend d'une enzyme; la bêta-galactosidase-perméase. Une autre enzyme intracellulaire, scinde le lactose en glucose et galactose

(β -galactosidase), sans cette enzyme, la cellule bactérienne, sera incapable d'utiliser le lactose, pour déceler cette dernière; on utilise un substrat analogue au galactose (disques ONPG; Ortho-Nitro-Phényl-Galactopyranoside).

En présence de cette enzyme, le colorant orthonitrophénolest libéré, la coloration des disques vire vers le jaune (Djelouat, 1990).

II.6.2.3. Recherche de nitrate réductase

Le bouillon nitraté (Voir composition de ce milieu en annexe 01), est ensemencé avec la souche à tester, après incubation à 37°C pendant 24h, on ajoute une goutte de nitrate (NR1) et une goutte de nitrate (NR 2), en présence de la poudre de zinc, si la coloration vire vers le rouge, le teste est dit positif (Djelouat, 1990).

II.6.2.4. Recherche de type fermentaire

Ce test, permet de différencier les bactéries lactiques homofermentaires de celles hétérofermentaires. Il consiste à mettre en évidence la production de gaz (CO₂). (Sriranganathan *et al.*, 1973).

II.6.2.5. Test du milieu TSI (Triple Sugar Iron)

Pour mettre en évidence, la fermentation des trois sucres (lactose, glucose et saccharose). L'ensemencement du culot par une pique profonde et de la pente par des stries médianes, puis incubation pendant 48h à 37°C (Djelouat, 1990).

II.6.2.6. Test du mannitol mobilité

Ce test, permet la vérification simultanée de la dégradation du mannitol et de la mobilité. L'observation d'un jaunissement du milieu traduit une acidification suite à la fermentation des sucres. Tandis que le trouble traduit la mobilité (Djelouat, 1990).

II.6.2.7. Test Citrate de Simmons

Ce test, permis la mise en évidence, du citrate perméase; enzyme, permettant à la souche, l'utilisation du citrate comme source de carbone, qui se traduit par la libération des ions OH⁻, l'alcalinisation du milieu, se traduit par une couleur bleu, après le virage du vert de bromothymol (Djelouat, 1990).

II.6.2.8. Recherche de production d'indole

La dégradation du tryptophane, dans l'eau peptonée exempte d'indole (Voir composition de ce milieu en annexe 01), est soldée par la production d'indole donnant un anneau rouge, avec le réactif de Kovacs, après 24h d'incubation à 42°C (Djelouat, 1990).

II.6.2.9. Recherche de l'uréase et du tryptophane désaminase

L'hydrolyse de l'urée, par l'Uréase, avec formation d'ammoniaque, qui conduit à l'alcalinisation du milieu, celle-ci détectable, par l'indicateur de couleur sur milieu urée-indole (Voir composition de ce milieu en annexe 01) (Djelouat, 1990).

II.6.2.10. Recherche de L.D.C, O.D.C et A.D.H

Le milieu liquide Falkaw, (Voir composition de ce milieu en annexe 01), a été utilisé pour la mise en évidence des enzymes: Lysine décarboxylase (**L.D.C**), Ornithine décarboxylase (**O.D.C**), Arginine décarboxylase (**A.D.H**). Une réaction négative se traduit, par le virage de la couleur du milieu au jaune. Si le milieu garde la couleur violette; ceci traduit la présence des enzymes: décarboxylase et dihydrolase bactériennes (**Djelouat, 1990**).

II.6.2.11. Croissance à différentes températures

Ce test est important, car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles (**Larpen et al., 1997**).

II.6.2.12. Détermination du pH optimum de croissance

Il s'agit d'ensemencement de la souche cible, sur le milieu correspondant (MRS, M17) avec des différents pH, pré- établi. Après 24h d'incubation, on procède aux dénombrements des colonies sur chaque milieu.

Le pH optimum est attribut, au milieu de culture, donnant le nombre le plus élevé des colonies.

II.6.2.13. Croissance sur milieu à différentes concentrations de Na Cl

La croissance en présence de différentes concentrations de chlorure de sodium (Na Cl), donne des renseignements précieux, pour l'identification. Les cultures à tester, ont été ensemencées, sur le lait écrémé à 10% P/V, hyper salés, à 2,5%, 4,5% et à 6.5% de Na Cl. Après une incubation à 42°C pendant 24h, l'aptitude à croître sur ces milieux, se traduit par l'apparition d'un trouble (**Bennama et al., 2012**).

II.6.2.14. L'activité protéolytique

L'activité protéolytique, des exoprotéases et des endoprotéases, a été testée par modification de la méthode décrite par **Thivierge, (1999)**, c'est la méthode des spots sur milieu (YMA: Yeast milk agar, voir composition du milieu en annexe 01)

La recherche des protéases, des souches lactiques, thermophiles, a été réalisée sur le milieu YMA. L'ensemencement par spots, des souches, préalablement réactivées, pendant 24h, à 42°C, sur le LER à 10% P/V. (voir la composition du milieu en annexe 01).

L'activité protéolytique se manifeste directement par des zones claires (des formes d'empreintes digitales), dues à la dégradation des protéines.

Tableau 08: Tableau illustratif des différents tests biochimiques et physiologiques réalisés.

Tests	Modes opératoires
Production de gaz à partir du Glucose.	Une colonie, est repiquée sur bouillon MRS contenant une cloche de durham et incubées à 37°C et 42°C/ 24 à 48h. (Garvie, 1984)
Production d'indole.	Une suspension, est ensemencée dans l'eau peptonée exempte d'indole, recouverte d'une couche d'huile de vaseline. La production d'indole est détectée par le réactif de kovacs après 24h d'incubation à 42°C. (Djelouat, 1990).
Réduction des nitrates	La souche cible (purifiée), est ensemencé dans le bouillon nitraté, après incubation à 37°C pendant 24H, la lecture se fait par ajout des 2 réactifs NR1et NR2, en présence de la poudre de zinc. Une réaction positive se traduit par le virage vers le rouge. (Djelouat, 1990).
Croissance en aérobiose	La suspension est ensemencée en surface sur gélose MRS et M17 puis incubée en aérobiose à 37 à 42°C/24 à 48h
Fermentation des sucres TSI	Ensemencement de la souche cible, par pique centrale au culot, par des stries sur la pente: après incubation pendant 24 h à 42°C, la lecture consiste a la appréciation de fermentation des sucres (virage de l'indicateur, production de gaz par des bulles), production d'H ₂ S: noircissement (Djelouat, 1990).
Recherche d'oxydase	Un disque d'oxydase et une goutte d'eau distillé sont déposées sur une lame, un peu de culture est prélevé et déposer sur le disque. Après environ 10 minutes une coloration violet foncé apparait sur le disque puis vire au noir (Marshal et al., 1987).
Recherche de catalase	Une partie de a colonie suspecte est diluée dans une goutte d'eau oxygénée sur une lame stérile. Le dégagement de bulles de gaz indique la présence de la catalase (Camille, 2007).
Croissance à différentes T°C	Après inoculation du bouillon MRS, M17, par les cultures pures, les tubes sont incubés pendant 24h à 48h aux températures 30°C, 37°C et 42°C, au bout de ce délai, la croissance est appréciée par examen des milieux. Les bactéries mésophiles poussent à 30-37°C alors que les bactéries thermophiles ne le font pas.
Croissance sur milieu à différentes concentrations de Na Cl	Ensemencement de la souche lactique cible, sur milieu LER, préalablement stérilisé est additionné de 2,5%, 4,5% et 6,5% de Na Cl, l'incubation est faite à 42°C pendant 48h. La lecture consiste à l'appréciation des troubles de la croissance microbienne (Bennama et al., 2012).
Recherche de l'uréase	Une suspension de la souche lactique isolée, est ensemencée dans le milieu urée- indole. L'incubation est faite à 42°C pendant 24 h, la réaction est dite positive; si la couleur du milieu vire vers le rouge (alcalinisation du milieu) (Djelouat, 1990).
Recherche des décarboxylases L.D.C O.D.C et de l'A.D.H	Après incubation de la souche lactique sur le milieu Falkaw (de coloration violette), incubation 24 h à 42°C. La réaction est dite positive, si le milieu garde sa coloration violette (Djelouat, 1990).
Détermination du pH optimum	Ensemencement de la souche cible sur milieu de culture correspondant (MRS, M17), après incubation de 24 h 42°C, on

	dénombre des colonies.
Recherche de l'activité protéolytique	La recherche des protéases, des souches lactiques, thermophiles, a été réalisée sur le milieu YMA (voir la composition du milieu en annexe). L'ensemencement par spots, des souches, préalablement réactivées, pendant 24h, à 42°C, sur le LER à 10% (voir la composition du milieu en annexe).l'activité protéolytique se manifeste directement par des zones claires (des formes d'empreintes digitales) due à la dégradation des protéines Moulay et al., (2006) .

II.7. Conservation des souches lactiques isolées

Après purification et réactivation des souches lactiques thermophiles, dans des bouillons correspondants (MRS et M17 en l'occurrence), leurs conservation à était faite dans différents milieux à basses températures, a été effectuée par deux méthodes:

- **Conservation de courte durée:** Sur le lait écrémé reconstitué à 10%P/V, additionné du glycérol à 20% (**Gyosheva et al., 1995; Fonseca et al., 2000; Beal et al., 2008**).
- **Conservation de longue durée:** Sur un milieu approprié (MRS liquide pour les lactobacilles, tandis que le M17 liquide pour les lactocoques), additionnée du glycérol à 30% (**Gyosheva et al., 1995; Denis et al., 2006**).

II.8. Etude des caractéristiques technologiques des souches lactiques thermophiles

La sélection des souches (ou pré purification des souches), a été réalisée selon les travaux des **Chamba, et Prost (1989); Zourari et al. (1991); Thomas et Chamba, (2000)**.

Les souches lactiques, thermophiles, isolées, ont été incubées, à 42°C dans du lait écrémé reconstitué à 10% (P/V). Les souches, qui n'ont pas coagulées le lait, au bout de 24h d'incubation à 42°C, ont été éliminées.

8.1. Cinétique d'acidification par mesure des pH et titrage d'acidité en °D

L'acidification a été suivie, selon la méthode préconisée par **Chamba et Prost, (1989); Thomas et Chamba, (2000)**, pendant 24h par des mesures, des valeurs du pH à l'aide d'un pH-mètre (Inolab pH 730-Germany) et le titrage de l'acidité en degré Dornic (D°).

Après deux repiquages, des souches, de 24h d'intervalle, chacun, (en guise de réactivation des souches lactiques), sur les milieux de culture correspondant (le MRS pour les lactobacilles et le M17 pour les Streptocoques), le lait écrémé reconstitué (LER) a 10% (P/V), est reparti dans, des tubes à essai, a raison de 10 ml par tube, chaque tube, estensemencé a un taux de 01%, des souches lactiques, l'incubation a été faite à 42°C pendant 24h. La cinétique d'acidification a été suivie à des intervalles de temps:0h, 04h, 06h, 16h et 24h.

Pour chaque dosage, le contenu d'un tube est versé dans un bécher, pour les mesures des pH, puis le titrage de l'acidité, en degré Dornic (D°), par neutralisation à l'aide d'une solution Na OH N/9.

II.9. Antibiogramme

La sensibilité et la résistance des bactéries lactiques, aux ATB; a été réalisées par la technique de diffusion, sur milieu Mueller-Hinton (voir composition en annexe 01) Les surnageants lactiques, sont obtenues par inoculation, dans le lait écrémé reconstitué à 10% P/V, à partir des cultures préalablement conservées. Les souches lactiques sont inondées, sur le support d'antibiogramme (milieu M.H agar), et gradées à la température ambiante, pendant 40 min à 1h, pour assurer une bonne diffusion du surnageant dans le milieu, ensuite, chaque boîte, reçoit sept (07) disques d'antibiotiques, à savoir: Nitroxoline, Imipénème, Erythromycin, Amikacin, Doxycycline, Amoxycilline, Clavulanic et Spiramycin (Tableau09, Figure 04). Après incubation en aéroanaérobiose à 37°C, pendant 24h, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés en millimètre (**Leroy et Vuyst, 2007**).

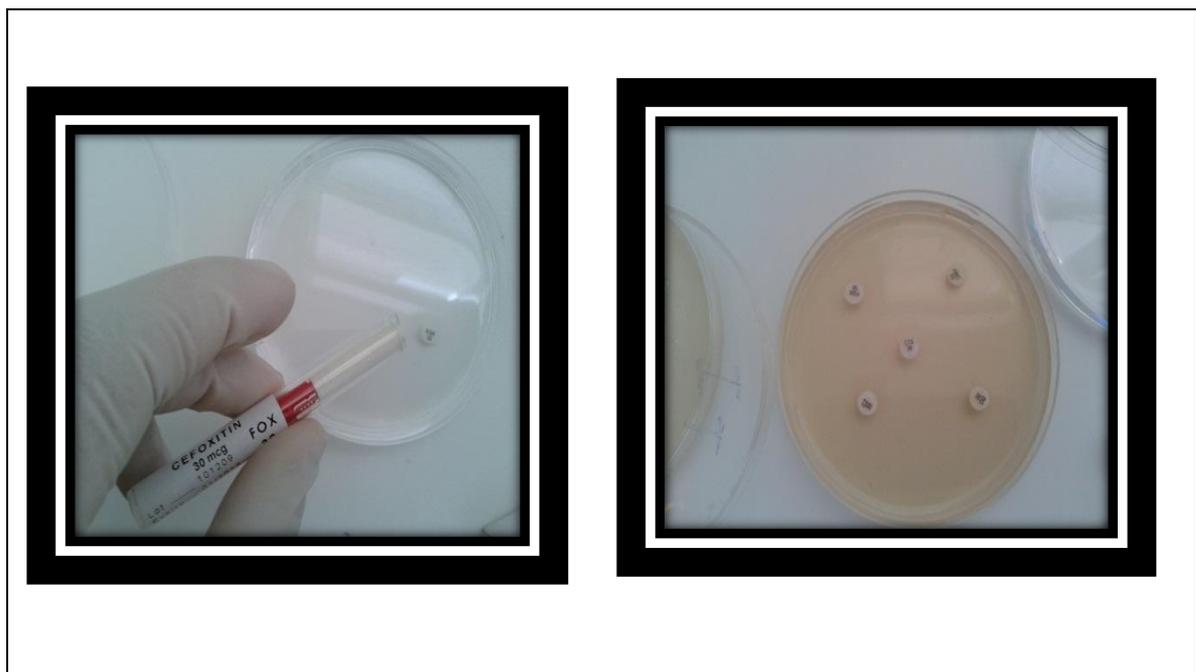


Figure 04: Test d'antibiogramme sur milieu Mueller-Hinton.

Tableau 09: Liste des antibiotiques testés et leurs charges respectives en µg:

Antibiotiques	Abréviations	La charge (µg)
Nitroxoline	NTX	30
Imipénème	IPM	10
Erythromycin	E	15
Amikacin	AK	10
Doxycycline	DO	30
AmoxicillineClavulanic	AMC	30
Spiramycin	SP	100

II.10. Etude des interactions entre des souches pathogènes/phytopathogènes et les souches lactiques isolées

II.10.1. Etude des interactions entre des souches lactiques et la flore eucaryote pathogène et phytopathogènes

Pour la détermination de l'action antagoniste (effet inhibiteur), des souches lactiques isolées, dirigées contre, des souches eucaryotes pathogènes et phytopathogènes, par la méthode des disques imbibées, en utilisant le milieu de culture Mueller-Hinton comme, support des interactions. Cela après réactivation des souches eucaryotes, pendant 24h d'incubation a température optimale, dans des bouillons nutritifs. (Tableau 10). Le protocole appliqué est inspiré des méthodes préconisés par plusieurs auteurs: (**Tagg et Mc Given, 1971; Tagg et al., 1973**).

II.10.2. Etude des interactions entre des souches lactiques et la flore procaryote pathogène et d'altération des aliments

II.10.2.1. Revivification des souches procaryotes pathogènes et d'altérations des aliments

Les souches pathogènes, procaryotes, à paroi Gram négatif et à paroi Gram positif, ont été utilisées comme étant des souches cibles (indicatrices), impliquées dans divers pathologies humaines et présentant, au moins, une multi résistance vis-à-vis des antibiotiques, qui ont été conservées sur des milieux de culture appropriés (bouillon nutritif, Voir composition de ce milieu en annexe), à la température de réfrigération. Elles ont été réactivées, par double incubation sur bouillon nutritif, l'eau peptonée à des températures d'incubation favorables pour leur croissance pendant 24h, ceci est pour la recherche des substances inhibitrices produites par les souches lactiques isolées (Tableau 10).

Tableau 10: Présentations des souches pathogènes et/ou phytopathogènes utilisées:

Les souches cibles		Gram	Bouillons et T°C. de réactivation	Origines
La flore eucaryote				
Levurs	<i>Candida albicans</i>	Eucaryote	Bouillon Sabouraud à 30°C	Voies urinaires
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Eucaryote	Bouillon Sabouraud à 30°C	Ferment lyophilisé
Champignons	<i>Fusarium sp.</i>	Eucaryote	B.N à 25°C	Phytopathogène.
	<i>Aspergillus sp.</i>	Eucaryote	Eau peptonée à 28°C	Phytopathogène
	<i>Aspergillus niger</i>	Eucaryote	Eau peptonée à 28°C	Phytopathogène
	<i>Aspergillus flavus</i>	Eucaryote	Eau peptonée à 28°C	Phytopathogène
	<i>Aspergillus nidulan</i>	Eucaryote	Eau peptonée à 28°C	Phytopathogène
	<i>Penicillium sp.</i>	Eucaryote	Eau peptonée à 30°C	Phytopathogène
La flore procaryote				
Gram⁻	<i>Pseudomonas sp.</i>	G ⁻	37°C	Pathogène des aliments
	<i>E.coli</i>	G ⁻	BN à 37°C	Pathogène
	<i>E.coli</i>	G ⁻	BN à 37°C	Altération des aliments
	<i>Vibrio sp.</i>	G ⁻	E.P.T à 30°C	Isolée des eaux usées.
	<i>Proteus sp.</i>	G ⁻	B N à 37°C	Pathogène pour l'homme.
Gram⁺	<i>Enterococcus sp.</i>	G ⁺	E.P.T à 37°C	Pathogène pour l'homme
	<i>Micrococcus sp.</i>	G ⁺	30°C	Altération des aliments
	<i>Staphylococcus aureus</i>	G ⁺	E.P.T à 30°C	Médical- pathogène
	<i>Staphylococcus sp. à coagulase (-)</i>	G ⁺	E.P.T à 30°C	Médical - pathogène
	<i>Bacillus sp.</i>	G ⁺	B N à 37°C	Pathogène pour l'homme

II.10.2.2. Revivification des souches lactiques thermophiles

Les souches lactiques, isolées à partir des échantillons du lait cru, purifiées, caractérisées, ont été conservées à une température de +4°C, et réactivées avant leur utilisation, par des transferts successifs, sur des milieux de culture appropriés; le milieu M17 liquide pour les lactocoques et le milieu MRS liquide pour les lactobacilles, incubées à 42°C, pendant 24 h, jusqu'à l'obtention d'un coagulum.

Un volume de, 15ml du milieu gélosé Mueller-Hinton, est coulé dans des boîtes Pétri stériles. Après solidification du milieu, qui sert comme, support d'interaction, un ensemencement, par inondation, en surface du milieu, par la suspension de la souche pathogène, ces dernières, sont gardées à la température ambiante pendant 30 min, environ, pour permettre, une bonne diffusion, des souches cibles, dans la gélose MH (03-05) disques stériles, imbibés du surnageant, obtenu après centrifugation, de milieu de culture de la souche lactique, neutralisé, par solution d'Na OH stérile, ont été déposés aseptiquement sur la gélose MH, déjà inondée par la souche cible (indicatrice), l'incubation a été faite à 37°C, pendant 24h.

L'activité antimicrobienne, se révèle, par l'apparition des zones d'inhibition, autour des disques, l'effet inhibiteur des souches lactiques isolées, a été testé sur la croissance des souches cibles.

Les diamètres des zones d'inhibition, apparaissent autour des disques ont été mesurés, le résultat est positif si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur de 02mm (Tabak et Bensoltane, 2011). La mesure du diamètre d'inhibition Zi; est effectuée selon la formule suivante:

$$\text{Zi en (mm)} = \text{diamètre de la zone d'inhibition obtenu (mm)} - \text{diamètre des disques (6mm)}.$$

II.11. Contrôle physico-chimique du lait cru

Cette analyse a comporté la mesure des paramètres suivants:

II.11.1. Potentiel d'hydrogène (pH)

La valeur du pH, est une mesure de l'activité des ions H⁺. La définition du pH a été donnée en 1904, par le chimiste Sorensen. La valeur du pH, dépende de la température, c'est pourquoi il faut indiquer toujours la température, lors de l'indication d'une valeur donnée du pH. Aujourd'hui, la plupart des pH-mètres, sont équipés d'une unité de mesure de la température, qui permet de compenser l'influence de la température lors de la mesure (Majdi, 2008).

Principe

La mesure du pH du lait, se fait à l'aide d'un pH-mètre (Sboui *et al.*, 2009). La standardisation de l'appareil, est assurée par l'usage de deux solutions tampon à pH 7,01 et 4,00. L'étalonnage se fait systématiquement avant les mesures du pH (Christensen *et al.*, 1991).

Mode opératoire

Les mesures des pH, ont été effectuées par un pH mètre, après un étalonnage, un rinçage de l'électrode, par l'eau distillée, et après chaque mesure d'un volume de (10ml) du lait cru, prélevé dans un bécher de 100 ml (Figure05).



Figure 05: Mesure du pH du lait cru.

II.11.2. Mesure de l'acidité titrable

Principe

L'opération de mesure de l'acidité titrable, consiste à doser l'acide lactique par neutralisation à l'aide d'une solution NaOH N/9, en présence de 02 à 03 gouttes de phénolphtaléine à 05 %

Mode opératoire

Une quantité de 0,4g de Na-OH, est ajoutée à 100 ml d'eau distillée, la burette a été rincée avec la solution du NaOH obtenue. Un volume de 10 ml, a été versé goutte à goutte, dans un bécher, contenant 10ml du lait cru, après, l'ajout de 02 à 03 gouttes de phénolphtaléine, jusqu'à le virage totale de la couleur (rose fushine).

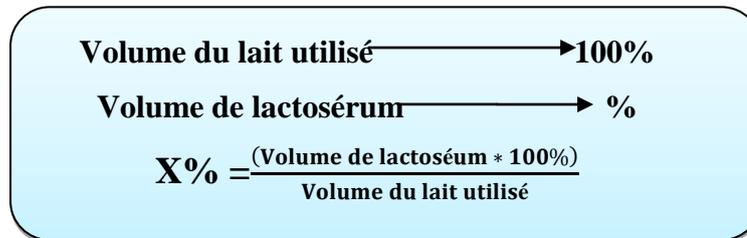
II.11.3. La teneur en lactosérum et en matière insoluble

Principe

La détermination de la teneur en lactosérum du lait cru, a été effectuée par la séparation des deux phases: le culot et le surnageant, et ceci par l'utilisation de l'une des méthodes de séparation les plus utilisées «Centrifugation».

Mode opératoire

Le lactosérum a été obtenu après centrifugation d'un volume du lait cru, dans une centrifugeuse à une vitesse de 3500 rpm, (Rotor;1120), pendant 03h pour assurer une bonne séparation des deux phases, quand la séparation du culot et du lactosérum est terminée, ce dernier a été mesuré. La relation suivante est appliquée pour le calcul du pourcentage, en lactosérum qui en résulte:



II.11.4. La viscosité

La viscosité du lait, est une propriété, complexe; qui est particulièrement affectée par les particules colloïdes, émulsifiées et dissoutes. La teneur en graisse et en caséine, possède l'influence, la plus importante sur la viscosité du lait.

Principe

Elle correspond à la résistance d'un liquide à l'écoulement. Elle est due à la présence des protéines et de matière grasse dans le lait. Elle limite la montée des matières grasses à la surface du lait, diminue lorsque la température augmente et augmente lorsque le pH est inférieur à 6.

Mode opératoire

Après homogénéisation de l'échantillon de lait cru, un volume de 400 ml est versé dans le viscosimètre, placé d'une position verticale pour une mesure exacte.

II.11.5. Conductivité électrique

La conductivité électrique, est la propriété d'un échantillon à transmettre le courant électrique. Elle se mesure en millisiemens par centimètre (mS/cm).

Cette propriété est majoritairement, due aux ions (essentiellement chlorures, phosphates, citrates, carbonates et bicarbonates de potassium, sodium, calcium et magnésium). Ainsi, tout changement de concentration en ions, dans le lait, reflètera une modification de la conductivité électrique du lait (**Mabrook et Petty, 2003**).

Principe

Les électrodes sont dégraissées, avant toute séance de mesures, à l'aide d'un détergent usuel (ex: liquide vaisselle), afin d'éviter tout encrassement ou dépôt de graisse qui pourrait fausser les mesures.

Mode opératoire

Après introduction d'interrupteur, dans un volume de lait cru de 50 ml, préalablement chauffée, jusqu'à 20°C. On procède, par la suite, à l'enregistrement de la valeur affichée par le conductimètre, après chaque mesure, on rince l'électrode (Figure 06).



Figure 06: Mesure de la conductivité électrique du lait cru.

II.11.6. Détermination de la teneur en azote et protéines totales

C'est une méthode de référence, introduite par Kjeldhal en 1883, pour déterminer la quantité de protéines dans les produits laitiers (**AOAC, 920,105, fédération internationale de laiterie (FIL) 20B; 1993**).

Principe

Le dosage de l'azote total; s'effectue en trois étapes; La minéralisation, la distillation et le titrage. Avant la prise d'essai, l'échantillon du lait cru est bien homogénéisé par agitation manuelle.

Mode opératoire

La minéralisation

Vise à convertir la totalité de l'azote organique en ions ammonium (NH_4^+). Après introduction de 05ml du lait cru, dans chaque matras, on ajoute (02g) d'Oxalate de potassium un catalyseur- pour accélérer la dégradation de la matière organique par l'acide sulfurique-, et (10g) de sulfate de potassium- pour augmenter le point d'ébullition de l'acide sulfurique-. A ces deux derniers composés, 20 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4) est additionné; ayant pour but de dégrader la matière organique présente dans les échantillons.



N.B: Tous les produits chimiques employés sont exempts d'ammoniaque.

Les matras sont placés sur le dispositif du minéralisateur, avec un aspirateur, pour absorber les vapeurs. Le chauffage est augmenté doucement, en plusieurs étapes jusqu'à l'arrivé à la température 390°C , pour une minéralisation totale.

Les matras sont laissées refroidir, à la température ambiante, pour assurer la sortie de toutes les vapeurs pendant 30 min environ.

La distillation

Un erlenmeyer contenant, 15 ml de la solution d'acide borique (H_3BO_3) 4%– 1000 ml de la solution d'acide borique contient 10ml de la solution alcoolique de rouge de méthyle 0,05% - est placé sur la plateforme de réception pour, piéger l'ammoniac (NH_3). Ce dernier est alors entraîné par un courant de vapeur en ajoutent 70ml de la soude, qu'on fait barboter dans l'erlenmeyer. Après 5 min, l'indicateur contenu dans l'erlenmeyer vire à sa teinte alcaline jaune.



Le titrage

La solution obtenue dans l'erlenmeyer, est ensuite titrée avec une solution standard (acide sulfurique 0,1N) jusqu'à l'apparition de la couleur rose.

On note le volume d'acide sulfurique versé.



N.B: Dans chaque série de dosage, un essai de contrôle doit être inclus.

La teneur en azote total, exprimée en grammes d'azote pour 1000ml de lait est calculée selon la formule suivante :

$$A_t = \frac{n \cdot 1,4}{\text{Volume du lait utilisé}}$$

Par convention, le résultat peut être exprimé en protéines du lait, en multipliant le chiffre d'azote total par le coefficient 6,38.

II.11.7. Mesure de la densité

La densité du lait est exprimée, par le rapport du poids d'un volume de lait à une température donnée, sur le poids d'un volume identique d'eau à 20°C. Cette masse résulte des diverses densités des constituants du lait; eau, matière grasse, protéines, sucres,...etc. La quantité de ces différents constituants, n'étant pas constante, la densité du lait est donc variable. Mais La méthode la plus rapide pour cette détermination est celle basée sur l'utilisation d'un thermo-lactodensimètre étalonné à 20°C (Pirisi, 1994; Pointurier, 2003).

Principe

La mesure de la densité du lait sert à l'étude de mouillage du lait. Le contrôle de la densité, est un test simple, qui permet de vérifier que le lait n'a pas été mouillé (dilué avec de l'eau) (**Majdi, 2008**).

Mode opératoire

Après homogénéisation d'un échantillon du lait cru, on verse lentement l'échantillon dans une éprouvette de 250 ml, en évitant la formation de mousse. On plonge le lacto-densimètre, avec un moment de rotation, on attend sa stabilité. La lecture de la valeur de densité, se fait au bord supérieur de lacto-densimètre.



**RÉSULTATS
ET DISCUSSION**

I. Résultats:

I.1. Contrôle de qualité des échantillons du lait cru:

Les risques microbiologiques du lait cru collecté, provenant des 03 espèces animales (vache, brebis, chèvre), ont été évalués quantitativement; par des dénombrements des différents groupes microbiens (la flore aérobie mésophile totale, Coliformes totaux, fécaux, et les Streptocoques fécaux) et qualitativement sur la base des caractéristiques de ces groupes microbiens (production d'urée- indole et formation des spores). Les résultats de ces analyses microbiologiques ont été représentés dans le tableau 11 et les figures 07, 08:

Tableau 11: Résultats de contrôle de la qualité microbiologique des 13 échantillons des laits crus.

Germes recherchés		FAMT (UFC/ml)	Coliformes totaux (UFT/ml)	Coliformes fécaux (UFC/ml)	Flore indologène	CSR	Streptocoques fécaux. (UFT/ml)	<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/ml)
Echantillons								
caprine	Ch2	03.10 ⁵	09	00	-	-	150	IN
	Ch3	02.10 ⁵	150	00	-	-	150	IN
	Ch4	05.10 ⁵	09	IN	-	-	15	IN
	Ch5	10 ⁵	25	IN	+	-	07	00
	Ch6	10 ⁵	150	IN	+	-	150	IN
bovine	V1	11.10 ⁵	00	00	-	-	15	1,22.10 ²
	V2	37.10 ⁵	45	00	-	-	15	IN
	V5	10 ⁵	250	IN	-	-	15	IN
	V6	00	00	00	-	-	15	9,92.10 ²
ovine	B2	11,2.10 ⁶	45	IN	-	-	15	IN
	B3	11,5.10 ⁶	150	IN	-	+	15	IN
	B4	00	45	IN	-	-	15	IN
	B5	10 ⁵	09	00	-	-	15	IN

IN: Indénombrable. **+**: Présence. **-**: Absence. **UFC/ml:** unité formant colonies. **UFT/ml:** unité formant trouble. **CSR:** Clostridium sulfito réducteur. **Ch:** chèvre. **V:** vache. **B:** brebis.

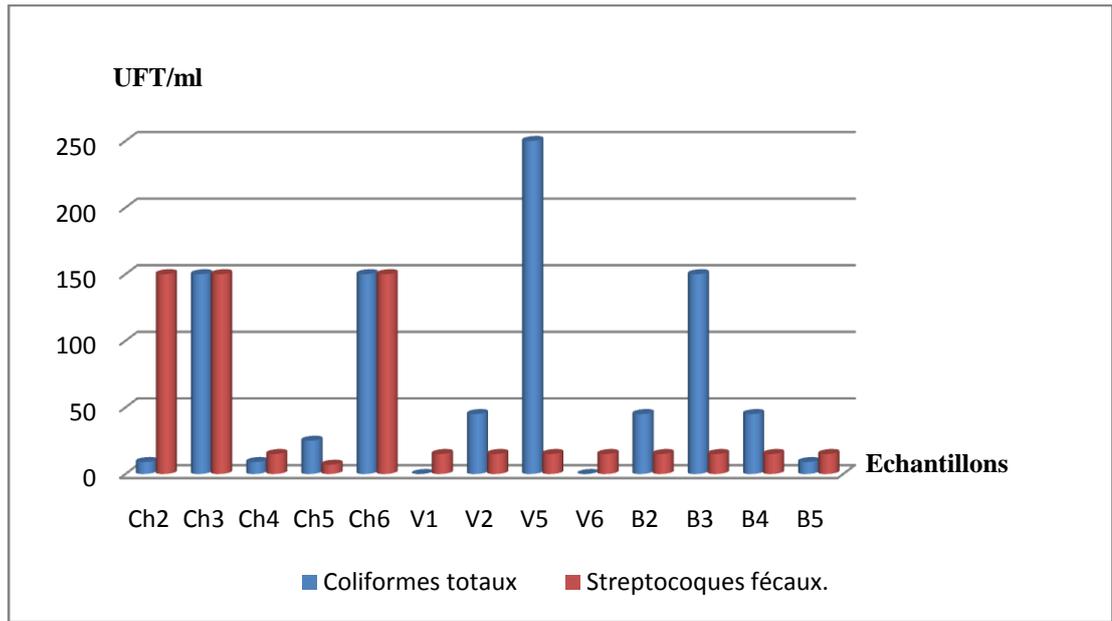


Figure 07: Variations des valeurs en UFT/ml, des germes dénombrés (Coliformes totaux et Streptocoques fécaux), dans les échantillons du lait cru.

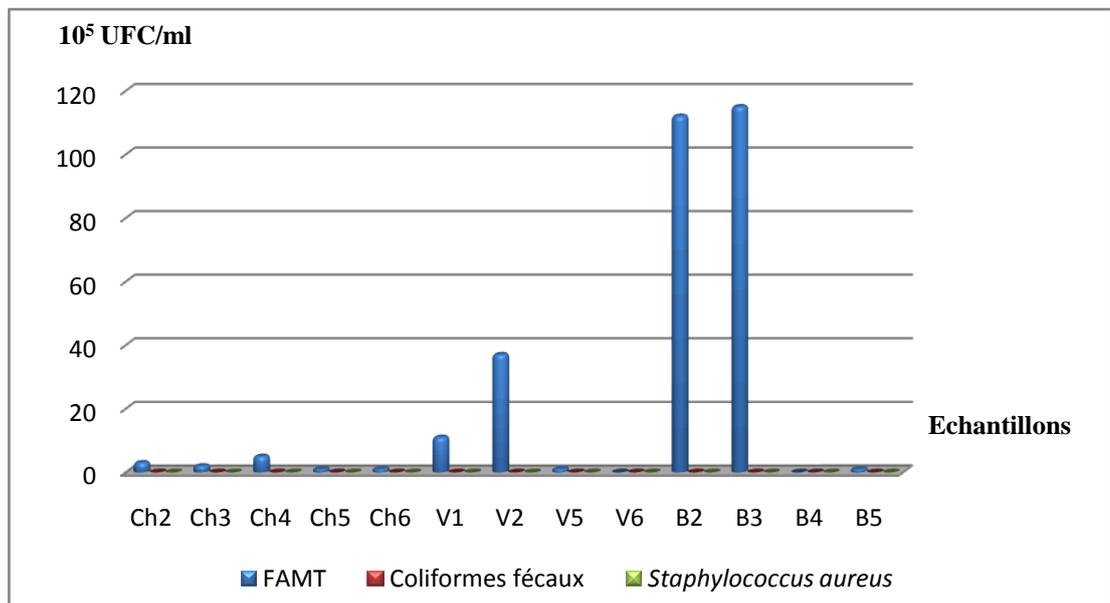


Figure 08: Variations des valeurs en UFC/ml, des germes dénombrés (FAMT, Coliformes fécaux et *Staphylococcus aureus*), dans les échantillons du lait cru.

I.1.1. La flore aérobie mésophile totale

Les laits crus examinés, contiennent une charge variable de la FMAT, située entre **00** (V6 et B4) et **11,5.10⁶** (B3) UFC/ml.

I.1.2. Coliformes totaux et coliformes fécaux

a. Coliformes totaux

Le résultat positif, se traduit par un dégagement de gaz dans la cloche ou changement de couleur (mauve → vert → jaune), formation de troubles dans le tube (voir Figure en annexe 02).

Les résultats présentent, des différences du nombre de ces microorganismes, entre les laits crus provenant des trois espèces laitières. L'échantillon **V5** s'est trouvé le plus chargé, avec une valeur de **250 UFT/ml**, tandis que les échantillons **V1** et **V6** ont marqués une absence de ce germe (**00 UFT/ml**).

b. Coliformes fécaux

Les résultats relatifs aux examens macroscopiques, lors des dénombrements, ont montré des colonies sur gélose VRBL (Voir composition de ce milieu en annexe 01), sous formes rondes, de petites tailles, et de couleur rouges foncées ou violettes (Voir figure en annexe 02).

Pour les coliformes fécaux, on a enregistré des boites indénombrable dans les échantillons (**Ch4, Ch5, Ch6, V5, B2, et B3**), par contre, dans les échantillons (**Ch2, Ch3, V1, V2, V6, et B5**), des boites stériles ont été trouvées.

I.1.3. Germes indologènes

Le résultat positif, se traduit par la formation d'un anneau rouge, avec le réactif de Kovacs. Sur l'ensemble des échantillons du lait cru, deux échantillons provenant de l'espèce caprine (**Ch5 et Ch6**), renferme cette flore indologène (Voir figure en annexe 02).

I.1.4. Clostridium Sulfito-Réducteurs (CSR)

Après 24h d'incubation sur milieu Gélose viande foie (VF), on a enregistré un seul résultat positif, dans le lait de brebis (**B3**), après ce temps, la gélose a été envahi par les spores (Voir Figure en annexe 02).

I.1.5. Streptocoques fécaux

Le résultat positif se traduit par la présence de trouble dans les tubesensemencé (Voir figure en annexe 02). Ils présentent des différences du nombre de ces microorganismes, sur la totalité des échantillons, l'échantillon **Ch5**, s'est trouvé le moins chargé avec une valeur de (**07 UFT/ml**) que la plus part des échantillons qui ont enregistré la valeur de (**150 UFT/ml**).

I.1.6. *Staphylococcus aureus*

a. Test présomptif

Les tubes Giolliti Cantoni, présentant des troubles, ont été considérés comme des tubes positifs.

b. Test confirmatif

La grande majorité des échantillons de lait cru, représente une nappe de petites colonies des *staphylococcus aureus* sur le milieu Chapman Stone, avec une pigmentation rose ou jaune pour certaines boites.

I.2. Résultats d'isolement des bactéries lactiques

I.2.1. Evaluation de la charge des bactéries lactiques

Le dénombrement des bactéries lactiques a été effectué sur un compteur de colonie. Les résultats obtenus sont, illustrés dans le tableau suivant et les figures 09, 10:

Tableau12:Dénombrements des charges en bactéries lactiques thermophiles et mésophiles pour chaque échantillon.

Conditions de cultures		Milieux de culture			
		MRS		M17	
Echantillons		T°C d'incubation			
		37°C	42°C	37°C	42°C
Vache	V1	6,9.10 ⁴ UFC/ml	2,24.10 ⁴ UFC/ml	2.10 ³ UFC/ml	5,34.10 ⁶ UFC/ml
	V5	0	0	0UFC/ml	0UFC/ml
	V6	7.10 ³ UFC/ml	4,6.10 ² UFC/ml	2.10 ² UFC/ml	2.10 ³ UFC/ml
	V7	IN	IN	10 ⁶ UFC/ml	10 ⁶ UFC/ml
	V8	10 ⁵	3.10 ⁴ UFC/ml	0 UFC/ml	10 ³ UFC/ml
	V9	1,2.10 ⁴ UFC/ml	3.10 ² UFC/ml	4.10 ⁴ UFC/ml	8,61.10 ⁵ UFC/ml
Chèvre	Ch2	4,2.10 ⁴ UFC/ml	3,45.10 ³ UFC/ml	0UFC/ml	0UFC/ml
	Ch3	IN	IN	10 ³ UFC/ml	2.10 ³ UFC/ml
	Ch4	00 UFC/ml	00 UFC/ml	0 UFC/ml	1,7.10 ² UFC/ml
	Ch5	10 ² UFC/ml	2 10 ² UFC/ml	10 ² UFC/ml	1,5.10 ² UFC/ml
	Ch6	5,1.10 ² UFC/ml	7,74.10 ² UFC/ml	0 UFC/ml	10 ³ UFC/ml
	Ch8	120	8.10 ² UFC/ml	0 UFC/ml	0 UFC/ml
	Ch9	10 ² UFC/ml	6,94 10 ² UFC/ml	1,1.10 ² UFC/ml	9.10 ² UFC/ml
	Ch10	9. 10 ³ UFC/ml	6,36.10 ³ UFC/ml	2.10 ³ UFC/ml	4.10 ⁴ UFC/ml
	Ch11	8,45.10 ⁴ UFC/ml	6,56.10 ³ UFC/ml	3.10 ⁴ UFC/ml	5,5.10 ⁴ UFC/ml
	Brebis	B1	6,32.10 ² UFC/ml	6,65.10 ² UFC/ml	2.10 ² UFC/ml
B3		3,8.10 ² UFC/ml	5,7.10 ² UFC/ml	0 UFC/ml	0 UFC/ml
B4		IN	IN	10 ⁵ UFC/ml	10 ⁶ UFC/ml
B5		4,7 10 ² UFC/ml	6,52 10 ² UFC/ml	1,2.10 ² UFC/ml	7.10 ² UFC/ml
B6		IN	IN	10 ⁴ UFC/ml	2,1.10 ³ UFC/ml
Beurre	El ache	10 ² UFC/ml	60 UFC/ml	IN UFC/ml	IN UFC/ml

UFC/ml: Unité Formant Colonie par millilitre. T°C: Température d'incubation IN: Indénombrable.
V: vache Ch: chèvre. B: brebis.

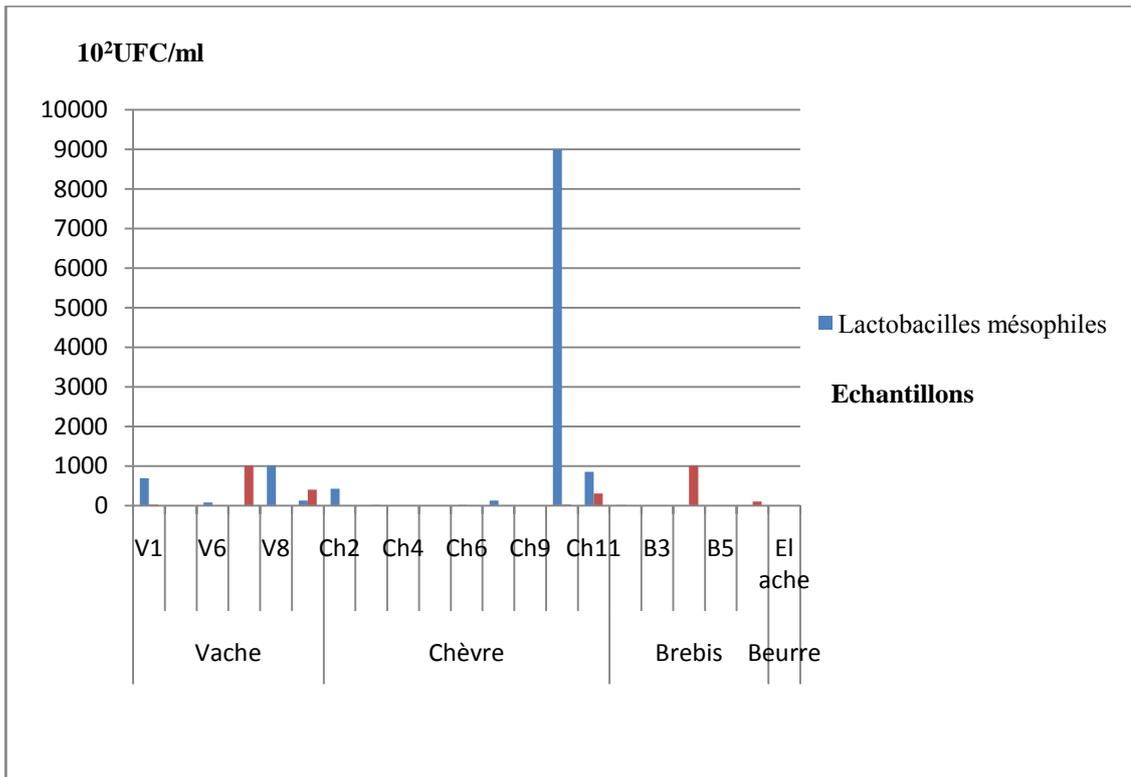


Figure 09: Variations des valeurs en UFC/ml, des lactobacilles et lactocoques mésophiles.

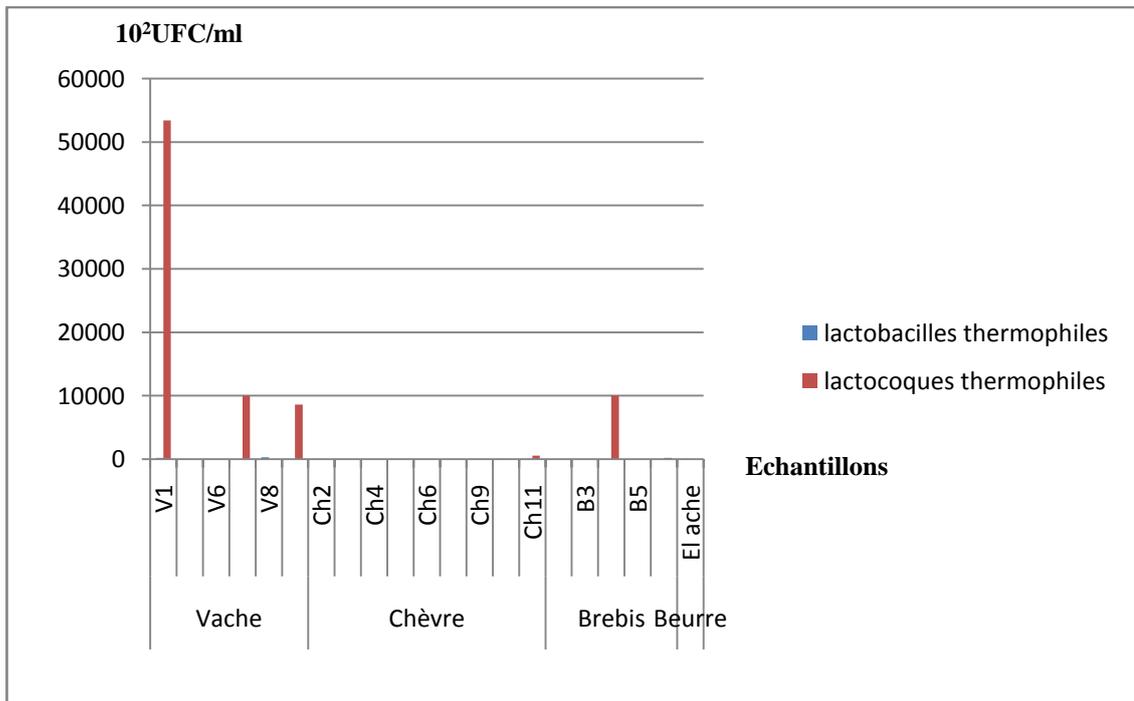


Figure 10: Variations des valeurs en UFC/ml, des lactobacilles et lactocoques thermophiles

I.2.2. Aspect macroscopiques des bactéries lactiques

a. Les lactobacilles thermophiles

Les colonies de Lactobacilles, sur gélose MRS, sont apparues, sous forme de grain de blé, bien isolées à pourtour régulier et de couleur brunâtre (Figure 11).

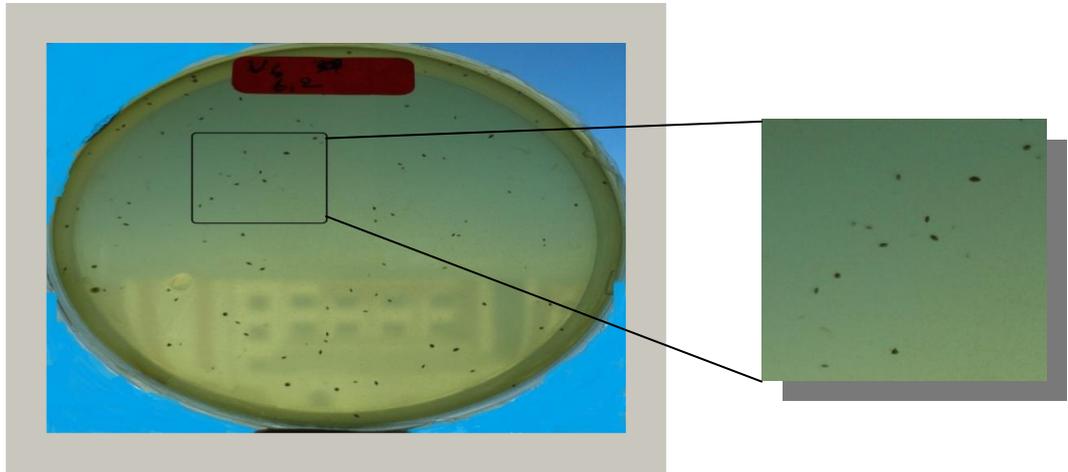


Figure 11: Aspect macroscopique des colonies Lactobacilles thermophiles sur milieu MRS après incubation de 48h à 44°C.

b. Les lactocoques thermophiles (*Streptococcus thermophilus*)

Les colonies des Lactocoques thermophiles, isolées sur gélose M17, sont apparues de petite taille, de forme circulaire ou lenticulaire, bien isolées, à pourtour régulier et de couleur blanchâtre (Figure 12).

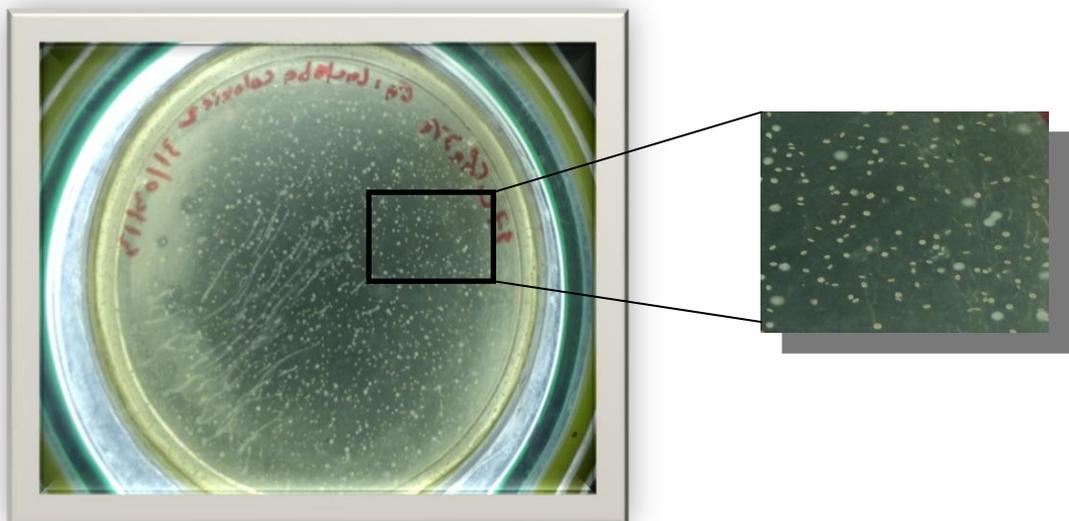


Figure 12: Aspect macroscopique des colonies lacocoques thermophiles sur milieu M17 après incubation de 48h à 44°C.

I.2.3. Aspect microscopiques des bactéries lactiques

L'observation microscopique, a révélée une seule forme de cellules qui, est la forme coque ou bacille. Ces formes sont disposées en paires ou en chaînettes plus ou moins longues.

I.2.3.1. Observation à l'état frais

L'observation à l'état frais entre lame et lamelle, a permet de confirmer la viabilité, l'immobilité des bactéries lactiques isolées (Figure 13).

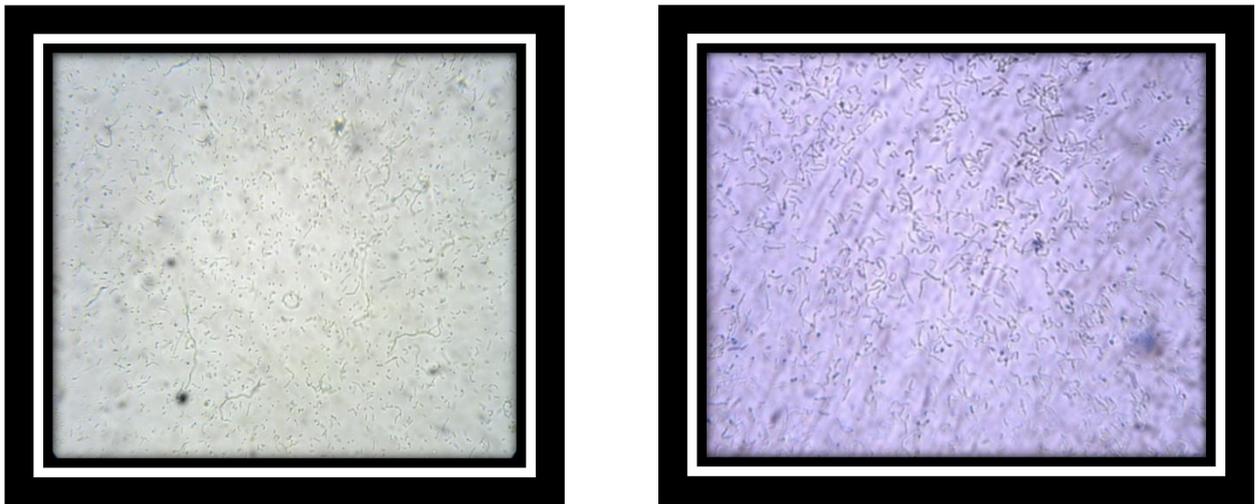


Figure 13: Aspect microscopique des lactobacilles et les lactocoques à l'état frais (G×40).

I.2.3.2. Coloration au bleu de méthylène

L'observation des frottis à l'état frais, a permet d'apprécier la morphologie des bactéries. Les figures suivantes représentent les deux formes (bacille et coque) (Figure 14).

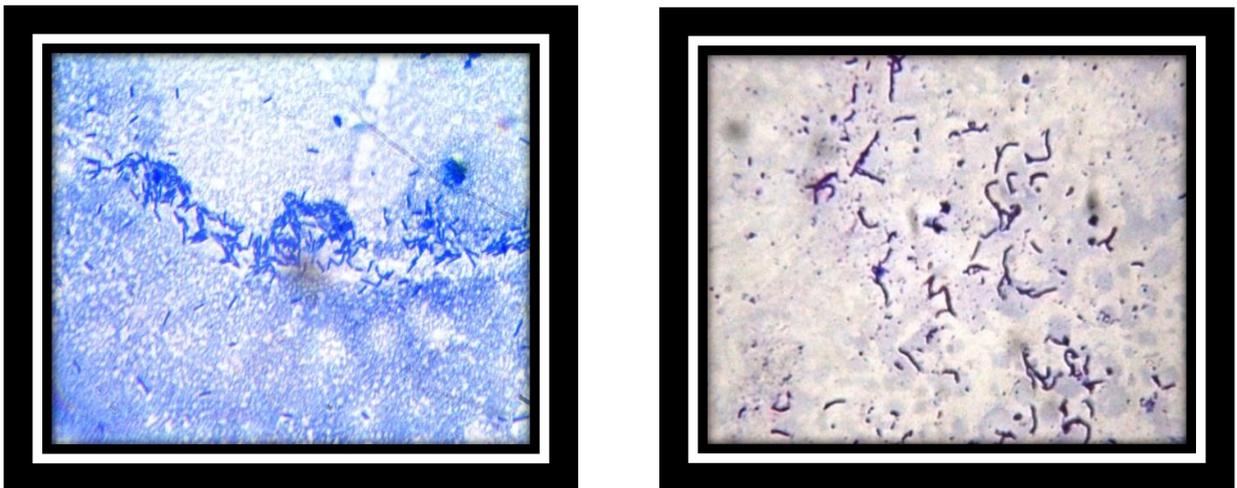


Figure 14: Vue microscopique des Lactobacille et les lactocoques (bleu de méthylène) (Gx40).

I.2.3.3. Coloration de Gram

L'observation sous microscope après coloration de Gram, indique qu'il s'agit des bacilles et des coques bien apparents, à paroi Gram positif (Figure 15).

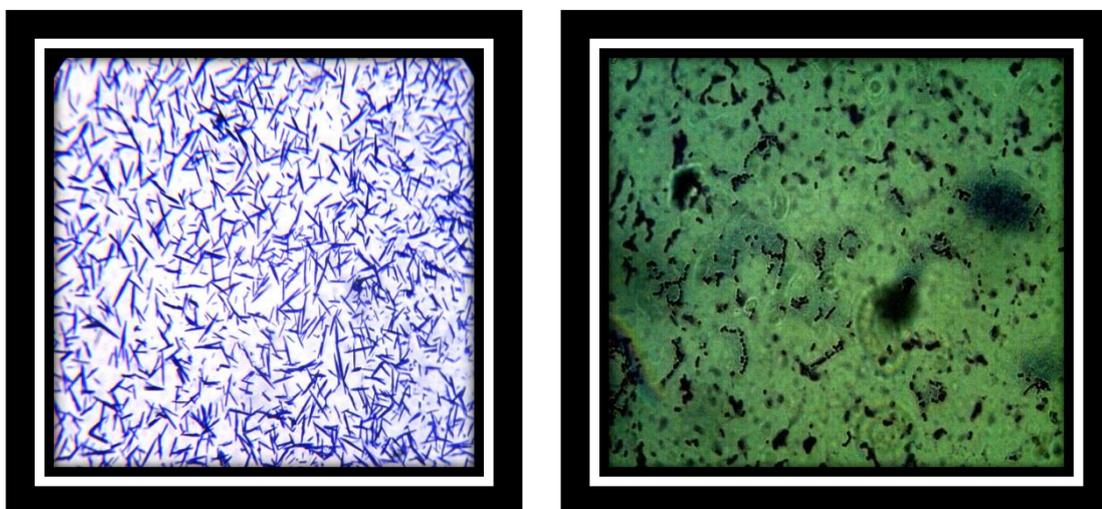
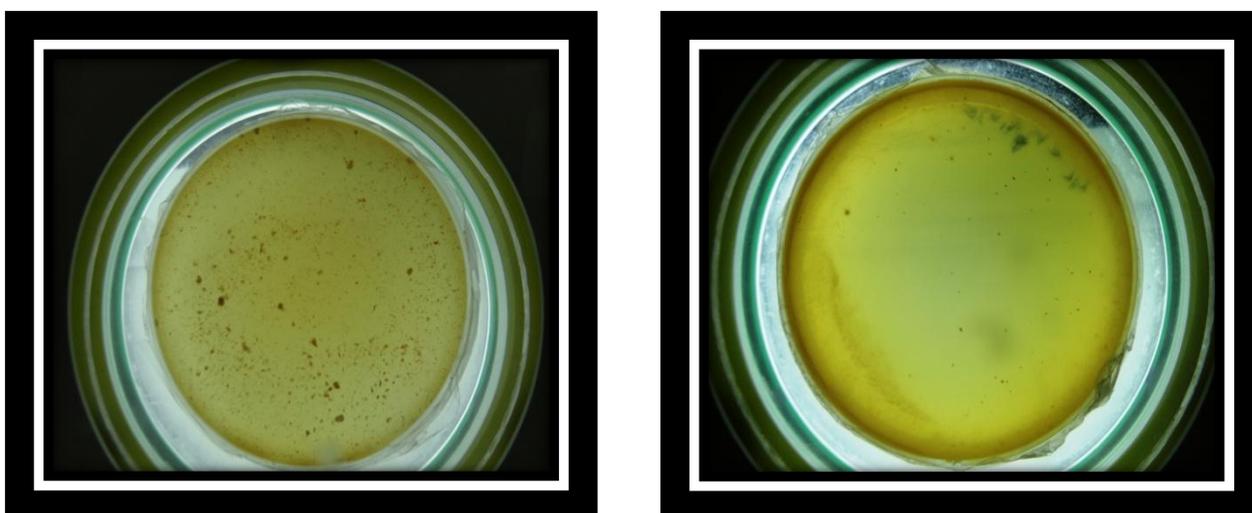


Figure 15: Aspect des Lactobacilles et des Lactocoques à la coloration de Gram (G×40).

I.3. Purification des souches lactiques thermophiles

Après des séries de purification, successives, des colonies des Lactobacilles thermophiles, ont été obtenues, par séries d'ensemencement, en masse (Figure 16), sur MRS. Les colonies des lactocoques, (en stries), ont été obtenues (Figure 17, 18), à 42°C, sur milieu M17.



1^{er} repiquage

2^{ème} repiquage

Figure 16: Aspects des colonies Lactobacilles thermophiles après séries de purification sur MRS.

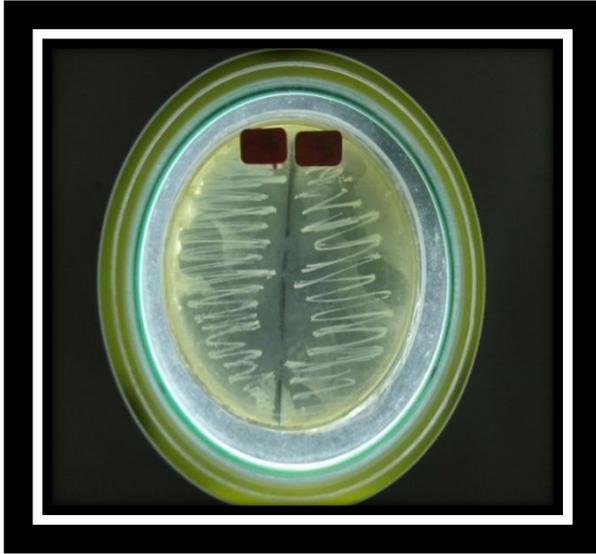


Figure 17: Repiquage sur milieu gélosé M17 des bactéries thermophilles. 1^{er} repiquage

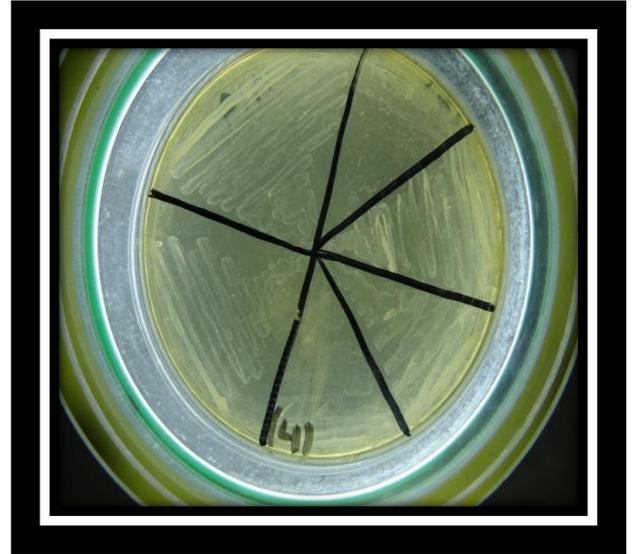


Figure 18: Aspect des colonies après purification sur milieu gélosé M17 des bactéries thermophilles: 4^{ème} repiquage.



Passant par le 2^{ème} et le 3^{ème}
Repiquage.

I.4. L'identification biochimique

Tableau 13: Résultats des différents tests biochimiques et physiologiques réalisées.

Souches lactiques		Lactobacilles thermophiles					<i>Streptococcus thermophilus</i>				
		Lb1	Lb2	Lb3	Lb4	Lb5	St1	St2	St3	St4	St5
Tests											
Gram		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Catalase		(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Oxydase		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Nitrate réductase		(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Type fermentaire		HFM	HF M	HF M	HF M	HF M	HF M	HF M	HF M	HF M	HF M
TSI	H₂S	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Gaz	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
	Fermentation des sucres	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Mannitol mobilité		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Citrate de Simmons		(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Production d'indole		(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Uréase et du tryptophane désaminase		(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Lysine décarboxylase: (LDC)		(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Ornithine décarboxylase: (ODC)		(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Arginine déshydrogénase: (ADH)		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Croissance à différentes températures		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Détermination du pH optimum:		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Croissance sur milieu à différentes concentrations de NaCl		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Activité protéolytique		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)

(+): Réaction positive.(-): Réaction négative.**HFM**:Homofermentaire.

I.5. Caractérisation technologique des souches lactiques

Cinétique d'acidification par mesure des pH et titrage d'acidité en °D

D'après les résultats, nous remarquons que la totalité des bactéries lactiques identifiées, présentent une acidification du lait écrémé reconstitué, par production progressive d'acide lactique. Cette dernière est accompagnée d'un abaissement du pH du milieu.

5.1. Mesure de pH

Les résultats chiffrés de l'évolution du pH des échantillons du LER sont résumés dans les tableaux, et les figures suivantes:

Tableau 14: Valeurs du Suivi de la cinétique d'acidification (pH) du LER pendant 24h d'incubation à 42°C, par des souches lactiques (SCh) isolées du lait d'espèce caprine.

Souches Temps (h)	SLP	SCh1	SCh2	SCh3	SCh4	SCh5	SCh6	SCh7	SCh8	SCh 9
4	6,90	6,81	6,87	6,51	5,81	5,98	6,10	6,30	5,91	5,94
6	6,89	6,82	6,88	5,70	5,43	5,50	5,92	6,10	5,30	5,77
16	4,80	4,75	6,17	4,40	5,48	4,63	5,20	5,06	4,89	5,70
24	4,32	4,51	4,31	4,29	3,65	4,16	3,74	3,84	4,00	4,12

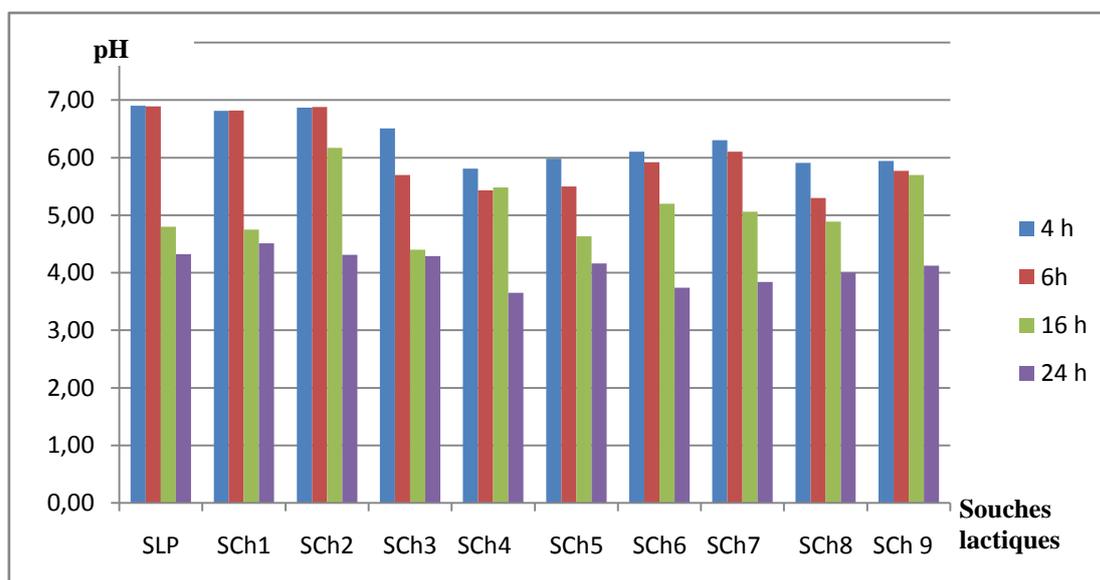


Figure 19: Histogramme représentatif de la cinétique d'acidification (pH) pendant 24h.

Après 24h d'incubation à 42°C, trois souches (**Ch4**, **Ch6** et **Ch7**), ont exhibées un pouvoir acidifiant (avec **3,65**; **3,74** et **3,84** respectivement), nettement plus élevés que la souche de référence (**4,32**).

Tableau 15: Valeurs du Suivi de la cinétique d'acidification (pH) du LER pendant 24h d'incubation à 42°C, par des souches lactiques (SV et S beurre); isolées du lait d'espèce Bovine

Souches Temps (h)	SLP	SV1	SV2	SV3	SV4	SV5	SV6	SV7	Sv8	S beurre
4	6,90	6,56	6,92	6,73	6,92	6,31	6,10	6,10	6,01	6,51
6	6,89	6,53	6,89	6,50	6,83	5,65	5,60	5,80	5,90	5,50
16	4,80	5,86	4,67	5,41	5,83	5,61	5,53	5,55	4,91	4,77
24	4,32	5,98	4,59	5,09	5,30	3,70	4,66	3,74	3,58	6,10

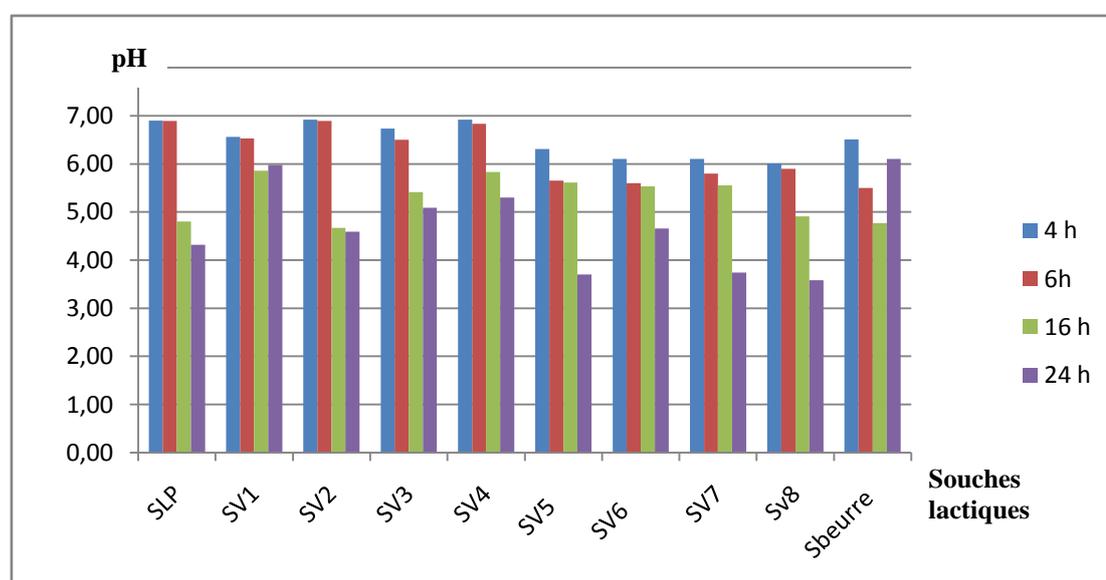


Figure 20: Histogramme représentatif de la cinétique d'acidification (pH) pendant 24h, par les. Souches SV et S beurre.

Après 24h d'incubation à 42°C, trois souches (**SV5**, **SV7** et **SV8**), ont exhibées un pouvoir acidifiant (avec des valeurs du pH:**3,70**; **3,74** et **3,58** respectivement), nettement plus élevés que la valeur du pH donnée par la souche de référence (**4,32**).

Tableau 16: Valeurs du suivi de la cinétique d'acidification (pH) du LER pendant 24h d'incubation à 42°C, par des souches lactiques (SB); isolées du lait d'espèce Ovine.

Souches Temps (h)	SLP	SB1	SB2	SB3	SB4	SB5	SB6
4	6,90	6,87	6,77	6,66	6,10	6,20	6,00
6	6,89	6,71	6,76	6,48	5,40	5,20	5,50
16	4,80	5,70	6,21	5,93	4,88	5,07	5,30
24	4,32	5,64	5,59	5,66	4,04	3,96	4,26

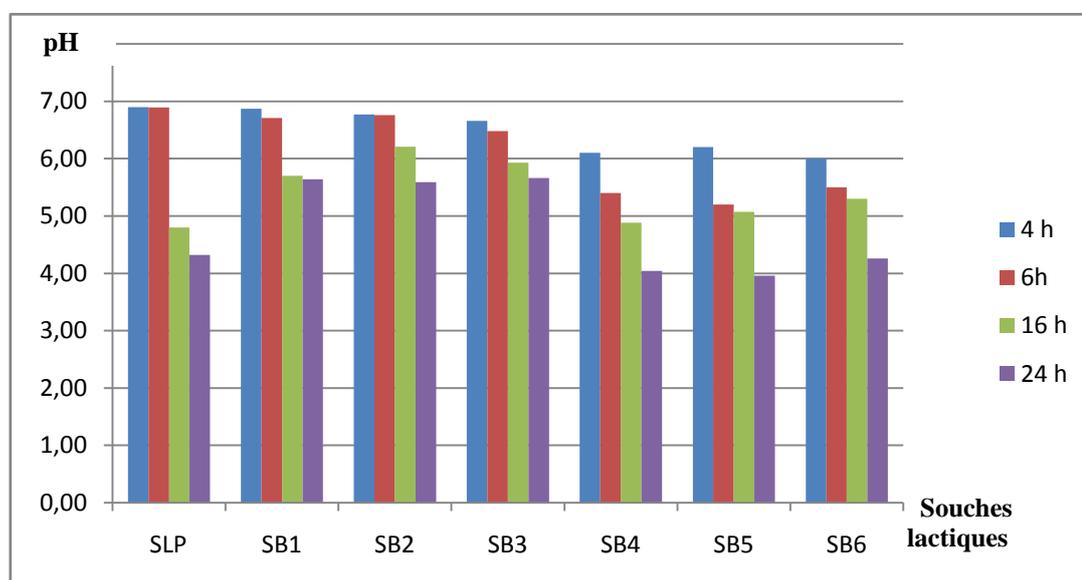


Figure 21: Histogramme représentatif de la cinétique d'acidification (pH) pendant 24h, par les souches SB.

Après une incubation de 24h à 42°C, trois souches (SB5, SB4 et SB6), ont montrées un pouvoir acidifiant du LER (avec des valeurs du pH respectivement: 3,96; 4,04 et 4,26), donnant ainsi un profil technologique plus acidifiant que la valeur du pH donnée par la souche de référence (4,32).

5.2. Mesure d'acidité en degré Dornic

Les résultats de la cinétique d'acidification du LER, par titrage d'acide lactique, en degré Dornic (°D), obtenus à des intervalles du temps (4h, 6h, 16h et 24h) par les différentes souches lactiques, sont illustrés par les tableaux et les figures suivantes:

Tableau 17: Valeurs du suivi de la cinétique d'acidification en degré Dornic (°D) du LER pendant 24h d'incubation à 42°C, par des souches lactiques (SCh); isolées du lait d'espèce Caprine.

Souches Temps (h)	SLP	SCh1	SCh2	SCh3	SCh4	SCh5	SCh6	SCh7	SCh8	SCh 9
4	34,30	34,30	34,30	43,12	39,85	35,20	32,66	25,48	35,20	33,32
6	60,76	25,48	25,48	51,94	42,46	39,20	41,81	39,20	36,58	43,12
16	78,59	87,22	43,12	88,20	61,41	71,86	67,29	68,60	83,62	45,08
24	113,480	87,220	104,760	87,220	124,130	102,570	133,930	99,300	109,100	90,810

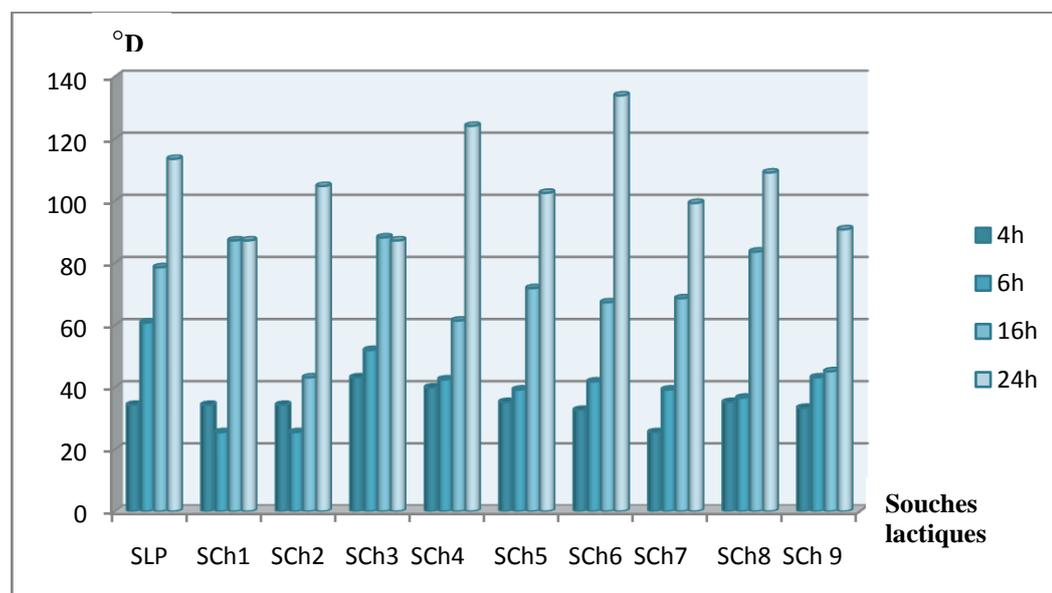


Figure 22: Histogramme représentatif de la cinétique d'acidification en degré Dornic (°D) pendant 24h d'incubation à 42°C, par les souches lactiques thermophiles SCh.

Après 24h d'incubation à 42°C, les souches (**SCh4**, **SCh6** et **SCh8**), ont produit respectivement les valeurs (**124,130**; **133,930** et **109,100**), nettement supérieures à celle produites par la souche industrielle **SLP**.

Tableau 18: Valeurs du suivi de la cinétique d'acidification en degré Dornic (°D) du LER pendant 24h d'incubation à 42°C, par des souches lactiques (SV et S.beurre); isolées du lait d'espèce Bovine.

Souches Temps (h)	SLP	SV1	SV2	SV3	SV4	SV5	SV6	SV7	SV8	S.beur
4	34,30	43,12	34,30	34,30	25,48	28,09	34,30	30,70	34,30	34,30
6	60,76	25,48	34,30	43,12	34,30	42,46	45,73	41,16	35,28	34,30
16	78,59	69,58	87,22	60,00	51,94	62,06	53,57	59,45	68,60	87,22
24	113,48	43,12	87,22	78,59	78,59	138,50	58,14	124,78	152,22	43,12

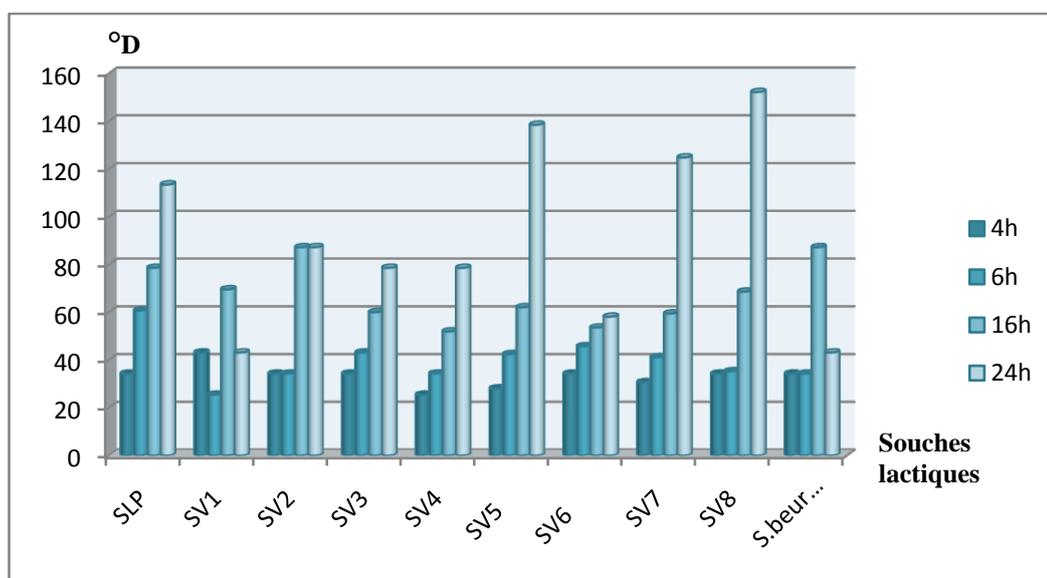


Figure 23: Histogramme représentatif de la cinétique d'acidification en degré Dornic (°D) pendant 24h d'incubation à 42°C, par les souches lactiques thermophiles SV et S.beur.

Les valeurs du suivi de la cinétique enregistrées par les 03 souches (SV8, SV5 et SV7) respectivement de (152,22; 138,50 et 124,78) nettement écartée de la valeur enregistrée par la souche SLP.

Tableau 19: Valeurs du Suivi de la cinétique d'acidification en degré Dornic(°D) du LER pendant 24h d'incubation à 42°C, par des souches lactiques (SB); isolées du lait d'espèce ovine.

Souches Temps (h)	SLP	SB1	SB2	SB3	SB4	SB5	SB6
4	34,30	34,30	51,94	34,30	26,78	29,40	32,66
6	60,76	25,48	25,48	34,30	45,08	48,34	45,73
16	78,59	43,12	34,43	43,12	71,21	77,09	49,00
24	113,48	69,58	69,58	60,62	98,65	108,45	87,54

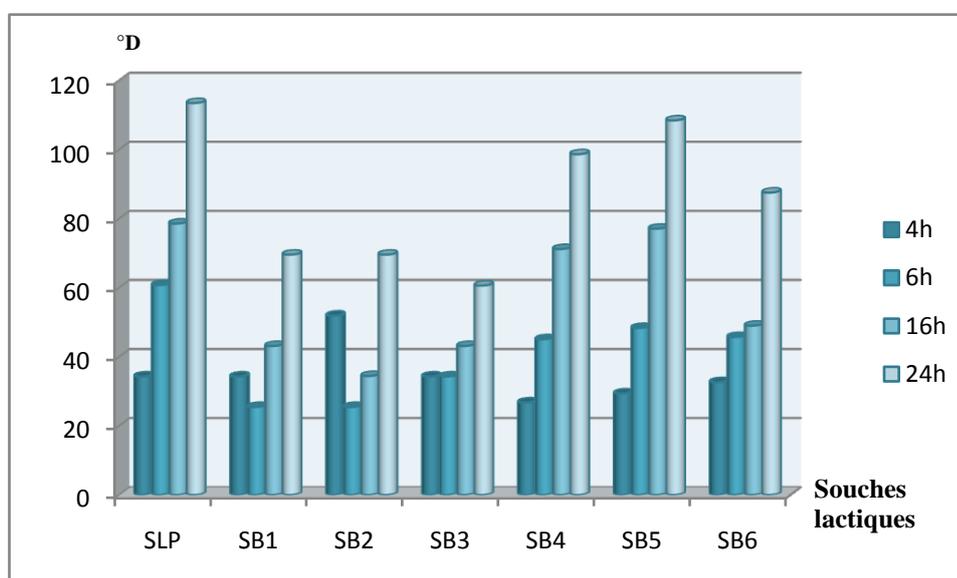


Figure 24: Histogramme représentatif de la cinétique d'acidification en degré Dornic (°D) pendant 24h d'incubation à 42°C, par les souches lactiques thermophiles SB.

Tandis que la souche de référence SLP à enregistrée une valeur de 113,480 °D, au bout de 24h d'incubation à 42°C, les souches lactiques isolé du lait de brebis, ont enregistrées les valeurs (108,450; 98,650 et 87,540), pour (SB5, SB4 et SB6 respectivement, la souche SB5, seul a montrée un profil acidifiant proche de celui de la souche de référence.

I.6. L'antibiogramme

Les résultats obtenus du test d'antibiogramme des souches étudiés vis-à-vis des antibiotiques sont représentés dans le tableau 20 et la figure 24:

Tableau 20: Résultat de l'antibiogramme (Résistance et Sensible) des souches lactiques étudiées vis-à-vis des ATB.

Souches lactiques Disques d'ATB	<i>Lb1</i>	<i>Lb2</i>	<i>St1</i>	<i>St2</i>	<i>St3</i>
Ntx30	R	S	S	S	S
E15	R	S	R	S	S
Ak10	S	S	R	R	S
Do 30	S	S	R	S	S
AMC 30	R	S	R	S	S
Sp100	R	S	R	S	S
IMP 10	R	S	R	S	S

S: sensible. **R:** Résistance.

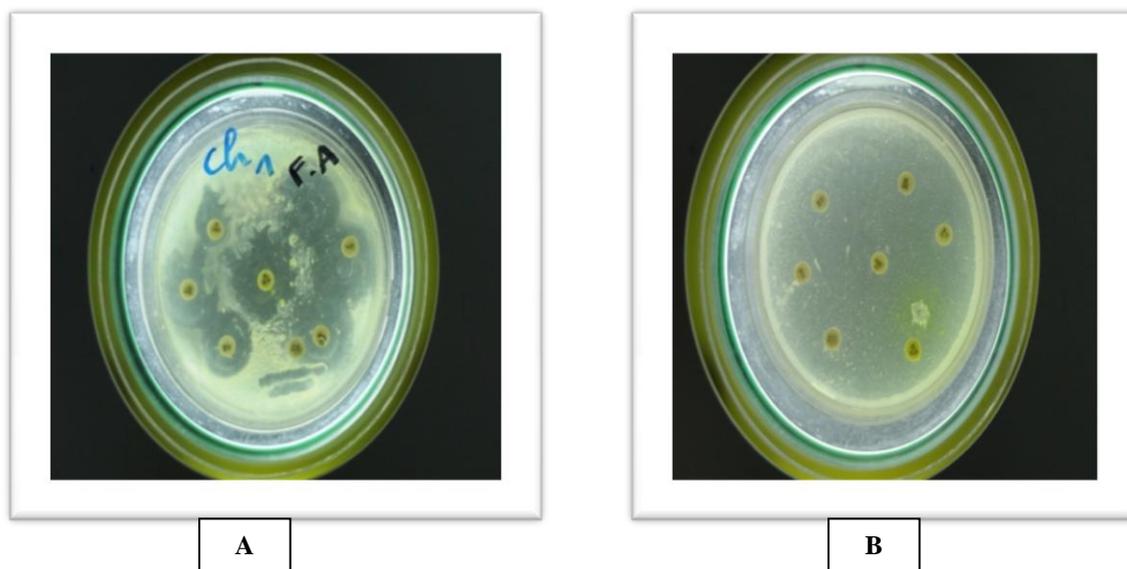


Figure 25: La résistance et la sensibilité des souches lactiques vis-à-vis des antibiotiques.

A: *Streptococcus thermophilus* **B:** *Lactobacillus thermophilus*

Sur l'ensemble des souches lactiques, la souche *St1*, isolée, du lait de chèvre, était la plus résistante aux ATB, suivie par la souche *Lb1* isolée du lait de brebis, le reste des souches lactiques (*St3* et *Lb2*) étaient sensibles à tous les gammes d'ATB testés, à l'exception de la souche *St2*.

I.7. Interaction entre les souches lactiques et les eucaryotes et les procaryotes pathogènes et phytopathogènes

Les résultats des antagonismes des souches lactiques étudiées vis-à-vis des souches pathogènes et phytopathogènes sont illustrés dans le tableau 21 et les figures (26-34):

Tableau 21: Illustratif des diamètres des zones d'inhibition obtenus après interactions sur gélose MH.

Souches lactiques			Le diamètre de la zone d'inhibition en millimètre (mm).										
			<i>Lactobacillus sp.</i>					<i>Streptococcus sp.</i>					
			<i>Lb1</i>	<i>Lb2</i>	<i>Lb3</i>	<i>Lb4</i>	<i>Lb5</i>	<i>St1</i>	<i>St2</i>	<i>St3</i>	<i>St4</i>	<i>St5</i>	
La flore Eucaryote	Levures	<i>Candida albicans</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	08	12	09	09	10	
		<i>Saccharomyces cerevisia</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
	Champignons	<i>Fusarium sp.</i>	11	(-)	12	10	(-)	(-)	(-)	09	(-)	(-)	
		<i>Aspergillus sp.</i>	(-)	(-)	(-)	08	(-)	(-)	(-)	08	(-)	10	
		<i>Aspergillus niger</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	11	08	(-)	08	(-)	
		<i>Aspergillus flavus</i>	(-)	(-)	11	11	07	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
		<i>Aspergillus nidulans</i>	(-)	(-)	(-)	10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
		<i>Penicillium sp.</i>	11	12	07	08	07	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
	La flore Procaryote	Gram ⁻	<i>Pseudomonas sp.</i>	09	08	11	10	09	09	12	11	10	11
			<i>E.coli M</i>	08	11	10	10	11	07	10	08	10	10
<i>E.coli Al</i>			11	12	12	11	10	12	15	12	11	12	
<i>Vibrio sp.</i>			11	07	10	11	10	11	10	12	11	10	
<i>Entérocooccus sp.</i>			15	12	14	11	12	15	12	11	11	10	
Gram ⁺		<i>Micrococcus sp.</i>	13	(-)	12	13	11	11	11	11	13	14	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	11	11	10	10	11	12	11	11	12	10	
		<i>Staphylococcus sp.coagulase(-)</i>	11	10	12	12	13	12	09	10	10	10	
		<i>Bacillus sp.</i>	10	11	11	14	12	12	10	14	10	10	
		<i>Proteus sp.</i>	09	11	10	11	11	12	10	12	08	10	

(-): Absence de zones d'inhibition. **sp.**: espèce. **mm.**: millimètre.

I.7.1. Interaction entre eucaryote et les bactéries lactiques

Les diamètres des zones d'inhibition (Figure 26,27), les plus élevés, ont été mesurés de 12 millimètres, entre:

- La souche lactique, *St2* et *Candida albicans*.
- La souche lactique *Lb3* et *Fusarium sp.*
- La souche lactique *Lb2* et *Pénicillium sp.*

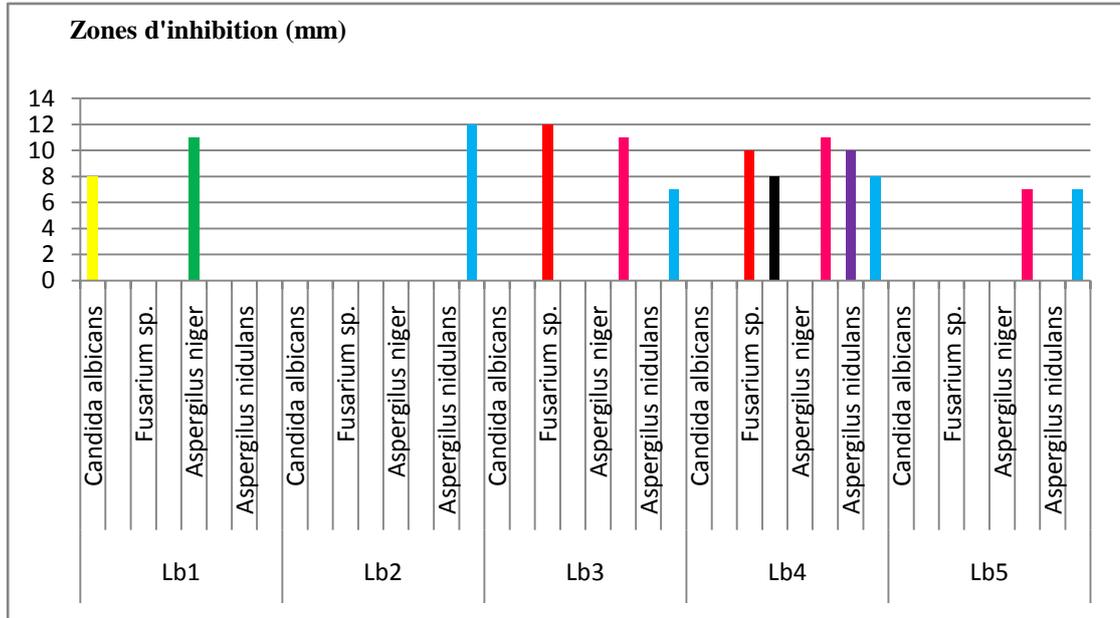


Figure 26: Histogramme qui montre les diamètres des zones d'inhibition de 05 isolats des *Lactobacillus thermophiles*, vis-à-vis des souches eucaryotes pathogènes et/ou phytopathogènes.

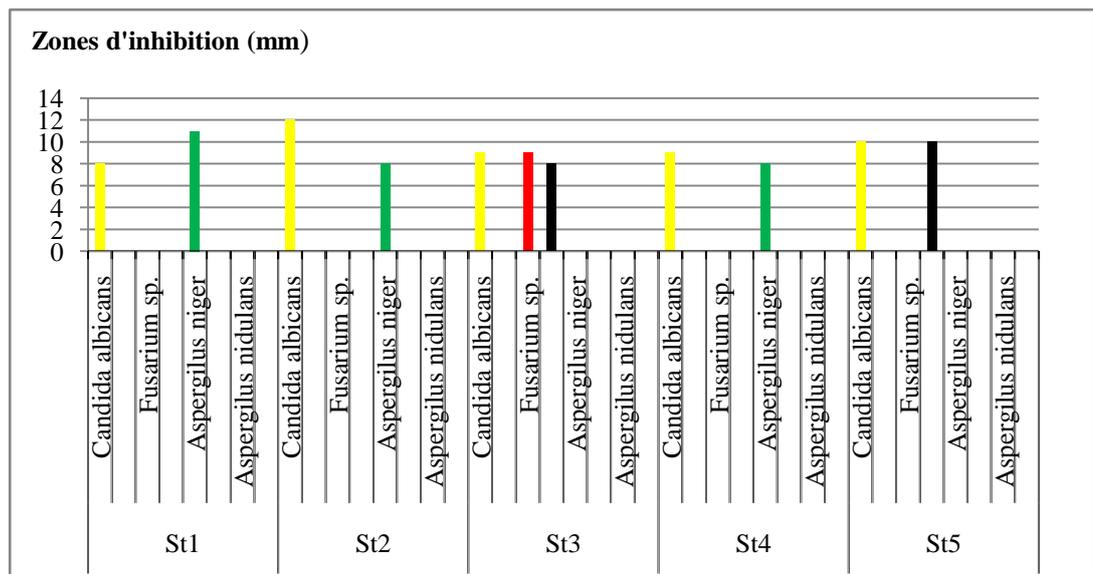


Figure 27: Histogramme qui montre les diamètres des zones d'inhibition de 05 isolats des *Streptococcus thermophilus*, vis-à-vis des souches eucaryotes pathogènes et/ou phytopathogènes.

Les souches lactiques: *Lb1*, *Lb2*, *Lb3*, *Lb4* et *Lb5*, n'ont pas enregistrées un effet inhibiteur vis-à-vis les souches indicatrices suivantes: *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisia* et *Aspergillus niger*.

Les souches lactiques: *St1*, *St2*, *St3*, *St4* et *St5*, n'ont pas enregistrées un effet d'inhibition, vis-à-vis les souches indicatrices suivantes: *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus flavus*, *Saccharomyces cerevisia* et *Penicillium* sp.

I.7.2. Interaction entre procaryotes et les bactéries lactiques

Les diamètres des zones d'inhibition, les plus élevés, ont été mesurées de 15 millimètres, entre:

-La souche lactique, *St4* et *E.coli* A1, la souche lactique, *St1* et *Enterococcus* sp. et la souche lactique, *St5* et *Micrococcus* sp.

-La souche lactique, *Lb1* et *Enterococcus* sp.

Des zones des inhibitions, de diamètre de 14 millimètres, ont été enregistrées entre les souches lactiques thermophiles et les souches cibles suivants:

-La souche lactique, *St5* et *Micrococcus* sp. et la souche lactique, *St3* et *Bacillus* sp.

-La souche lactique, *Lb4* et *Bacillus* sp.

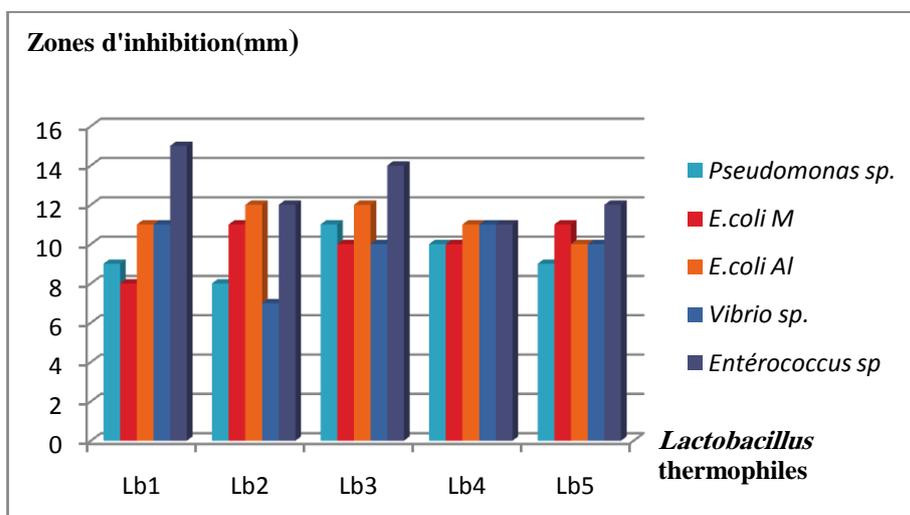


Figure 28: Histogramme qui montre les diamètres des zones d'inhibition de 05 isolats des *Lactobacillus* thermophiles, vis-à-vis des souches procaryotes pathogènes a paroi Gram négatif.

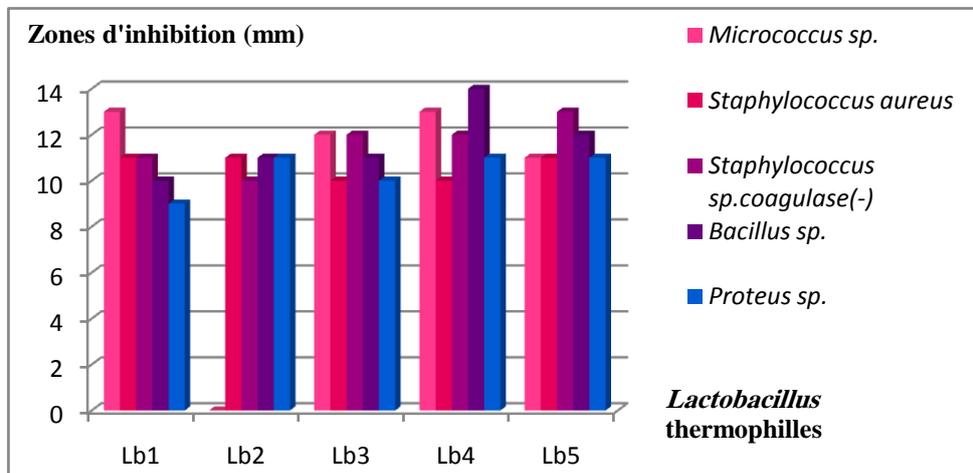


Figure 29: Histogramme qui montre les diamètres des zones d'inhibitions de 05 isolats des *Lactobacillus thermophiles* vis-à-vis des souches procaryotes pathogènes a paroi Gram positif.

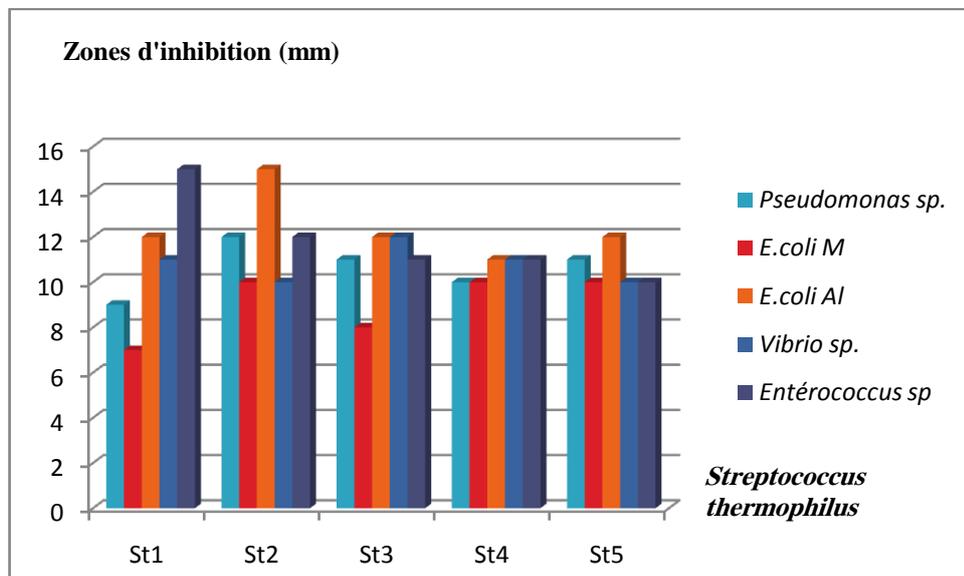


Figure 30: Histogramme qui montre les diamètres des zones d'inhibition de 05 isolats des *Streptococcus thermophilus* vis-à-vis des souches procaryotes pathogènes a paroi Gram négatif

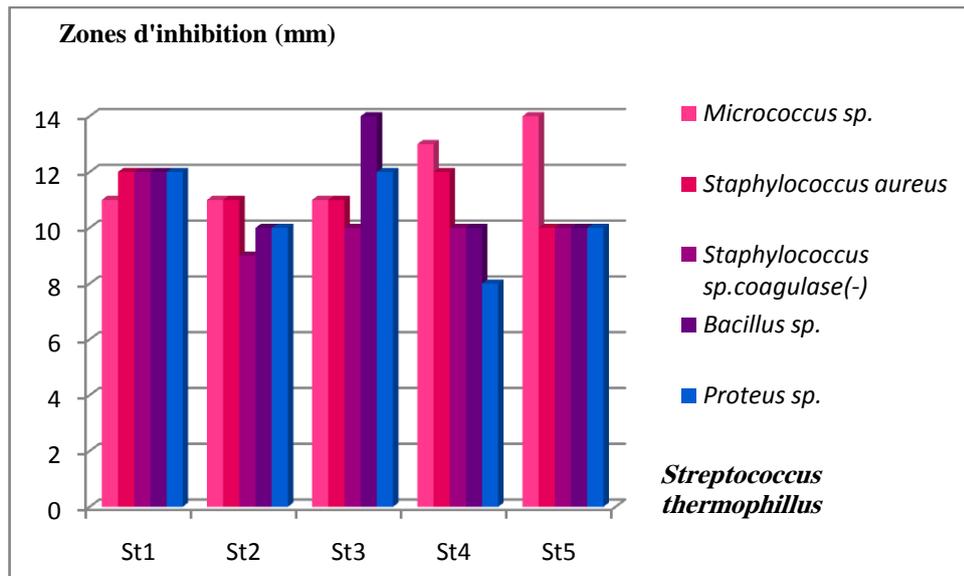


Figure 31: Histogramme qui montre les diamètres des zones d'inhibition de 05 isolats des *Streptococcus thermophilus* vis-à-vis des souches procaryote pathogènes a paroi Gram positif.

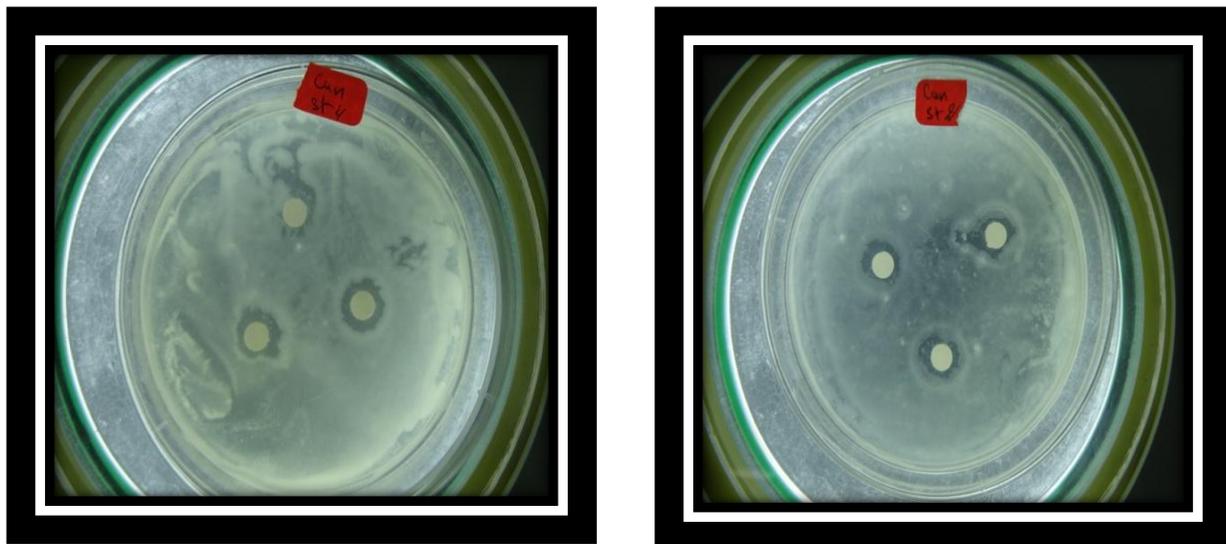


Figure 32: Zones d'inhibition entre les souches lactiques contre les levures (*Candida albicans*).

A: *Streptococcus thermophilus* (St4).

B: *Streptococcus thermophilus* (St5).

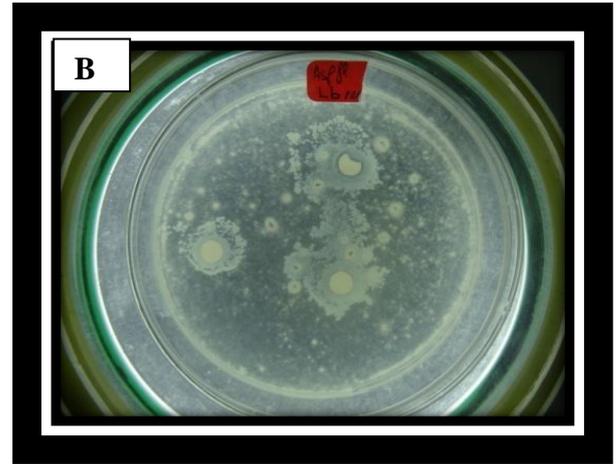
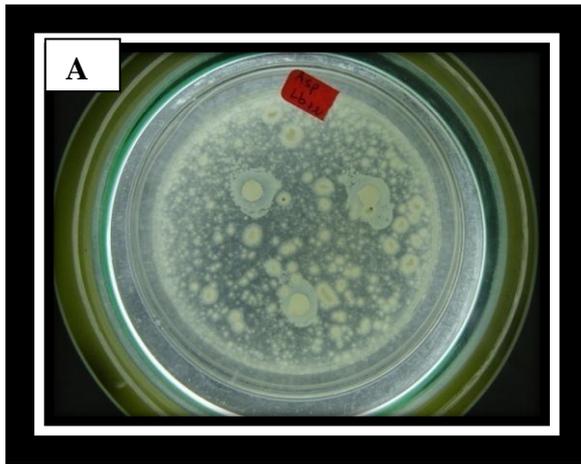


Figure 33: Zones d'inhibition entre les souches lactiques et *Aspergillus* sp. et *Aspergillus Flavus*.
 A: *Lactobacillus thermophiles* (Lb3) B: *Lactobacillus thermophiles* (Lb 4)

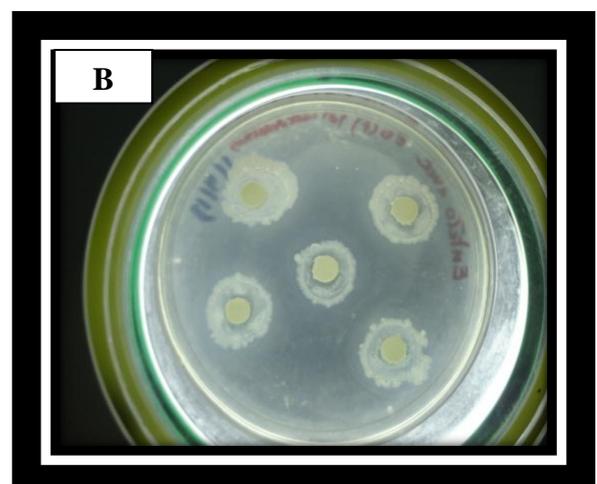
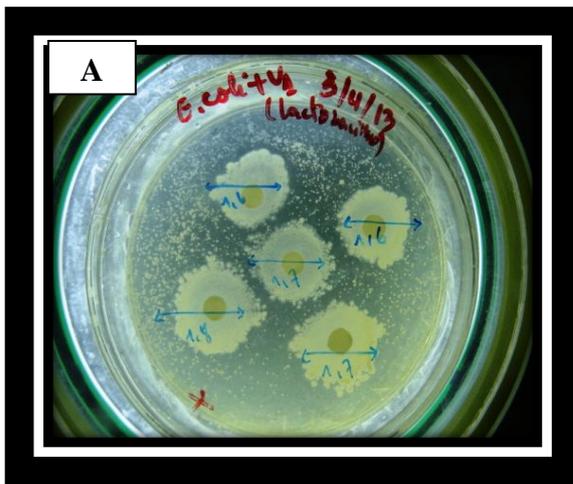


Figure 34: Zones d'inhibition entre les souches lactiques et les procaryotes pathogène à paroi Gram négatif.

A: *E. coli* A1

B: *Entérocooccus* sp

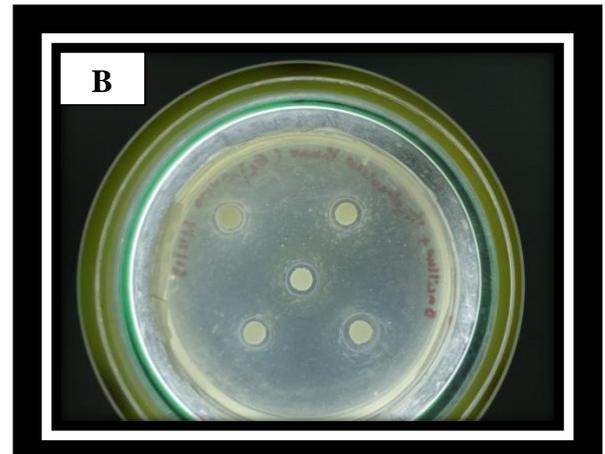
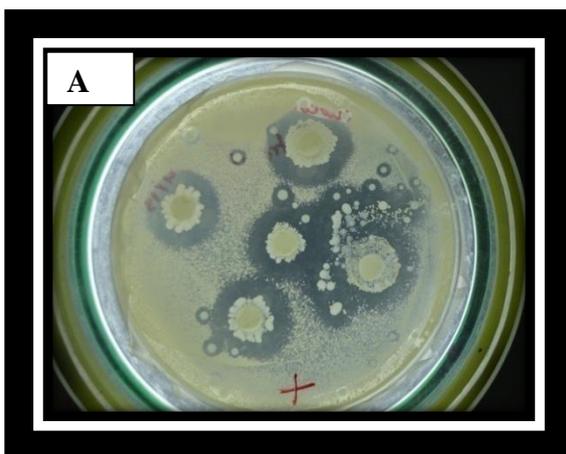


Figure 35: Zones d'inhibition entre les souches lactiques et les procaryotes pathogènes à paroi Gram positif.

A: *Micrococcus* sp.

B: *Bacillus* sp.

I.8. Contrôle physico-chimiques du lait cru

Les résultats des paramètres, physico-chimiques, de l'ensemble des échantillons, du lait crus, des trois espèces (caprine, bovine, et ovine) sont groupées, respectivement, dans les tableaux 22, 23, 24:

Tableau 22: Résultats de contrôle de la qualité physico-chimique des échantillons de l'espèce Caprine.

Paramètres Régions	pH	Acidité titrable en °D	Teneur en lactosérum (%)	Teneur en matière insoluble (%)	Viscosité (mPa.s)	Conductivité (mS/cm)	Azote total (g/l)	Protéines totales (g/l)	Densité
Hassnaoua	6,62	17,44	76	24	3,00	4,52	2,88	17,86	1,030
Bir Gassed Ali	6,91	14,89	80	20	2,90	4,94	3,22	20,54	1,040
Bir Gassed Ali	6,56	17,73	82	18	2,60	4,47	3,08	19,65	1,025
Ain Taghrout	6,94	16,95	80	20	2,50	5,65	3,15	20,09	1,030
Ain Taghrout	6,86	15,19	80	20	2,80	4,7	3,53	22,52	1,030
Ouled Mahdi	6,8	16,17	84	16	2,90	4,9	2,94	18,75	1,040
Ouled Mahdi	6,5	18,03	88	12	2,85	4,92	2,98	19,02	1,030
Taza	6,98	14,11	72	28	2,80	4,16	3,47	22,15	1,031
Taza	6,81	15,77	84	16	2,82	4	2,84	18,13	1,032
Taza	6,75	16,75	82	18	2,60	4,2	3,01	19,20	1,030
OuledDah man	6,7	16,95	86	14	2,50	5,50	3,16	20,18	1,035
OuledDah man	6,76	16,66	90	10	2,50	4,23	3,01	19,20	1,031
OuledDah man	6,75	16,85	88	12	2,60	4,4	3,36	21,43	1,031
OuledDah man	6,66	17,34	76	24	2,90	4,66	3,38	21,61	1,029
OuledDah man	6,68	17,15	78	22	3,80	4,7	3,5	22,33	1,031
Moyenne	6,73±0,12	16,53±1,1	81,73±5,09	18,26±5,06	2,80±0,32	4,66±1,76	3,16±0,86	20,18±1,5 3	1,031±0,01

Les valeurs du pH variées entre [6,50-6,98]; la valeur la plus élevée du pH **6,98**, a été enregistrée par la **chèvre de Taza**, alors que la valeur la plus basse, (**6,50**), a été mesurée sur le d'une **chèvre d'Ouled Mahdi**.

Les valeurs d'acidité, titrées en °D, variées entre **14,11**(celle du lait la région de **Taza**) et **18,03** (celui d'**Ouled Mahdi**).

Pour les dosages de Lactosérum et la matière insoluble en %, du lait de la chèvre provient d'**Ouled Dahman**, renferme le pourcentage le plus élevée en lactosérum avec **90%**

et le plus bas avec **10%** en matières insolubles. Tandis que l'échantillon de **Taza** à un pourcentage de **84%** en lactosérum et **28%** en matières insolubles.

Quand la viscosité, l'échantillon d'**Ouled Dahman (3,80 mPa.s)**, était le plus visqueux suivie par celui provient de **Hassnaoua (3,00 mPa.s)**. Tandis que les échantillons d'**Ouled Dahman** et **Ain Taghrout**, ont été les moins visqueux avec (**2,50 mPa.s**).

L'échantillon de **Ain Taghrout**, renferme la valeur la plus élevée, en Azote et protéine totale avec (**3,53g/l; 22,52g/l**), Tandis que, les valeurs les plus basses, **2,88g/l; 17,86g/l**, ont été mesurées dans l'échantillon de **Hassnaoua**, respectivement.

Tableau 23: Résultats de contrôle de qualité physico-chimique des échantillons de l'espèce bovine.

Paramètres Régions	pH	Acidité titrable en °D	teneur en lactosérum (%)	teneur en matière insoluble (%)	Viscosité (mPa.s)	Conductivité (mS/cm)	Azote total (g/l)	Protéines totales (g/l)	Densité
Bir Gassed Ali	6,87	15,38	82	18	3	3,72	2,52	16,07	1,02
Bir Gassed Ali	6,79	15,87	88	12	2,89	6,3	2,45	15,63	1,025
Lachbor	6,55	15,46	86	14	3	4,2	2,42	15,45	1,035
Ain Taghrout	6,81	15,68	84	16	2,80	4,85	2,66	16,97	1,03
Sidi Mbarek	6,94	14,89	86	14	2,8	4,42	2,65	16,34	1,03
Ain Taghrout	6,7	16,17	90	10	3,1	4,4	2,47	15,80	1,03
Lachbor	6,4	16,75	85	14	2,5	04	2,70	17,23	1,03
Charchar	6,8	15,77	84	16	2,5	4,5	2,42	15,45	1,025
Ain Taghrout	6,87	15,19	80	20	3	3,9	2,60	16,61	1,035
Moyenne	7,75±0,14	15,68±0,5 5	85±3	14,88±3,01	2,84±0,21	5,03±0,96	2,54±0,11	16,17±0,65	1,029±0,005

Les valeurs du pH variées entre [**6,40-6,94**]; la valeur la plus élevée du pH (**6,94**), a été enregistré par la vache de **Sidi Mbarek**, qui renferme la valeur la plus basse d'**acidité en °D (14,89)**, alors que la valeur la plus basse du pH, (**6,40**), a été mesurée sur le lait de vache de **Lachbor**, avec la valeur la plus élevé d'**acidité en °D (16,75)**.

Pour les dosages de Lactosérum et la matière insoluble en %, la vache d'**Ain Taghrout** renferme le pourcentage le plus élevée en lactosérum avec **90%** et le plus bas avec **10%** en matières insolubles. Tandis que l'autre échantillon de **Taza** à un pourcentage de **80%** en lactosérum et **20%** en matières insolubles.

Quand la viscosité, la vache de **Ain Taghrout (3,10 mPa.s)** était le plus visqueux suivie par le vache de **Bir Gassed Ali** et les échantillons de **Lachbor, Charchar** ont été les moins visqueux. (**2,50 mPa.s**)

L'échantillon de **Lachbor**, renferme la valeur la plus élevée, en azote et protéine totale avec (**2,70g/l, 17,23g/l**). Tandis que, les valeurs les plus basses, (**2,42g/l; 15,45g/l**), ont été mesurées dans l'échantillon, de **Charchar**, respectivement.

Tableau 24: Résultats de contrôle de qualité physico-chimique des échantillons de l'espèce ovine.

Paramètres Régions	pH	Acidité titrable en °D	teneur en lactosérum (%)	teneur en matière insoluble (%)	Viscosité (mPa.s)	Conductivité (mS/cm)	Azote total (g/l)	Protéines totales (g/l)	Densité
Ouled Mahdi	6,61	24,6	86	14	2,9	4,62	4,11	26,26	1,03
Bir Gassed Ali	6,7	23,81	82	18	2,5	5,86	4,03	25,72	1,025
Hassnaoua	6,89	23,42	80	20	3	5,71	4,2	26,79	1,03
Charchar	6,36	24,89	90	10	3	5,77	4,15	26,52	1,03
Ain Taghrout	6,87	23,52	84	16	2,8	3,83	4,08	26,08	1,035
Tizi	6,66	24,1	80	20	3	4,73	3,99	25,45	1,02
Ain Taghrout	6,66	24,01	76	24	3,3	3,84	4,21	26,88	1,03
Rabta	6,8	23,71	72	28	2,6	5,23	4,25	27,15	1,035
Moyenne	6,66±0,15	24±0,51	81,25±5,65	18,75±4,28	2,88±0,25	4,94±0,92	4,12±0,09	26,35±0,58	1,029±0,005

Les valeurs du pH variées entre [**6.36-6.89**]; la valeur la plus élevée du pH **6.89**, a été enregistrée la brebis de la région de **Hassnaoua**, alors que la valeur la plus basse, **6.36**, a été mesurée sur l'échantillon de **Charchar**.

Les valeurs d'acidité, titrées en °D, variées entre **23,42** (enregistrée par la brebis de la région de **Hassnaoua**) et **24,89** (enregistrée par celle de **Charchar**).

Pour les dosages de Lactosérum et la matière insoluble en %, la brebis de **Charchar** renferme le pourcentage le plus élevée en lactosérum avec **90%** et le plus bas avec **10%** en matières insolubles. Alors que l'échantillon de **Rabta** à un pourcentage de **72%** en lactosérum et **28%** en matières insolubles.

Quand la viscosité, l'échantillon d'**Ain Taghrout (3,3mPa.s)**, était le plus visqueux et l'échantillon de **Bir Gassed Ali (2,5mPa.s)**, a été le moins visqueux.

La brebis de **Rabta**, renferme la valeur la plus élevée, en azote et protéine totale dans leur lait, avec (**04,25 g/l; 27,15 g/l**). Tandis que, les valeurs les plus basses, (**3,99 g/l; 25,45 g/l**) ont été mesurées dans l'échantillon, de **Tizi**, respectivement.

I.8.1. Mesure de pH

La mesure de pH des différents échantillons entre les différentes espèces laitières, donne les résultats présentés au figure ci-dessous:

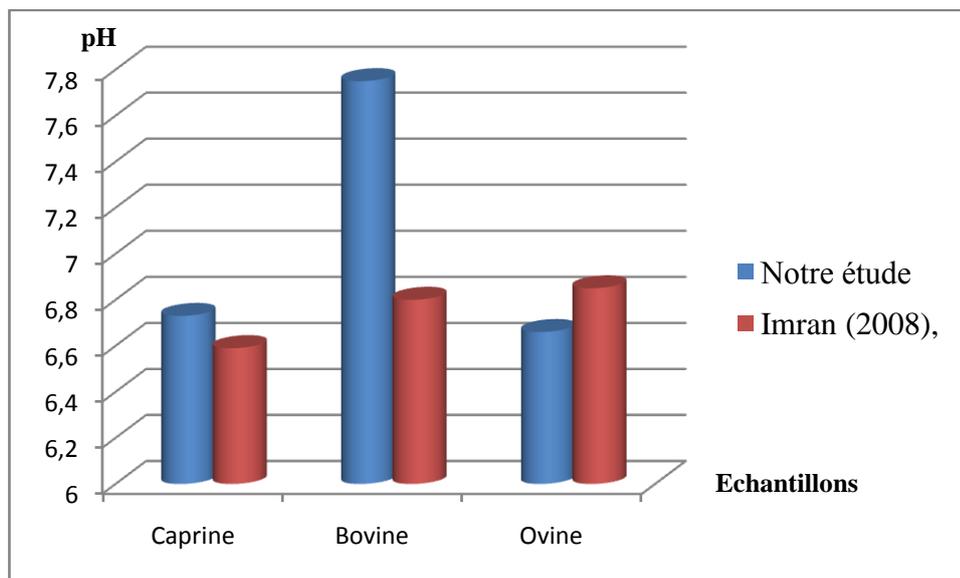


Figure 36: Variations des valeurs des pH des différents échantillons du lait cru comparés avec celles enregistré par l'étude d'Imran, (2008).

I.8.2. Mesure de l'acidité en degré Dornic

Les résultats de la mesure de l'acidité des échantillons, sont traduits, graphiquement, sous forme d'histogramme (Figure 37).

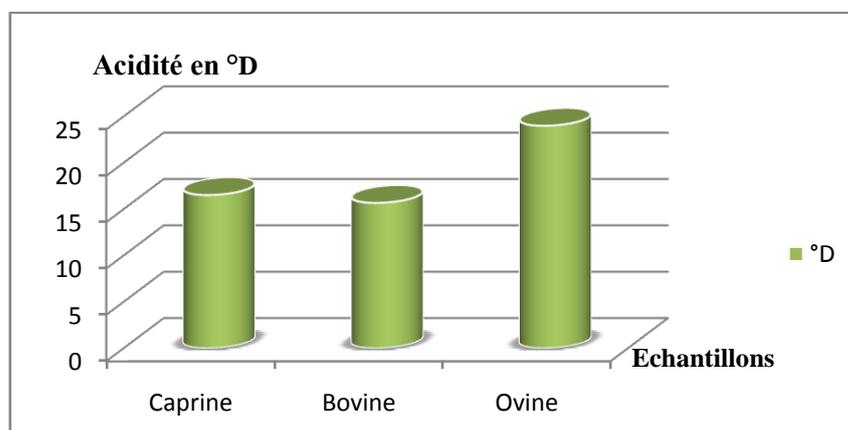


Figure 37: Histogramme représentatif des variations de l'acidité en °D, pour les échantillons des trois espèces laitières étudiées.

I.8.3. Teneur en lactosérum

La teneur en lactosérum est mesurée après leur séparation du culot, les résultats obtenus sont regroupés dans la figure 38:

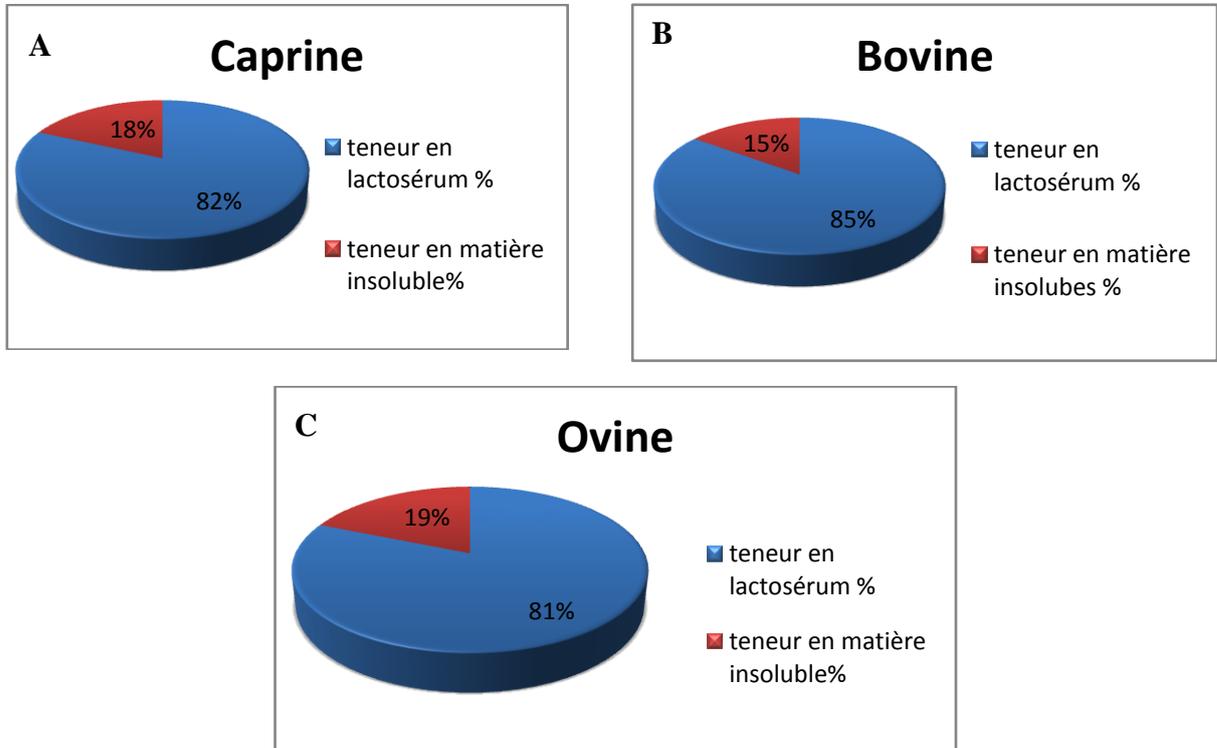


Figure 38: Répartition du Lactosérum et la matière insoluble en % dans le lait des trois espèces laitières.

A: l'espèce caprine. **B:** l'espèce bovine. **C:** l'espèce ovine.

I.8.4. Protéines et l'azote total

La technique Kjeldhal, a permet l'obtention des résultats à deux paramètres. Les résultats sont présentés dans les tableaux (22, 23, 24), ainsi que les mêmes résultats sont présentés sous forme d'histogramme suivants:

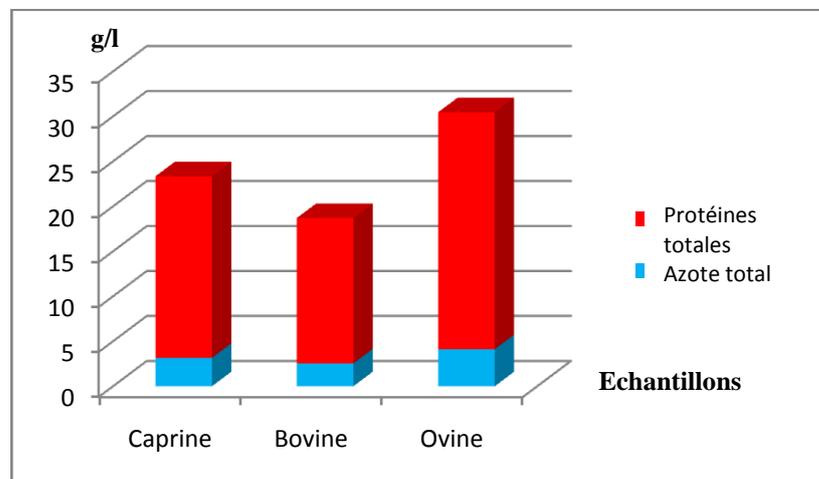


Figure 39: Histogrammes descriptifs de la teneur en azote et protéine totale et dans les échantillons analysés.

II. Discussion

II.1 La qualité hygiénique du lait cru

Les indicateurs de la qualité et des bonnes pratiques de fabrication, des aliments pour **Cardinal (2003)**, sont les microorganismes et/ou leurs produits métaboliques, dont la présence, dans des aliments, peut être utilisée, pour évaluer la qualité (fraîcheur), d'un produit alimentaire.

Le lait cru, distribué aux consommateurs, sans traitement thermique, est un milieu de culture, pour un très grand nombre de germes, voir un vecteur potentiel des zoonoses (**Labres, 2006; Aggad et al., 2009; Ghazi et Niar, 2011**).

La qualité microbiologique du lait cru, est importante pour sa conservation, voire sa transformation (**Aggad et al., 2009**).

II.1.1. La flore aérobie mésophile totale (FAMT)

La flore aérobie mésophile totale, nous renseigne toujours sur la qualité hygiénique du lait cru. C'est la flore, la plus recherchée dans les analyses microbiologiques, des laits. L'énumération de cette flore pour les échantillons collectés, a montrée une charge microbienne mésophile élevée.

Pour estimer la flore aérobie mésophile totale (FAMT) du lait; nous avons utilisé un milieu (analogue à ce dernier), la Gélose nutritive, enrichi de 01% de lait (**Aggad et al., 2009**).

En effet, nous avons observés que, la plus part des échantillons du lait cru examinés, avaient une flore totale cernée entre 10^5 et 5.10^5 UFC/ml du lait caprin, **00 UFC/ml** et 37.10^5 UFC/ml du lait bovin et entre **00 UFC/ml** et $11,5.10^6$ UFC/ml du lait ovin.

Les charges maximales tolérées, par la réglementation **AFNOR**, sont $\leq 5.10^5$ UFC/ml (**AFNOR, 1980; Alais, 1984**).

Nos résultats, sont en accord avec ceux rapportés par **Amhourri, (1998); Bonfoh et al., (2003); Chye et al., (2004)** et **Srairi et al., (2005)**.

Ghazi et Niar, (2011), dans une étude menée sur 155 échantillons, des laits crus, provenant de différents élevages, de la wilaya de Tiaret, Algérie, ont noté, que, la flore aérobie mésophile totale (FAMT) a été supérieure à 10^5 UFC/ml pour **81,2%** des échantillons.

Selon **Bouzaid et al., (2012)**, sur un ensemble de 24 échantillons, de lait cru de vache, collecté au Maroc, la flore aérobie mésophile totale (FAMT) était élevée dans l'ensemble des échantillons des laits crus, de colportage **$04.4 10^7$ UFC/ml**.

Malgré la température saisonnière, de la région (ambiante), et la température de transport $+4^\circ\text{C}$, la flore aérobie mésophile totale, été trop élevée, ceci est probablement,

due à l'hygiène de la traite (absence de la traite mécanique), ou à un manque des bonnes pratiques d'hygiène, au niveau des fermes d'élevage.

II.1.2. Les coliformes totaux et fécaux

La recherche de microorganismes, indicateurs de contamination d'origine fécale, permet de juger l'état hygiénique, d'un produit alimentaire. Même à des niveaux faibles, ils témoigneraient des conditions hygiéniques, régnant lors de la traite, ou au cours de transport, toutes les normes, en microbiologie alimentaire, recommandent, la recherche des coliformes sur le bouillon d'enrichissement (BLBVB), ce dernier renferme deux agents sélectifs: la bile et le vert brillant, reste le milieu de référence, pour la recherche des coliformes dans les aliments (**AFNOR, 1980; Marshal *et al.*, 1987; Guiraud, 1998**).

Le Bouillon lactosé au Pourpre de bromocrésol (BCPL); est un bouillon d'enrichissement, riche en lactose, et non sélectif (**Joffin et Joffin, 1993**), permettant la récupération de toutes les entérobactéries, lactose⁺, recommandé, surtout, pour la colimétrie des eaux (**Rodier *et al.*, 2009**). Ceci explique, aussi la reproductibilité, des différents échantillons analysés à 37°C, de notre étude, avec une moyenne de **68,6 UFT/ml** pour le lait caprin, **73,75 UFT/ml** pour le lait bovin et une moyenne de **62,3 UFT/ml** pour le lait ovin.

Contrairement aux coliformes totaux, les coliformes fécaux, ensemencés sur le bouillon VRBL, étaient à prédominance indénombrables, ceci ne peut être expliqué que, par l'étape précédente, d'enrichissement sur BCPL.

Les teneurs en coliformes fécaux, trouvées sont inférieures à celles mentionnées par **Hamama et El-Mouktafi, (1990)**, **00 UFC/ml** pour deux échantillons de lait de chèvre (**Ch2 et Ch3**), également deux échantillons pour le lait de vache (**V1 et V2**) et pour un seul échantillon concernant le lait de brebis (**B5**), contre **1,8.10⁵ UFC/ml** de coliformes fécaux.

En outre; la gélose VRBL, ayant deux agents sélectifs: le vert brillant et la bile. (**Marshal *et al.*, 1987**), et le lactose comme source d'énergie, ce qui signifie que le milieu VRBL, utilisé, n'a permis le développement que, des coliformes fécaux, ayant la capacité de dégrader le lactose à 44°C, aussi, ceci explique, la prédominance des boîtes indénombrables, dans les échantillons du lait cru des trois espèces laitières (**Ch4, Ch5 et Ch6** pour le lait caprin, **V5** pour le lait Bovin et **B2, B3 et B4** pour le lait ovin) (**Guiraud, 1998**).

La traite manuelle augmente, les possibilités de contamination du lait, en accroissant la surface de contact entre le lait et les microorganismes du milieu ambiant, surtout lorsque, ce dernier est souillé. (**Aggad *et al.*, 2009**).

La présence de coliformes fécaux, signale le plus souvent, une contamination exogène d'origine fécale. (**Guiraud, 1998; Aggad *et al.*, 2009**).

II.1.3. La flore indologène

Certains coliformes fécaux, ont la capacité, de dégrader, en plus du lactose, l'acide aminé Tryptophane en donnant l'indole, ce composé, forme avec le réactif de Kovacs, un anneau rouge, c'est le test de Mac kenzy, qui reflète une activité enzymatique intense à 44°C, propre à ce groupe microbien (**Djellouat, 1990; Guiraud, 1998**).

Sur les 13 échantillons du lait cru, deux échantillons, de l'espèce caprine (**Ch5 et Ch6**), soit **15,38%** renferme les germes indologènes.

La richesse du lait cru, en protéine, est un facteur essentiel, qui favorise la dissémination de la flore indologène.

II.1.4. Les Clostridium Sulfite-Réducteurs (CSR)

Pour la recherche du groupe des Clostridium Sulfite-Réducteurs (CSR), nous avons utilisé un milieu semi solide (complexe), viande foie (VF), avec deux additifs (01,5 ml de sulfite de sodium à 05% et 05 ml Alun de fer à 05%) (**Guiraud, 1998; Larpent et al., 1997**).

Un chauffage, préalable de 10 min à 80°C, a été effectué, pour provoquer la forme de résistance (les spores) (**Joffin et Joffin, 1993**).

Un seul échantillon B3, renfermant des spores, après 24h soit **7,66%**, sur gélose VF, les formes végétatif, avaient envahi la gélose, de ce fait, leur dénombrement était difficile, pour cet échantillon, il s'agit d'une flore de contamination, par les bacilles sulfite réducteurs, probablement, cette dernière, avait lieu au cour de la traite ou d'échantillonnage, les téguments de l'animal, le matériel de la traite manuelle, le fourrage et l'environnement de l'étable sont en faveur des transmissions de ce groupe bactérien d'origine tellurique (**Guiraud, 1998**).

Un traitement thermique efficace, est impératif avant la consommation du lait cru.

II.1.5. Les streptocoques fécaux

Le taux des streptocoques fécaux, est en rapport avec l'état de santé des espèces laitières, les conditions hygiéniques de la traite, et d'éventuelles contaminations, au cours du dénombrement (**Labioui et al., 2009**).

Les streptocoques fécaux, sont des indicateurs de contamination fécale ancienne, et moins potentielle, que les pollutions causées, par les coliformes fécaux (**Guiraud, 1998**).

Toutes les normes de la microbiologie alimentaire, recommandent, l'utilisation des deux bouillons: Rothe et Eva-litsky, pour le dénombrement des streptocoques fécaux (**Guiraud, 1998**).

En outre, La sélectivité du milieu Litsky, est due à la présence de l'éthyl-violet et l'azide de sodium, en double concentration, par apport au bouillon Rothe, qui est moins sélectif (**Joffin et joffin, 1993**).

Le nombre des streptocoques fécaux, est maximal dans le lait de chèvre, avec une moyenne de **94,4 UFT/ml**, la même observation à été enregistrée, pour le lait de vache et de brebis, avec une moyenne de **15 UFT/ml**.

La présence des streptocoques fécaux, dans les laits, des trois espèces laitières, montre que la source de contamination est peut être liée, à l'état de santé de l'animal (**Labioui et al., 2009**).

Probablement, les conditions hygiéniques de la traite et de l'étable, étaient en faveur d'une dissémination des Streptocoques fécaux (**Agaad et al., 2008**).

II.1.6. *Staphylococcus aureus*

La présence des staphylocoques dans le lait, représente un risque pour la santé humaine, parce que certaines souches, appartenantes principalement, à l'espèce *Staphylococcus aureus*, produisent des toxines thermolabiles dont, l'ingestion provoque une toxi-infection alimentaire à staphylocoques (**De Buyser, 1996**).

Le lait et les produits laitiers, ne deviennent toxiques que s'ils sont contaminés par des souches Staphylococciques, productrices des toxines et si des conditions favorables à une multiplication bactérienne importante et à la toxinogénèse se trouvent réunies. (**Poutrel, 1992**).

Les résultats, présentent des différences, du nombre de ces microorganismes entre les échantillons. Le lait de vache, s'est trouvé, le moins chargé en *Staphylocoques*, dans les deux échantillons **V1** et **V6** avec **1,22.10²** et **9;92.10² UFC/ml**, respectivement, que les échantillons des deux autres espèces (caprine et ovine) où dans ces derniers, nous avons enregistré des boîtes Petri indénombrables.

Staphylococcus aureus, fait partie de la flore de la peau et des muqueuses de l'homme et de l'animal. Parasite habituellement inoffensif, il peut provoquer des infections (abcès, cutanés, mammites). La contamination du lait, peut survenir par l'intermédiaire de porteurs sains ou infectés, ou par l'environnement.

Chez les bovins, *Staphylococcus aureus*, été isolé dans les narines, on le retrouve dans de petites lésions cutanées. (**Asperger, 1994**).

Les souches de *Staphylococcus aureus*, ne sont pas toutes toxinogènes. D'après les nombreuses enquêtes réalisées à ce sujet, et dans des conditions optimales de culture, au laboratoire, le pourcentage de souches toxinogènes, serait de **30%** à **60%**, chez des souches ovines et caprines, contre seulement **04%** à **10%** chez les souches bovines (**De Buyser et La peyer, 1994**).

Nonobstant, le lait cru, est un vecteur potentiel, d'autres espèces bactériennes, non recherchées dans notre étude: Parmi ces espèces, une, la plus redoutable, a paroi Gram

négatif, responsable des épidémies: *Salmonella*. L'autre, espèce à paroi Gram positif, responsable des zoonoses; causant des pertes économiques (perte des troupeaux), transmise par le lait cru, responsable de la Listériose humaine.

Le législateur algérien, à travers un décret **Jo 43/2004**, a rendu obligatoire, la recherche de *Listeria* sp., dans le lait cru, en précisant même la technique, le protocole et la composition des milieux de culture utilisés .

D'après de nombreuses études, des auteurs ont confirmé, que le lait cru, reste un vecteur de transmission incontournable des Listérioses, notamment, celles où l'espèce *Listeria monocytogenes* est impliquée: (**Hayes et al., 1986; Lovett et al., 1987; Rodriguez et al., 1998**).

Néanmoins; même si d'autres travaux, ont confirmé la transmission d'espèce *Listeria monocytogenes* par le lait cru, collecter, dans la région centre d'Alger, **Lebres, (2006)**, dans une étude, avance un taux de prévalence, de transmission de *Listeria monocytogenes*, par le lait cru, de **01,98%**.

En outre, **Rodriguez et al., (1998)**, avance un taux de prévalence de **02,19%** et de **02%** de transmission des espèces de *Listeria*, (*Listeria innocua* et *Listeria monocytogenes*), dans le centre de l'Espagne, pour cet auteur, le lait de brebis est le principal, vecteur dans ces cas de transmission.

D'autres travaux, ont affirmé que, le nombre des *Listeria monocytogenes*, cultivées sur le lait cru, en présence des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*), ont été sérieusement affecté par, l'abaissement de pH après 24h à 72h de fermentation, des taux de **83% à 100%**, ont été disparu (**Pitt et al., 2000**).

Des résultats de control de qualité microbiologiques, il ressort que, la totalité des échantillons des laits crus, et en dessous, aux normes recommandées, en ce domaine, ce qui signe des mauvaises conditions d'hygiène, entre le moment de la traite et celui de la réception des échantillons au laboratoire.

II.2. L'isolement et le dénombrement des bactéries lactiques

II.2.1. L'isolement des bactéries lactiques

Dans la présente étude, et afin d'explorer les charges en flores lactiques thermophiles, des différents laits collectés, de vérifier les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques, nous sommes intéressés à l'isolement et l'identification, des souches lactiques thermophiles, présentant un intérêt technologique: Lactobacilles thermophiles et lactocoques thermophiles, à partir des différents échantillons des laits crus, des trois espèces laitières.

Un ensemble de 84 souches lactiques, ont été isolées;42 isolats à partir du lait de chèvre, vache et brebis, sur le milieu MRS et 42 autres isolats provenant, a ces trois

dernières espèces, sur le milieu M17, le grand nombre d'isolats obtenus à partir des échantillons de la région de **Ain Taghrourt, Mansoura et Ouled Dahman**.

Plusieurs auteurs, ont utilisés la même méthode, les mêmes milieux de culture, pour sélectionner des souches lactiques thermophiles, ayant des potentialités technologiques et probiotiques (**Badis et al., 2005; Mechai et Kirane, 2008**), pour la sélection des lactobacilles (**Boukhemis et al., 2009; Allouche et al., 2010**), et pour la sélection des lactocoques thermophiles (**Moulay et al., 2006; Meribai et al., 2010**).

Les résultats, de dénombrement indiquent; une richesse, des différents échantillons, en flores lactiques thermophiles, de même, une probable différence des niveaux d'hygiène des fermes d'élevage, où la collecte des laits, a été réalisée. Les laits crus, des différentes espèces laitières, semblent des niches écologiques de choix, pour les flores lactiques thermophiles.

II.2.2. Le dénombrement des bactéries lactiques

Les observations macroscopiques, montrent que, Les colonies de Lactobacilles sur gélose MRS, sont apparues, sous forme de grains de blé, bien isolées, à pourtour régulier et de couleur brunâtre, tandis que; les colonies des Lactocoques thermophiles, isolées sur gélose M17, sont apparues de petite taille, de forme circulaire ou lenticulaire, bien isolées, à pourtour régulier et de couleur blanchâtre. Ainsi, l'observation microscopique, après coloration de Gram, indique que les souches des lactobacilles présentent, des cellules à paroi Gram positif, en forme de bâtonnets courtes, disposées en diplobacilles et en courtes chaînettes, alors que, les souches des streptocoques présentent, aussi, des cellules à paroi Gram positif, rondes, associées en paires ou en chaînettes, plus ou moins longues.

L'isolement des flores de lait (Lactocoques et Lactobacilles), a été basé sur deux paramètres sélectifs: la température (42°C pour les thermophiles), et le choix des milieux de culture, très riches: M17 (**Tarzaghi et Sandine, 1975; Marshal et al., 1987**), le milieu MRS (**De Man Rogosa Sharp, 1960**). Le choix de la température d'incubation, +44°C, nous semble judicieux, puisque c'est la température optimale de croissance, relative aux flores thermophiles étudiées, en culture pure, et même en culture mixte, dans certaines situations. Plusieurs auteurs avaient utilisé, la même température (+44°C en l'occurrence), pour l'isolement et/ou l'incubation des flores thermophiles (Lactocoques et Lactobacilles) (**Aslim et al., 2004; Grade et al., 2004; Ayhan et al., 2005**).

La température d'incubation, les milieux de cultures utilisés et leurs agents sélectifs, ainsi que les échantillons, utilisés comme source d'isolement, au départ (laits crus), nous ont permis de confirmer, l'appartenance de nos isolats à l'espèce *Streptococcus thermophilus* (pour les lactocoques thermophiles isolées, sur M17 à 42°C), plusieurs auteurs ont utilisés

les mêmes méthodes, même température d'incubation, pour l'isolement de cette espèce à partir du lait cru ou produits laitiers fermentés (**Grade et al., 2004; Ayhan et al., 2005; Khedid et al., 2008**).

Cependant; l'identification partielle des Lactobacilles, à donner, des genres thermophiles acidifiants, sur MRS à 44°C d'incubation, plusieurs auteurs, ont suivis le même protocole pour les lactobacilles thermophiles (**Boukhemis et al., 2009; Allouche et al., 2010**).

Lors des lectures des résultats, des retards de croissances, ont été enregistrés, sur les deux milieux de culture utilisés: le M17 et MRS, en l'occurrence, certaines colonies n'apparaissent qu'après 48h et même après 72h d'incubation, ces derniers, sont probablement, dus à des phases de latence, plus aux moins prolongées, permettant aux espèces lactiques stressées, de bien s'adapter au milieu de culture: reconnaissance des nutriments et initiation des opérations de transport et des échanges (**Zotta et al., 2008**), ces retards, sont aussi, liés aux caractères nutritionnels et culturels, des bactéries lactiques, nécessitant des milieux riches, en différents nutriments, pour leur croissance (sucres, acides aminés, acides gras, sels, vitamines) et pauvres en oxygène, ces retards de croissance, étaient prévisibles, ce qui nous a amenés à choisir, des milieu de cultures, recommandés pour les bactéries lactiques; MRS, et le temps d'incubation allant de 48h à 72h (**De Man Rogosa et Sharpe, 1960**), M17 (**Tarazaghi et Sandine, 1975**).

La croissance bactérienne, dans le milieu M17, est beaucoup plus importante, que dans le milieu MRS, cette différence de croissance observée, dans les deux milieux MRS et M17, peut s'expliquer soit: par la richesse du milieu M17 en composés nutritifs, et que les cellules s'adaptent mieux dans le milieu M17, que dans le milieu MRS, soit, du fait, qu'elle est liée à l'effet de la température d'incubation (**Mora et al., 2004; 2005**), pour certains auteurs, la dominance des *Streptococcus thermophilus* dans les laits cru, est due à leurs propriétés biochimiques (**Monnet et al., 2004; 2005; Monnet et Corrieu, 2007**).

II.3. Conservation des souches lactiques isolées

L'emploi des substances productrices, appelées cryoprotecteurs, selon le mode de stabilisation mise en œuvre, permet d'accéder, à une meilleure maîtrise, des opérations de congélation, et d'élargir ainsi, les conditions opératoires de conservation.

Les cryoprotecteurs, sont des substances chimiques, capables de prévenir, les détériorations consécutives à la congélation (**Corrieu et Luquet, 2008**).

Les connaissances acquises, dans le domaine médical, sont maintenant appliquées en microbiologie industriel.

Meryman, (1971) à, le premier proposé la répartition du cryoprotecteurs en deux classes:

- 1. les cryoprotecteurs intracellulaires;** qui pénètrent dans la cellule.
- 2. les cryoprotecteurs extracellulaires;** qui demeurent à l'extérieur des cellules.

Carvalho *et al.*, (2004), par contre a distingué, 03 catégories de ces molécules:

1. Les molécules; qui pénètrent dans les cellules, jusque dans les cytosols, telle que le glycérol et le diméthyl sulfoxyde (DMSO)
2. Les molécules; qui traversent la membrane cellulaire, mais n'atteignent pas le cytoplasme, telle que les oligosaccharides, les acides aminés et les polymères, de faible masse moléculaires.
3. Les molécules; qui ne pénètrent pas dans la cellule notamment, les polymères, de grosses tailles (protéines et polysaccharides)

Les agents dits «pénétrants» ont un faible poids moléculaire, en général inférieur à 100 Da. Ils agissent à des concentrations de l'ordre de la mole par litre.

Ces agents, protègent les cellules, contre les effets de la congélation lente en modifiant les équilibres des solutions. Leur rôle, est de réduire la quantité de glace formée à l'extérieur de la cellule et, ainsi diminue la concentration des solutés extracellulaires, on conséquence, la déshydratation, est réduite et devient tolérable.

De plus à l'intérieur des cellules, les cryoprotecteurs, pénétrants tendent à abaisser la température de congélation commençante et donc, limitent la cristallisation de l'eau intracellulaire (**Corrieu et Luquet, 2008**).

II.4. Caractéristiques écologiques, biochimiques et technologiques des bactéries lactiques

II.4.1. Identification biochimique et physiologique des bactéries lactiques

L'analyse des résultats biochimiques et physiologiques, montre que, tous les isolats se sont avérés à Gram positif, catalase négative, Homofermentaires, citrate réductase négatif, uréase positif, pour la plupart, ce qui est caractéristique des bactéries lactiques.

Nous avons observés aussi, une activité protéolytique importante pour les *Lactobacilles* thermophiles par rapport à l'espèce *Streptococcus thermophilus*.

D'après **Vuillemard, (1986)**, la souche est dite protéolytique si elle présente une zone de lyse de diamètre compris entre **05** et **15mm**.

Selon **Moulay *et al.*, (2006)**, le milieu gélosé YMA, additionné de **01%** à **02%** du lait écrémé reconstitué, est optimale pour la mise en évidence des activité protéolytique.

Moulay *et al.*, (2006); ont obtenus des zones de protéolyse, de diamètres, allant de **0.15mm** à **11,5 mm** pour des bactéries lactiques isolées des laits de différentes espèces laitières.

L'activité protéolytique des bactéries lactiques, est essentielle, pour leur croissance dans le lait, ainsi que, pour le développement des propriétés organoleptiques, des différents produits laitiers (**Savoy et Hébert, 2001; Hassaine et al., 2007**).

La protéolyse, joue un rôle critique, en déterminant les caractéristiques sensorielles typiques et représente un indicateur significatif de qualité du produit fini.

La protéolyse dans les fromages est provoquée par des enzymes du lait (plasmine) et la présure ajoutée, ou libérées, par des micro-organismes. Les activités de ces enzymes, réduisent la concentration en caséine et mènent à la formation de peptides de différentes tailles. Ces peptides peuvent être encore, hydrolysés, par les enzymes protéolytiques de la flore microbienne du fromage, en acides aminés libres, lors de la phase d'affinage (**Ong et al., 2007**).

La protéolyse, est l'un des processus biochimiques les plus importants, impliqués dans la fabrication de beaucoup de produits laitiers fermentés. La capacité de produire des protéinases extracellulaires; est une caractéristique très importante des bactéries lactiques. Ces enzymes hydrolysent les protéines du lait, en fournissant les acides aminés essentiels, pour la croissance. Il est connu, que les protéinases des bactéries lactiques, dégrade les protéines et par conséquent, change la texture, le goût et les arômes des produits fermentés (**El-Ghaish et al., 2011**).

II.4.2. Cinétique d'acidification par mesure des pH et titrage d'acidité en degré dornic (°D)

L'évolution de l'acidité et les variations des pH, au cours de la croissance des souches testées, sur le lait écrémé montrent, une différence entre les genres, les espèces et même entre les souches, d'une même espèce, caractère physiologique rapporté par: (**Luquet et Corrieu, 2005; Chamba et Prost, 1989**).

L'activité acidifiante, des ferments lactiques, est un paramètre déterminant, dans leur sélection et leur utilisation en technologie laitière (**Martley, 1983**).

Les souches lactiques les plus acidifiantes étaient: **SCh4 (5,81°D)** contre la souche de référence **SLP (6,90°D)** après **4h**, la même souche a enregistré le pH, le plus bas (**5,43°D**) comparativement à la souche de référence (**6,89°D**) après 6h, la souche **SCh3 (4,40°D)**, était la souche la plus acidifiante par rapport au **SLP (4,80°D)** après **16h**, et **3,58°D;4,32°D** ont été enregistrés après **24h** d'incubation par les souches **SV8** et **SLP** respectivement.

L'activité acidifiante, du lait se traduit par la production d'acide lactique au cours de l'incubation à **4h, 6h, 16h** et **24h**, dont les valeurs enregistrées, par les souches, en comparaison avec celles données, par la souche de référence (**SLP**), étaient:

(51,94°D-34,30°D), (51,94°D-60,70°D), (88,20°D-78,59°D) et (152,220°D-113,480°D) des souches (SB2-SLP), (SCh2-SLP), (SCh3-SLP) et (SV8-SLP) respectivement.

Roukas et Kotzekidou, (1998); travaillant, sur la production d'acide lactique à partir de lactosérum en culture pure et mixte, de *Lactococcus lactis*. Ils ont montré que, la concentration la plus élevée, en acide lactique, a été obtenue, en culture mixte **22.5g/l (225°D)** alors qu'en culture pure, la concentration était de l'ordre de **10.5g/l (105°D)**.

La mesure de l'acidité, a été réalisée, selon la méthode préconisée par (**Luckas et Reyrolle, 1989; Chamba et Prost, 1989; Thomas et Chamba, 2000**), par neutralisation, à l'aide de la soude N/9, de 10ml de lait fermenté, auquel est ajouté un indicateur du pH (solution alcoolique de 1% de phénolphtaléine), (01D°=0,1 g /l d'acide lactique) et par, des mesures du pH et d'acidité dornic (D°). Il est à noter que, les souches, n'ayant pas réussies, à coaguler le lait écrémé reconstitué, au bout de 24h, étaient éliminées de l'étude, par ce procédé, nous avons sélectionnés les isolats, puis nous avons conservé, les souches technologiquement intéressantes, selon la règle de **Chamba et Prost, (1989)** qui considèrent que toute souche lactique, donnant une variation de pH; $\Delta\text{pH}=0.5$, dans un intervalle de temps de 4h, est une souche technologiquement intéressante, surtout si on prend en considération le pouvoir tampon exercé par le lait cru.

De même, **Mangia et al., (2008)**, ont étudié, la cinétique d'acidification de la souche *Lc. Lactiss* sp. *LactisCFM7*, isolée à partir du lait de brebis, ont trouvé qu'après 24h, cette souche, produit (**72°D**) d'acide lactique.

L'ensemble de nos souches sélectionnées, semble très acidifiantes, en comparaison avec celles, isolées par **Zourari et al., (1991); Zourari et Desmazeaud, (1991); Thomas et Chamba, (2000)**. Le profil acidifiant de l'ensemble de nos souches isolées, semble aussi, proche des souches isolées par **Aslim et Beyatli, (2001); Ayhan et al., (2005)**, de même, le profil acidifiant de nos isolats est supérieur, à celui des souches de références.

II.4.3. Interaction entre les souches lactiques thermophiles et les souches pathogènes et/ou phytopathogènes

Les dix souches lactiques testées, dont 05, sont des lactobacilles thermophiles (*Lb1*, *Lb2*, *Lb3*, *Lb4*, *Lb5*), et 05 sont des Streptocoques thermophiles (*St1*, *St2*, *St3*, *St4*, *St5*), présentent, une activité inhibitrice, plus ou moins variée, vis-à-vis des espèces pathogènes, à paroi Gram positif et à paroi Gram négatif, ainsi contre, les espèces eucaryotes pathogènes et phytopathogènes.

D'après nos résultats, il en ressort que, la plupart des souches de lactobacilles sélectionnées (deux souches: **Lb2** et **Lb3**), sont à l'origine des zones d'inhibitions, importantes contre, *Penicillium* sp. et *Fusarium* sp., avec un diamètre de **12mm** et la souche

St2 est, à l'origine d'une zone d'inhibition importante contre *Candida albicans*, par rapport aux autres souches, de *strptococcus thermophilus*, avec un diamètre de **12mm**. Par contre, les souches ayant une activité inhibitrice, contre les souches procaryotes à paroi Gram positif et à paroi Gram négatif sont: *St4*, *St1*, *St5* et *Lb1* contre *E.coli* A1 et *Micrococcus* sp. respectivement, avec un diamètre d'inhibition de **15mm**.

L'effet inhibiteur contre *Enterococcus* sp., est exercé par les deux souches d'espèces: *St1* et *Lb1* avec une zone d'inhibition de **15mm** de diamètre.

Ces résultats, indiquent que, nos souches lactiques sont capables de synthétiser des substances inhibitrices, ayant une activité antibactérienne. L'ensemble des surnageants brutes actifs (SBA des souches lactiques thermophiles), pures et mixtes; ne présentent pas, le même spectre d'action vis-à-vis des bactéries pathogènes. La majorité de ces SBA, sont actifs sur les bactéries à Gram positif mais non pas d'effet inhibiteur, contre toutes les bactéries à paroi Gram négatif (**Onda et al., 2003**).

En outre, **Onda et al., (2003)**; suggèrent que; les bactéries Gram positif; sont généralement plus sensibles à l'effet bactéricide des bactéries lactiques.

Par ailleurs, les bactéries lactiques, sont connues, par leur production, d'une multitude de composés antimicrobiens: les acides organiques, les bactériocines, le diacétyle et le peroxyde d'hydrogène (**Titiek et al., 1996; Aslam et Qazi, 2010**).

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

La fraction extracellulaire correspondante, au surnageant(SBA) présente, un fort pouvoir antimicrobien, ce qui confirme la production des agents antimicrobiens par les souches lactiques dans le milieu. Plusieurs études, ont montrées que, la fraction extracellulaire contient des substances responsables de cette interaction (**Metlef et Bouras, 2009**).

Les bactéries lactiques thermophiles, sont capables de produire deux métabolites majeurs (acides organiques et bactériocines), responsables de l'effet antagoniste.

Les bactéries lactiques hétérofermentaires, peuvent produire, des quantités notables d'acides organiques; autres que l'acide lactique et c'est le cas des souches lactiques thermophiles hétérofermentaires, qui produisent autant d'acétate que de lactate. L'acide acétique exerce une forte action inhibitrice, à l'encontre de nombreux microorganismes (**Bourgeois et Larpent, 1996**).

Par ailleurs, certaines espèces lactiques, thermophiles, produisent des bactériocines à spectre varié d'inhibition (**Bourgeois et Larpent, 1996; Campos et al., 2006**).

L'abaissement du pH dans les milieux MRS et M17 liquides signifie que, chacune des deux souches lactique possède un effet acidifiant, en produisant des acides organiques, les principaux facteurs d'inhibition (**Mathot et al., 1996; Choisy et al., 1997; Ait abdelouahab, 2001**).

Selon **Fontaine et Hols, (2008)** l'espèce *Streptococcus thermophilus*, renferme un système génétique: *thermophilus* LMD-9, qui détiennent la totalité de l'information génétique requise pour la production d'une bactériocine «la bactériocineTh 9». Par l'usage de la technique de mutation – déletion, ces auteurs ont démontré, la présence de trois opérons: blp(st)–orf 2; blp(st)–orf3 et blp- E(st) –orf (st), ces résultats ont confirmés que l'opéron: blp(st), code pour un système bactériocinogène multi-peptide nommé *Thermophilin9* actif contre des espèces *Streptococcus thermophilus* et autres bactéries à paroi Gram positif.

Whitford et al., (2007) dans une étude, sur des souches *Streptococcus* sp., isolées du rumen, (07) souches sur un totale de (35) isolats, inhibent la croissance des autres Streptocoques lactiques, dont trois parmi les sept ont été caractérisé, ces bactériocines sont protéases sensibles, active à une intervalle du pH de **01 à 12**, de même sont thermolabiles, l'activité inhibitrice, a été conservée après un chauffage pendant 15minutes à 100°C.

En effet, l'étude entreprise par **Yang et al., (1992)**, a montré que, la production de bactériocine, par les bactéries lactiques, est fortement dépendante des souches, de la composition du milieu de culture, du pH final du milieu, du temps d'incubation, de la température optimale de croissance, et surtout, elle nécessite l'utilisation des milieux de cultures, riches et complexes. **Bogovic-Matijasic et Rogel, (1998); Gomes et al., (1998); Vinod Kumar et al., (2006)**, ont démontré que le pH optimal de production des bactériocines, par les bactéries lactiques, est de 06,5, de plus, ils ont confirmé que, l'action de ces bactériocines, est maximale au même pH (06,5).

En outre, la différence dans l'activité inhibitrice, entre les souches, d'une même espèce, peut être due à une faible homologie de leurs acides nucléiques responsables des caractères héréditaires (**Sutra et al., 1998**).

Chumchalova et al., (1995; 1998), ont purifié et caractérisé l'acidocine CH5, produite par *Lactobacillus acidophilus*CH5. L'acidocine CH5, a été classée parmi le groupe II des bactériocines.

Ten Brink et al., (1990); ont utilisé la méthode d'extraction, par les solvants organiques pour la purification de l'acidocine B, issue d'une souche de *Lactobacillus acidophilus* M46.

II.5. Résistance aux antibiotiques

Les résultats obtenus, montrent que la souche *St1*, isolée du lait de chèvre est, la plus résistante aux ATB (E, Ak, Do, AMC, Sp et IMP), suivie par la souche *Lb1*, isolée du lait de brebis (Ntx, E, AMC, Sp et IMP), le reste des souches lactiques (*St3* et *Lb2*), sont sensibles à tous les gammes d'ATB testés, à l'exception de la souche *St2* (Ak)

Plusieurs études ont montrées, la résistance naturelle d'une gamme importante d'espèce de bactéries lactiques aux antibiotiques (**Botes et al., 2008**). La résistance de souches de *Leuconostoc* sp. à la Vanomycine, Gentamicine et la Chloramphénicol, a été bien élucidée (**Ogier et al., 2008**).

De même, que pour des espèces de *Lactococcus lactis*, qui ont présentés des résistances à l'Ampicilline et la Vanomycine (**Donohue, 2004**).

Il est nécessaire, avant de lancer un produit probiotique, de vérifier que les souches bactériennes impliquées, ne contient pas des gènes de résistance aux antibiotiques (**Ammor et Mayo, 2007**).

Mais, selon **Donohue, (2004)**, le criblage de telles souches pour la reconstitution de ferments lactiques, n'est pas encore entrepris, à cause des difficultés de l'évaluation in vivo du potentiel de transfert de gènes de résistance.

La résistance des souches lactiques thermophiles, aux antibiotiques, peut poser un problème, si elle est transmise, à des souches pathogènes; chez lesquels, la résistance thérapeutique, pourrait avoir des conséquences néfastes. L'utilisation de différentes souches lactiques en tant que probiotique, doit faire l'objet de travaux extrêmement attentifs (**Marteau et Seksik, 2004**).

De même l'autorité Européenne de Sécurité Alimentaire, à suggérée que, les souches lactiques, sélectionnées pour un but industriel, ne doivent pas avoir une résistance acquise aux antibiotiques (**Zago et al., 2011**).

II.5. Les analyses physicochimiques du lait cru

II.5.1. Potentiel d'hydrogène (pH)

Les valeurs recueillies, lors de cette mesure, donnent une moyenne de pH pour les échantillons du lait caprin, bovin et ovin, qui est respectivement **6,73 ± 0,12; 7,75±0,14** et **6,66±0,15**.

Il apparait que les échantillons du lait de vache présentent, le pH le plus élevé (basique), alors que les échantillons du lait de chèvre, ont des valeurs proches du lait de brebis.

La diminution, du pH du lait, juste après la traite, résulte d'une probable infection de la mamelle de l'animal (**Morgan, 1999**), mais aussi due au facteurs génétiques qui sont les

seuls, ont une grande influence sur la variation du pH du lait (**Remeuf, 1993; Remeuf et al., 2001**).

Ces valeurs sont en concordance avec celles rapportées, par un grand nombre d'auteurs tel qu'**Imran, (2008)**, qui a enregistré, un pH de **06,59** pour le lait de caprin, **06,80** pour le lait de vache et **06,85** pour le lait de brebis, **Drackova et al., (2008)** à **06,63;06,82** et **06,83** et **Remeuf et al., (2001)** à **06,64; 06,83** et **06,84** respectivement.

Le pH du lait frais à 20°C, varie entre **06,6** et **06,8**. Plutôt proche de **06,6** immédiatement après, la traite. Le potentiel d'hydrogène du lait, d'une espèce donnée, varie selon le stade de lactation, il diminue vers la fin du cycle, suite à l'augmentation du taux de caséines et de phosphates (**Singh, 1972; Alais, 1984**).

Il est à noter aussi que, le pH est, fortement lié, à la variation de la température, c'est pourquoi il faut toujours ajuster la température à 20°C, lors de l'indication d'une valeur pH (**Brule, 1987; Tango et Ghaly, 1999**). Il est important de noter, que le pH, est lié aussi à la qualité du lait cru (**AFNOR, 1980; Alais, 1984**).

II.5.2. L'acidité titrable en degré Dornic (°D)

Le degré Dornic (°D): est une expression, de l'acidité développée dans le lait, par transformation du lactose, en acide lactique, un degré Dornic correspond à 0,1g d'acide lactique dans un litre de lait (**Luckas et Reyrolle, 1989; Chamba et Prost, 1989**).

Dans cette présente étude, on a constaté que, les échantillons du lait, des trois espèces laitières, ont enregistré ,des moyennes d'acidité titrable de;**16,53°D,15,68°D**.et **24,00°D**, pour les échantillons de lait de chèvre, vache et brebis respectivement, révèlent, un bon état sanitaire du lait, en référence au fait que certaines laiteries, donnent la limite d'acceptation d'acidité titrable du lait à **18°D** pour le lait de chèvre, **17°D** pour le lait de vache et **25°D** pour le lait de brebis. Le lait d'espèce bovine, représente l'acidité, la plus élevée par apport aux échantillons, des deux autres espèces laitières; caprine et ovine.

L'augmentation de l'acidité est un indicateur de la qualité de conservation, du lait (**Cassinello et Pereira, 2001**), et ne peut résulter que, d'un développement conséquent de la flore lactique, influencée par, le jeu combiné de l'augmentation de la température, ainsi que la durée de conservation du lait.

Comparativement à la littérature, nos échantillons, se caractérisent par des moyennes comprise dans la fourchette de variation, avec une limite inférieure à **10°D** (**Sawaya et al., 1984**) et supérieure à **21,4°D** (**Cassinello et Pereira, 2001**).

La valeur de **17°D** relevée par les auteurs suivant: **Cassinello et Pereira, (2001); Keskin et al.,(2004)** et **Aghotrim et Rajkumar, (2007)**, peut être tenue, pour acidité caractéristique du lait de chèvre et du lait de vache.

II.5.3. La teneur en lactosérum et en matière insoluble

L'eau est l'élément, le plus important du lait sur, le plan pondéral soit **88,6 %** du poids total. Elle tient en suspension tous les autres éléments (glucides, lipide, protéines et divers sels minéraux). La détermination de sa teneur, permet de détecter les mouillages (**Fresse et Paul-pascal, 1993; Gelais, 2002**).

L'extrait sec ou matière sèche totale du lait, est composé par les constituants du lait autres que l'eau. L'extrait sec joue, un rôle dans la technologie de transformation du lait surtout, en fromagerie en influençant les rendements (**Fresse et Paul-pascal, 1993; Gelais, 2002**).

En ce qui concerne, la teneur en lactosérum et la matière insoluble, nous avons obtenus des moyennes rapprochées, entre le lait de chèvre (**81,73%; 18,26%**) et le lait de brebis (**81,25%; 18,75%**), contrairement au lait de vache qui renferme (**85%; 14,88%**) respectivement.

II.5.4. La viscosité

Dans la présente étude, nous avons constaté une similarité des moyennes de la viscosité dans les échantillons du lait cru des trois espèces laitières: lait de chèvre (**2,80 mPa.s**), vache (**2,84 mPa.s**) et brebis (**2,88 mPa.s**).

II.5.5. La conductivité électrique

La conductivité électrique, d'un échantillon, dépende de sa résistance électrique. Pour le lait, cette caractéristique est déterminée par sa concentration en ions: Na⁺, K⁺ et Cl⁻ (**Mabrook et Petty, 2001**).

D'après **Hamann et Zeconi, (1998)**; les protéines et le lactose, ont peu d'influence sur la conductivité électrique.

En revanche, le taux de matière grasse, peut interférer avec la conductivité puisqu'elle diminue quand le pourcentage des corps gras (**Mabrook & Petty, 2001; 2003**). Ce phénomène, est dû au fait que plus de **97%** des lipides du lait sont sous la forme de grosses globules, couvertes d'une membrane non conductrice. Il y a donc moins de volume et de mobilité pour les ions (**Mabrook et Petty, 2001; 2003**).

La conductivité électrique du lait, est en général comprise entre **04** et **05,5mS/cm** à **25°C** (**Billon et al., 2001; Norberg et al., (2004)**), trouvent des valeurs de conductivité du lait, issu de quartiers sains comprises entre **05,5** à **06,5mS/cm** à **38°C**. La plus part des échantillons du lait cru, des trois espèces laitières étudiées, ont enregistré, des valeurs de conductivité électrique; entre (**04,16-05,65 mS/cm**) pour le lait de chèvre, (**03,72-06,3mS/cm**) pour le lait de vache et (**3,83-5,86mS/cm**) pour le lait de brebis.

De nombreux auteurs, ont donc, conclu d'après leurs travaux que, la conductivité électrique du lait, est un excellent potentiel pour la détection des mammites (est l'inflammation de la mamelle), chez les espèces laitières (**Biggadike et al., 2002; Santos et al., 2004; Cavero et al., 2006; Cavero et al., 2008; Kamphuis et al., 2008**).

II.5.6. L'évolution de la teneur en azotes et en protéines totales

La teneur en protéines des deux espèces laitières, caprine (**20,18±1.53g/l**) et bovine (**16,17± 0.65 g/l**), est moins élevée que, celle observée chez l'espèce ovine (**26,35± 0.58 g/l**).

Les échantillons de lait de chèvre et vache, en comparaison avec le lait de brebis, présentent, une carence en protéines totales. Cet écart s'explique, par les faibles teneurs en protéines totales, lors de la période de collecte (**Masle et Morgan, 2001**).

Les valeurs de l'azote total de lait caprin, bovin et ovin; **03,16 g/l, 02,54 g/l** et **04,12 g/l** respectivement, sont inférieures à celles rapportées par **Serhan et al., (2008)**.

Ces diminutions, en protéines et en azote total, pour le lait de chèvre et vache, peuvent être liées à l'activité protéolytique exercée, par les enzymes de la flore originelle du lait (**Donkor et al., 2007**).

Auldist et al., (1998), ont reporté que la composition physico-chimique du lait cru dépend essentiellement, du stade de lactation, la période de l'année (saison) et le régime alimentaire des espèces laitières.

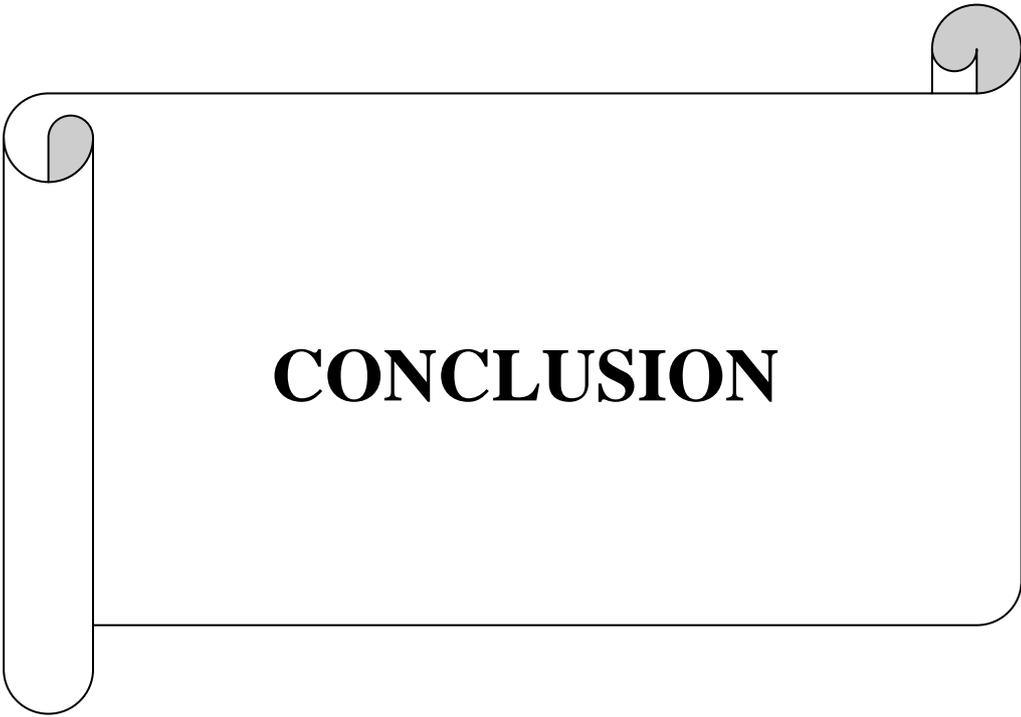
II.5.7. La densité

Le contrôle de la densité, est un test simple, permettant de vérifier que, le lait n'a pas été mouillé (dilué avec de l'eau). La densité normale du lait, est de **01,033**. Si la densité, est inférieure à **1,028** le lait est mouillé (**Mathieu, 1998**).

Les résultats illustrés dans les tableaux 22, 23, 24, montrent que la densité du lait de chèvre varie entre **01,025** et **01,040**, avec une moyenne de **01,031±0,01**, tandis que celle du lait de vache est comprise entre **01,02** et **01,035** avec une moyenne de **01,029±0,005**. et **01,030** et **01,035** pour le lait de brebis, avec une moyenne de **01,02±0,005**. On constate que ces valeurs, sont similaires à celles rapportées par la **FAO, (2010)** soit **1,028-1,033**.

Durant les mesures, toutes les valeurs de la densité du lait de chèvre, vache et brebis, étaient conformes aux normes, sauf pour un échantillon du lait de chèvre (**01,040**) et le lait de vache (**01,02**).

Le lait est un liquide blanc mat, légèrement visqueux, dont la composition et les caractéristiques physico-chimiques varient sensiblement selon les espèces animales et selon les races. Ses caractéristiques varient également au cours du stade de lactation, ainsi qu'au cours de la traite.



CONCLUSION

Conclusion:

Au terme d'achèvement, de cette étude, portée sur 32 échantillons des laits crus collectées dans différentes régions, situées aux hauts plateaux de Nord-est d'Algérie, à partir des fermes d'élevage extensifs, des trois espèces laitières: Caprine, Ovine et Bovine; il ressort que:

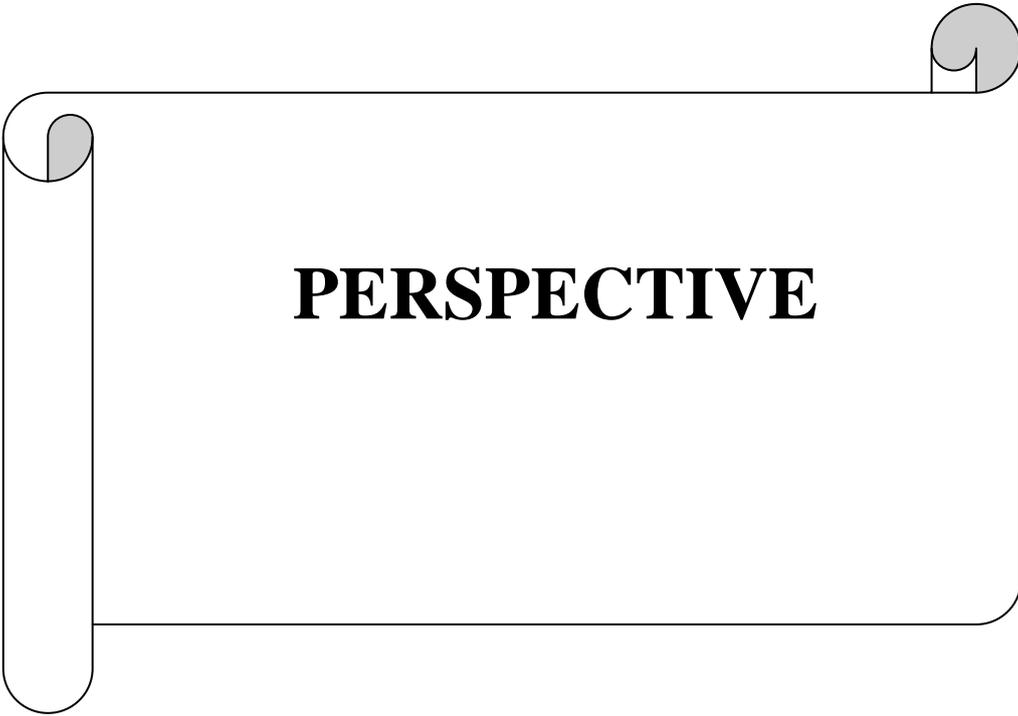
L'analyse des huit paramètres physico-chimiques, a dévoilée, une qualité des laits; proche de celle mentionnée dans la littérature, avec une richesse en protéines du lait d'espèce ovine, celui d'espèce caprine était le plus riche en lactose.

Le contrôle de la qualité hygiénique pour les 13 échantillons, a montré, la présence des germes indicateurs, des pollutions fécales exogènes, et la présence de certaines espèces pathogènes, ce qui constitue une menace pour la santé publique.

L'estimation des charges, en flores lactiques, autochtones, thermophiles, à 44°C; à révéler, une richesse des échantillons en ces bactéries. Les laits des espèces étudiées; semblent des niches écologiques de choix, pour les flores lactiques thermophiles. L'identification des isolats a été partielle, basée essentiellement sur les milieux de culture utilisés, leurs agents sélectifs relatifs, les pH de départ, la température et quelques paramètres physiologiques et biochimiques.

L'exploration du comportement, des isolats lactiques thermophiles, sélectionnés, en milieu technologique, par le suivi de la cinétique d'acidification; a présentée des souches ayant des profils acidifiants dépassant celui des souches de références, pour la plupart homofermentaires, avec une croissance sur des milieux hostiles (hypersalés), et une intense activité protéolytique; d'où l'intérêt de leur usage comme levains thermophiles, starters artisanal.

En outre, l'étude des interactions, par réalisation des antagonismes in vitro, diriger contre les flores indicatrices eucaryote et procaryote (à paroi Gram négatif et à paroi Gram positif), à montrer des effets bactériocinogéniques, surtout contre les souches cibles procaryotes, d'où les perspectives d'extraction des molécules bioactifs, pour l'amélioration de la conservation des denrées alimentaires.

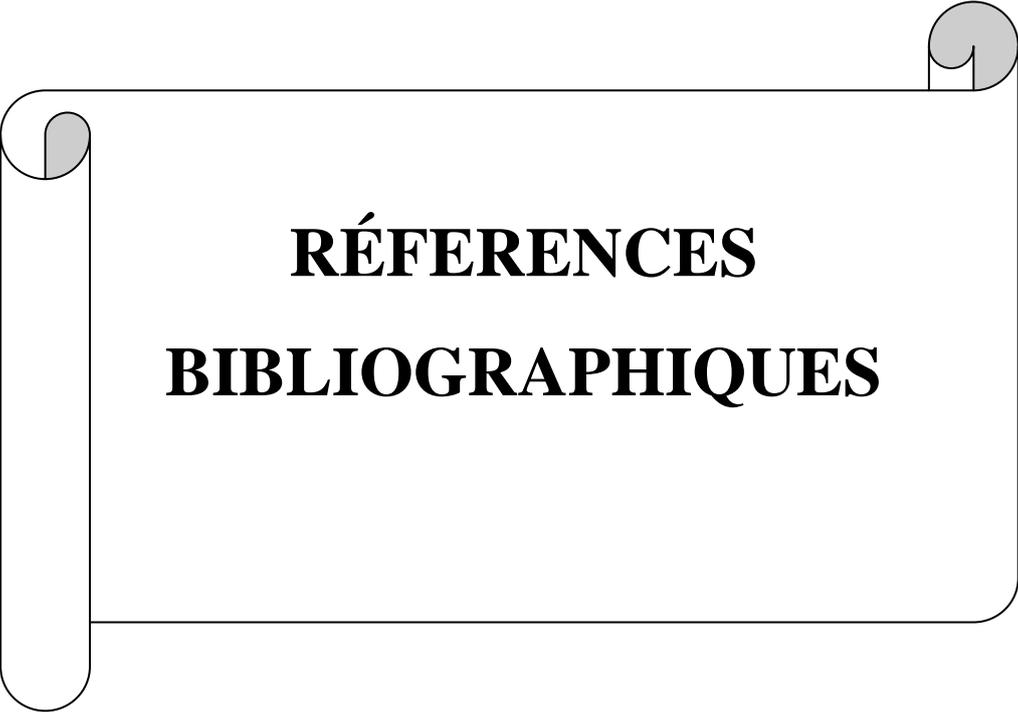


PERSPECTIVE

Perspective:

La présente étude, portée sur 32 échantillons des laits crus de 03 espèces laitières, avec (08) paramètres physico-chimiques, et de dénombrement de (07) groupes microbiens, reste partielle, d'où, l'impératif d'être complété par:

- Pour le contrôle de qualité physico-chimique, une analyse avec plus d'effectif en échantillon, en espèce laitière, et de région.
- D'autres paramètres doit être inclus, (effet de la saison, typologie d'élevage, stade de lactation et espèce (race) laitière, avec un traitement statistique adéquats
- Pour le control microbiologique de qualité, d'autres micro-organismes doit être recherchés (*Listeria* sp., *Mycobacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Brucella* sp. et des molécules telles que les mycotoxines et les antibiotiques.
- L'identification génétique (PCR, SDS-PAGE), des souches, d'intérêt technologique.
- Exploration du profil biotechnologique (acidification, aromatisation et probiotique de souches thermophiles isolées en culture pures et mixtes).
- Extraction, quantification et purification des éventuelles bactériocines par des techniques biochimiques (HPLC, CPG).



RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques:

- Aasen I. M., Mbretb T., Katla T., Axelsson L., Stbrb I.** (2000). Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 53, Pp: 159-166.
- Adams M. R. & Marteau P.** (1995). On the safety of lactic acid bacteria from food. *Int Jo Food Microbiol*, 27, Pp: 263-264.
- Adrian J.** (1987). Les vitamines. In: **CEPIL**. Le lait matière première de l'industrie laitière. *CEPIL-INRA*, Paris, Pp: 113-119.
- AFOR** (Association Française de Normalisation). (1980). Lait. Détermination de la matière sèche. NF VO 4 207, In: AFNOR (Ed), Recueil de normes françaises. Laits et produits laitiers. Méthodes d'analyse. Paris : Normalisation française, Pp:33-34.
- Aggad H., Mahouz F., Ahmed-Ammar Y & Kihal M.** (2009). Evaluation de la qualité hygiénique du lait dans l'ouest Algérien. *Revue Méd.Vét.*, 160, 12, Pp: 590-595.
- Agnhotrim K. & Rajkumar V.** (2007). Effect of breed and stage of lactation milk composition of western region goats of India. *International of Dairy Science*, 2(2), Pp: 172-177.
- Aguirre M. & Collins M. D.** (1993). Lactic acid bacteria and human clinical infection. *Jo Appl. Bacteriol*, 75, Pp: 95-107.
- Ait abdelouahab N.** (2001). Microbiologie alimentaire. Office des publications universitaires, Alger, Pp: 23.
- Alais C.** (1984). Science du lait: principes des techniques laitières. 4^{ème}Ed., *SEPAIP*. Paris, Pp: 162-814.
- Alakomi H. L., Skytta E., Saarela M., Mattila-Sandholm T., Latva-Kala K. & Helander I. M.** (2000). Lactic acid permeabilizes Gram negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl Environ Microbiol*, 66, Pp: 2001-2005.
- Allouche F.N., Hellal A. & Laraba A.** (2010). Etude de l'activité antimicrobienne des souches de Lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. *Revue Nature et Technologie*. N° 03, Pp: 13-20.
- Alves d'Oliveira L.** *Composition chimique du lait* Cours de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, Alimentation des Animaux, mis à jour le 27/02/2007, [en ligne], [<http://www2.vet-lyon.fr/ens/nut/webBromato/cours/cmlait/compolai.html>].
- Amhour F., Said B., Hamama A. & Zahar M.** (1998). Qualité microbiologique du lait cru: Cas de la région d'Errachidia. *Actes Inst. Agron. Vet.* (Maroc), 18(1), Pp: 31-35.
- Amior J., Fournier S., Lebeuf Y., Paquin P. & Simpson R.** (2002). Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait. In: Science et technologie du lait Transformation du lait. *Fondation de technologie laitières du Québec INC ISBN*. 2-553-01029-x., Pp: 01.
- Ammor M. S. & Mayo B.** (2007). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production. *Meat. Science*, 76, Pp: 138-146.
- Arous S., Dalet K. & Héchard Y.** (2004). Involvement of the mpo operon in resistance to class IIa bacteriocins In: *L. monocytogenes*. *FEMS Microbiol. Lett*, 238, Pp: 37-41.
- Aslam S. & Qazi J. I.** (2010). Isolation of *acidophilic lactic* acid bacteria antagonistic to microbial contaminants. Pakistan. *Jo. Zool*, 42(5), Pp: 567-573.
- Aslim B. & Beyatli Y.** (2004). Antibiotic Résistance and Plasmid DNA contents of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from Turkish yogurts. *Turk. Jo. Vet. Scie.*, 28, Pp: 257- 263.

- Aslim B., Vuksekdağa Z. N., Sarikayub E. & Beyatli Y.** (2005). Determination of the bacteriocin like substance produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products. *LWT*, 38, Pp: 691-694.
- Asperger H.** (1994). *Staphylococcus aureus*. In: The significance of pathogenic microorganisms in raw milk (G. Hahn, Edit.). Monographie, Document N° 9405, *Fédération internationale de laiterie*, Bruxelles, Pp: 24-42.
- Auclair J. & Accolas J. P.** (1983). Use of thermophilic lactic starters in dairy industry. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 49, Pp: 313-326.
- Auldist M. J., Walsh B. J. & Thomson N. A.** (1998). Seasonal and lactational influences on bovine milk composition in New Zealand. *Jo. Dairy Res*, 65, Pp: 401-411.
- Awad S., Hassan A. N. & Halweish F.** (2005). Application of exopolysaccharides producing cultures in reduced-fat cheddar cheese: Comparison and proteolysis. *Jo. Dairy Sci.*, 88(12), Pp: 4195-4203.
- Axelsson L.** (2004). Classification and physiology. In: **Salsinen, S., Wright, A.V., Ouwehand, A. (Eds).** *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects (3eme Edition)*. *Marcel Dekker, Inc. New York, USA*. Vol, 633, Pp: 1-66.
- Ayhan K., Durlu-ozkaya F. & Tunail N.** (2005). Commercially important characteristics of Turkish origin domestic strains of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Int. Jo. Dairy Technol*, 58(3), Pp: 150-157.
- Badis A., Sellami N., Guetarni D., Kihal M. & Ouzrout R.** (2005). Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales "Arabia et Kabyle". *Sciences & technologie*, 23, Pp: 30-37.
- Bauer R. & Dicks L. M. T.** (2005). Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. *Int. Jo. Food Microbiol*, 101, Pp: 201-216.
- Beal C., Fonseca F., Corrieu G.** (2000). Resistance to freezing and frozen storage of *Streptococcus thermophilus* is related to membrane fatty composition. *Jo.Dairy.Sci.*, 84, Pp: 2347-2356.
- Béal C., Marin M., Fontaine E., Fonseca F & Obert J. P.** (2008). Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. In: Corrieu G. & Luquet F. M. (Ed). *Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments. Tec & Doc Lavoisier*, Paris, Pp: 661-785.
- Bedar.N.** (2007). Rejet de Galactose par *Streptococcus thermophilus* au cours d'une croissance sur milieu lactosé: Role de GALM. Thèse pour l'obtention du grade de maitre et sciences (M.Se) en Biochimie, *Université Laval, Quebec, Canada*, Pp:10-13, 16-18.
- Beerens H. & Luquet M.F.** (1987). Guide pratique d'analyse microbiologique des laits et produits laitiers. *Tec & Doc, Lavoisier*. Paris, Pp: 1-144.
- Bennama R., La dero V., Alvarez M. A., Fernandez M. & Bensoltane A.** (2012). Influence of lactose and sucrose on growth and Acetaldehyde production by three strains of *Streptococcus thermophilus*. *International Conference on Applied Life Science.Turkey*, Pp: 223-227.
- Bidaud O., Houffschmitt P. & Viguerie Y.** (2007). Étiologie des mammites Bovines en France entre 2005-2007. Journées bovines nantaises, Pp: 121-122.
- Biggadike H. J., Ohnstad I., Laven R. A., Hllerton E.** (2002). Evaluation of measurements of the conductivity of quarter milk samples for the early diagnosis of mastitis. *The Veterinary Record*, 150, Pp: 655-658.

- Billon P. M., Enard J. L., Berny F., Gaudin V.** (2001). La détection des mammites par la mesure de conductivité électrique du lait. *Bulletin des GTV*, 12, Pp: 35-39.
- Blains S.** (2004). Intérêts et techniques de l'identification bactérienne des germes de mammites au cabinet vétérinaire. Journées Nationales des G.T.V., Tours, Pp: 811-820.
- Blanc.** (1982). Les protéines du lait à activité enzymatique et hormonale. *Lait*, 62, Pp: 350-395.
- Blom H. & Mortvedt C.** (1991). Anti-microbial substances produced by food associated micro-organisms. *Biochem Soc Trans*, 19 (3), Pp: 694-8.
- Bocquier F., Caja G.** (2001). Production et composition du lait de brebis: Effets de l'alimentation. *INRA prod. Anim.* 14, (2), Pp: 129-140.
- Bogovic-Matijasic B. & Rogelj I.** (1998). Bacteriocin complex of *Lactobacillus acidophilus* LF221, production studies in MRS-media at different pH-values and affect against *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009. *Processes in Biochemistry*, 33, Pp: 345-352.
- Bolotin A., Quinquis B., et al.** (2004). "Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*." *Nat Biotechnol* 22 (12), Pp: 1554-8.
- Bonfoh B., Wasem A., Traore A. N., Fane A., Spillmann H., Simbe C. F., Alfaroukh I. O., Nicolet J., Farah Z. & Zinsstag J.** (2003). Microbiological quality of cows' milk take en at different intervals from the udder to the selling point in Bamako (Mali). *Food Control*, 14(7), Pp: 495-500.
- Botes M., van Reenen C. A. & Dicks L .M. T.** (2008). Evaluation of *Enterococcus mundtii* ST4SA and *Lactobacillus plantarum* 423 as probiotics by using a gastro-intestinal model with infant milk formulations as substrate. *Int. Jo. Food Microbiol*, 128, Pp: 362-370.
- Boublenza F., Zadi-karam H. & Karam N. E.** (2011). Physiological Responses of salt stress and osmoprotection with proline in two strains of *lactococci* isolated from camel's milk in Southern Algeria. *African Journal of Biotechnology*, Vol. 10(83), pp: 19429-19435.
- Boukhemis M, Djeghri-Hocine B, Tahar A. & Amrane A.** (2009) Phenotypic characterization *Lactobacillus* strains isolated from different biotopes. *African Journal of Biotechnology* Vol. 8 (19), Pp: 5011-5020.
- Bourgeois C. M. & Larpent J. P.** (1996). Microbiologie alimentaire: Aliments fermentés et fermentations alimentaires. *Tec & Doc, Lavoisier*. Paris, Pp: 432-704.
- Bouttefroy A. & Millière J. B.** (2000). Nisin-curvaticin 13 combinations for avoiding the regrowth of bacteriocin resistant cells of *L. monocytogenes* ATCC15313. *Int. Jo. Food Microbiol.*, 62, Pp: 65-75.
- Bouzaid M., Chatoui R., Hasib A. & Mennane Z.** (2012). Qualité hygiénique du lait de colportage prélevé des points de vente de la ville de Rabat. *Les Technologies De Laboratoire*, 7, N: 26, Pp: 6-11.
- Brule G.** (1987). Les minéraux .In: CEPIL. Le lait matière première de l'industrie laitière. *CEPIL-INRA*, Paris, Pp:87-98.
- Cachon R., Jeanson S., Aldarf M. & Divies C.** (2002). Characterization of lactic starters based on acidification and reduction activities. *Lait*, 82, Pp: 281-288.
- Cadirci H. & Çitako S.** (2005). A Comparison of two methods used for measuring antagonistic activity of lactic acid bacteria. *Pakistan Journal of Nutrition*, 4(4), P: 237-24.
- Camille D.** (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Edition *Lavoisier*, Pp: 128, 129, 269, 271.

- Campos C. A., Rodriguez O., Calo-Mata P., Prado M. & Barros-Velazquez J.** (2006). Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). *Food Res. Int.*, 39, Pp: 356-364.
- Caplice E. & Fitzgerald G. F.** (1999). Food fermentations: Role of microorganisms in food production and preservation. *Int Jo Food Microbiol*, 50 (1-2), Pp: 131-49.
- Cardinal P.** (2003). Lignes directrices pour l'interprétation des résultats analytiques en microbiologie alimentaire, comité provincial sur l'uniformisation et l'interprétation des critères microbiologiques des aliments. *Edition Québec*, Pp: 44-46.
- Carole L.** (2002). Science et technologie du lait: Transformation du lait. Montréal Presses Internationales Polytechnique, Pp: 131-583.
- Cartier P., Chilliard Y.** (1984). Dosage de l'activité lipasique et des acides gras libres du lait par titration automatique calorimétrique. *Lait*, 64, Pp: 340-355.
- Carvalho A. S., Silva J., Ho P., Teixeira P., Malcata F. X., Gibbs P.** (2004). Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *Int Dairy Jo.*, 14, Pp: 835-847.
- Cassinello J. & Pereira S.** (2001). La qualité du lait et du fromage exploitations caprines de la Serra do calderao. *CIHEAM, Options Méditerranéennes, Serie A, séminaire méditerranéens*, 46, Pp: 157-161.
- Castellano P. et al.** (2007). Molecular view by fourier transform infrared spectroscopy of the relationship between lactocin 705 and membranes: speculations on antimicrobial mechanism. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(2), Pp:415-420.
- Cavero D., Tölle K.H., Buxade C., Krieter J.** (2006). Mastitis detection in dairy cows by application of fuzzy logic. *Livest. Prod. Sci.*, 105, Pp: 207-213.
- Cayot P., Lorient D.** (1998). Structures et technofonctions des protéines du lait. *Ari lait. Recherche, Lavoisier*, Paris, 363, p: 07.
- Chamba J. F. & Prost F.** (1989). Mesure de l'activité acidifiante des Bactéries lactiques, thermophiles pour la fabrication de fromage à pâte cuite. *Lait*, (69), Pp: 417-431.
- Chamba J. F.** (1990). Pas de piston pour les bactéries lactiques thermophiles. *Revue Laitière Française*, 492, Pp: 47-50.
- Charalampopoulos D., Pandiella S. S., Webb C.** (2002). Growth studies of potentially probiotic lactic acid bacteria. In: cereal-based substrates. *Journal of Applied Microbiology*, 92, Pp: 851-859.
- Chavez, A. C. S. D., Ruay-Madudo, P., Starrenburg M., Hugenholtz J. & Lerayer A. L. S.** (2003). Impact of engineered *Streptococcus thermophilus* over expressing gly a gene on folic acid and acetaldehyde production in fermented milk. *Brasilian. Jo. Microbiol*, 34, Pp: 114-117.
- Chekroun A. & Bensoltane A.** (2007). Nutritional characterization of fermented cow's milk at 45°C by *Lactobacillus acidophilus* and *bifidobacteria*. Egypt. *Jo. Appl. Sci.*, 22(12A), Pp: 188-202.
- Cherigene A., Chougrani F. & Bensoltane A.** (2006). Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian goat's milk. Pakistan. *Jo. Biol. Sci.*, 9(7), Pp: 1242-1249.
- Cherigene A., Chougrani F., Bekada A. M. A., El soda M. & Bensoltane A.** (2007). Enumeration and identification of lactic microflora in Algerian goat's milk. *Af. Jo. Biot.*, 6, (15), Pp: 1854-1861.
- Choisy M., Desmazeaud M., Gueguen M., Lenoir J., Schmidt J-I. & Tourneur C.** (1997). Les phénomènes microbiens Chapitre 10. In: Le fromage 3ème Edition, *Tec & Doc, Edition Lavoisier*, Pp: 381-429.

- Chougrani F., Cherigene A. & Bensoltane A.** (2006). Identification and some technological properties of lactic acid bacteria isolated from Algerian ewe's milk. *Egypt. Jo. Appl. Sci.*, 21(8), Pp: 148-157.
- Chougrani F., Cherigene A. & Bensoltane A.** (2008). Use of lactic strains from Algerian ewe's milk in the manufacture of a natural yogurt. *Af. Jo. Biotech.*, 7(8), Pp: 1181-1186.
- Christensen H. B., Salomon A. & Kokholm G.** (1991). International pH Scales and Certification of pH, *Anal. Chem.* Vol. 63, no. 18, Pp: 885-891.
- Chumchalova J., Jytte J. J., Plockova M.** (1995). Characterization of acidocin CH 5, a saccharolytic sensitive bacteriocin of *Lactobacillus acidophilus* CH 5. *Advances In Food Sciences*, 17, Pp: 145-150.
- Chumchalova J., Josephsen J., Plockova M.,** (1998). The antimicrobial activity of acidocin CH5 in MRS broth and milk with added NaCl, NaNO₃ and lysozyme. *Int Jo Food Microbiol.*, 43, Pp: 33-38.
- Chye F. Y., Abdullah A. & Ayob M. K.** (2004). Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. *Food Microbiology*, 21, Pp: 535-541.
- Cleveland J., Montville T. J., Nes I. F., Chikindas M. L.** (2001). Bacteriocins: Safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. Jo. Food Microbiol.*, 71, Pp: 1-20.
- Condon S.** (1987). Response of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbial Rev.*, 46, Pp: 269-280.
- Corrieu G & Luquet F. M.** (2008). Bactéries lactiques de la génétique aux ferments. Edition *Technique et Document. Lavoisier*, Pp: 333-334, 690-691, 753.
- Croguennec T., Jeantet R., Brulé G.** (2008). Fondements physicochimiques de la technologie laitière. *Lavoisier, Tec et Doc*, Paris, Pp: 176.
- Daba H., Lacroix C., Huang J. & Simard R. E.** (1994). Influence of growth conditions on production and activity of mesentericin 05 by a strain of *Leuconostoc mesenteroides*. *Appl Microb Biotech*, 39, Pp: 136-173.
- Dalet K., Briand C., Cenatiempo Y. & Héchard Y.** (2000). The rpoN gene of *Enterococcus faecalis* directs sensitivity to subclass IIa bacteriocins. *Curr. Microbiol.*, 41(devil), Pp: 441-443.
- Davidson B. E., Kordias N., Dobos M. & Hillier A. J.** (1996). Genomic organization of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70(2-4), Pp: 161-83.
- De Buysse M. L. & Lapeyre C.** (1994). Mammites à *staphylocoques* et sécurité alimentaire. *Point vét.*, 26 (N° special), Pp: 905-908.
- De Buysse M.L.** (1996). Les *staphylocoques*. In: Microbiologie alimentaire, Tome 1 (C. Bourgeois et J.F. Mesclé, Edit.). *Technique et documentation, Lavoisier*, Paris, Pp: 106-119.
- De Man J.C., Rogosa M. & Sharpe M.E.** (1960). A medium for the cultivation of *lactobacillus* sp. *Jo. Appl. Bacteriol.*, 23, Pp: 130-135.
- De Roissard H. B.** (1986). Bactéries lactiques. In: Lait et produits laitiers : Vache, brebis, chèvre. Tome 3. Ed. *Tec et Doc. Lavoisier*. Paris, Pp: 191-203.
- De Roissard H. & Luquet F. M.** (1994). Bactéries lactiques. Vol. 1 et 2, Lavoisier.
- De Roissard H.** (1986). Bactéries lactiques. In: Lait et produits laitiers. Ed: F. Luquet; *Lavoisier Tech et Doc*, Pp: 343.
- De Vuyst L. & Vandamme E. J.** (1994). Bacteriocin of acid lactic bacteria. Blackie's academic and professional London.
- Deegan L. H., Cotter P. D., Hill C. & Ross P.** (2006). Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Jo Dairy.*, 16, Pp: 1058-1071.

- Dellaglio F., Bottazzi V., Trovatelli L. D.** (1973). Deoxyribonucleic acid homology and composition in some *thermophilic lactobacilli*. *Jo.Gen . Microbiol*, 74, Pp: 289-297.
- Dellaglio F., De Roissard H., Torriani S., Curk M. C., Janssens D.** (1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In: Bactéries lactiques. Edited by *Uriage. DRH El FeL*, vol 1, Pp: 25-116.
- Delorme C., Bartholini C., Luraschi M., Pons N., Loux V., Almeida M., Guédon E., Gibrat J. F., Renault P.** (2011). Complete genome sequence of the pigmented *Streptococcus thermophilus* strain JIM8232. *Jo. Bacterial*, 193(19), Pp: 5581-2.
- Delorme C., Poyart C., Ehrlich S. D. & Renault P.** (2007). Extent of horizontal gene transfer in evolution of *Streptococci* of the salivarius group. *Journal of Bacteriology*, 189, Pp:1330-1341.
- Denis C., Beal C., Bouix M., Chamba J. F., Jamet E., Ogier J. C., Panoff J. M., Rault A., Thammavongs B., Thierry A.,** (2006). Congélation de micro-organismes d'intérêt laitier: Optimisation des conditions d'adaptation des souches avant congélation et des conditions de remise en culture après congélation, *Les Actes du BRG*, 6, Pp:433-448.
- Denohue D. C.** (2004). Safety of novel probiotic bacteria. In: Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects (Salminen S., Wright A.V. & Ouwehand A.). 3ème Ed., *Marcel Dekker, Inc.* New York, Pp: 531-546.
- Diep D., Salehian Z., Holo H. & Nes I. F.** (2007). Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocin. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 104, Pp: 2384-2389.
- Djelouat S.** (1990). Le diagnostic biochimique. Bactérien-Edition Sciences et Technique. Constantine- Algérie, Pp:21-79.
- Donkor O. N., Henriksson A., Vasiljevic T. & Shaha N. P.** (2007). Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and in vitro angiotensin converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. *INRA, EDP Sciences*, 86, Pp: 21-38.
- Drackova M., Hadra L., Janstova B., Nauratlova P., Pridalova H. & Vorlova L.** (2008). Analysis of goat milk by near-infrared spectroscopy. *Acta Veterinaria*, 77, Pp: 415-422.
- Drici H.** (2010). Analyses biochimique, génétique et moléculaire de *lactocoques* protéolytiques issus du lait cru de chamelle d'Algérie. Thèse de doctorat en Biotechnologie, option: Microbiologie et Biologie Moléculaire, faculté des sciences. *Université Es'Senia d'Oran-Algerie*, Pp: 121.
- Drici H., Gilbert C., Kihal M., Atlan D.** (2010), Characterization of proteolytic lactic acid bacteria isolated from raw milk of camel from Algerian, *Jo Appl. Microbiol*, Feb, 108(2), Pp: 647-657.
- El-Ghaish S., Ahmadova A., Hadji-Sfaxi I., El Mecherfi K. E., Bazukyane I., Choiset Y., Rabesona H., Sitohy M., Popov Y. G., A. Kuliev A., Mozzi F., Chobert J. M. & Haertlé T.** (2011). Potential use of lactic acid bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods. *Tre. Food Sci., Technol*, Pp: 1-8.
- Enjalbert F.** (1993). Alimentation et composition du lait de vache. *Point vet.*, 25(156), Pp: 769-778.
- Ennahar S., Sashihara T., Sonomoto K. & Ishizaki A.** (2000). Class II a bacteriocins: Biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.*, 24, Pp: 85-106.
- Falsen E., Pascual C., Sjoden B., Ohlen M., Collins M. D.** (1999). Phenotypic and phylogenetic characterization of a novel *Lactobacillus* species from human sources: Description of *Lactobacillus iners* sp. Nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, Pp: 217-221.
- FAO.** (2010). Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine-Laits de consommation <http://www.horizon.documentation.ird.fr>.

- Farrow J. A. E., Facklam R. C. & Collins M. D.** (1989). Nucleic acid homologies of some vancomycin-resistant *Leuconostocs* and description of *Leuconostoc citreum* sp. Nov. and *Leuconostoc pseudomesenteroides* sp. Nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39, Pp: 279-283.
- FDA.** (2002). "GRN No.49 *Bifidobacterium lactis* strain Bb12 and *Streptococcus thermophilus* strain Th4 " GRAS Notice inventory.
- FDA.** (2012). "GRN No.378 Cultured [dairy sources, sugars, wheat, malt, and fruit- and vegetablebased sources] fermented by [*Streptococcus thermophilus*, *Bacillus coagulans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus bulgaricus* and *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* or mixtures of these strains]" GRAS Notice Inventory.
- Fédération Internationale du Lait., "Lait et produit laitiers, Préparation des échantillons et des dilutions en vue de l'examen microbiologique", Document 122C.atio
- Fil T.** (1981). The composition of ewe's and goats milk, *Bull. inten. Dairy fed.*, 140, Pp: 5-19.
- Fimland G. et al.** (2000). A C-terminal disulfide bridge in pediocin-like bacteriocins renders bacteriocin activity less temperature dependent and is a major determinant of the antimicrobial spectrum. *Jo. Bacteriol.*, 182, Pp: 2643-2648.
- Fitzpatrick J. J., O'Keeffe U.** (2001). Influence of whey protein hydrolyzate addition to whey permeate batch fermentations for producing lactic acid. *Process Biochemistry*, 37, Pp: 183-186.
- Fonseca F., Béal C. & Corrieu G.** (2000). Method of quantifying the loss of acidification activity of lactic acid starters during freezing and frozen storage. *Journal of Dairy Researc*, 67, Pp: 83-90.
- Fontaine L., & Hols P.** (2008). The inhibitory spectrum of Thermophilin 9 from *Streptococcus thermophilus* LMD-9 depends on the production of multiple peptides and the activity of BIpG (ST) a thiol-disulfide oxydase. *Appl. Env. Micro.*, 74(4), Pp:1102-1110.
- Fresse O. M., Paul-pascal M. P.** (1993). *Listéria monocytogène* dans le lait et les produits laitiers. *Th. Méd. Vét.*, Toulouse, 41, Pp:15-17.
- Galvez A., Abriouel H., Lopez R. L. & Ben Omar N.** (2007). Bacteriocin-based strategies for food bio-preservation. *Int. Jo. Food Microbiol.*, 120(1-2), Pp: 51-70.
- Gardan R., Besset C. et al.** (2009). "The oligopeptide transport system is essential for the development of natural competence in *Streptococcus thermophilus* strain LMD-9." *Jo. Bacteriol.*, 191(14), Pp: 4647-55.
- Garvie E. I. & Farrow J. A. E.** (1982). *Streptococcus lactis* sub sp. *cremoris* (Orla- Jensen) comb. Nov. and *Streptococcus lactis subsp. diacetylactis*. (Matuszewski et al.) nom. rev., com. Nov, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 32, Pp: 453-455.
- Garvie E. I.** (1984). Separation of species of the genus *Leuconostoc* and differentiation of the *Leuconostocs* from other lactic acid bacteria. *Methods Microbiol*, 16, Pp: 147-178.
- Gelais S-T.** (2002). Composition du lait de chèvre et son aptitude à la transformation-Canada, Québec.
- Ghalfi, H., Allaoui A., Destain J., Benkerroum N. & Thonart P.** (2006b). Bacteriocin activity by *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 to inactivate *Listeria monocytogenes* In: cold-smoked salmon during 4°C storage. *Jo Food Prot.*, 69, Pp: 1066–1071.

- Ghazi F., Henni D. E., Benmechernene Z. & Kihal M.** (2009). Phenotypic and whole cell protein analysis by SDS-PAGE for identification of dominants lactic acid bacteria isolated from Algerian raw milk. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 4(1), Pp: 78-87.
- Ghazi K. & Niar A.** (2011). Qualité hygiénique du lait cru de vache dans les différents élevages de la wilaya de Tiaret Algérie *Tropicultura*, 29(4), Pp: 193-196.
- Gisele I., Ghamass G. I., Saliba R., Carini G. & Beal C.** (2006). Characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented milk Laban. *Int. Journal Microbiology*, 110, Pp: 52-61.
- Gomes A. M., Malcata. Y. F. & Claver. F. A.** (1998). Growth enhancement of *bifidobacterium*. *Journal of Dairy Science*, 81, Pp: 1817-2825.
- Grade S., Gaya P., Medina M. & Nunez M.** (1997). Acceleration of flavour formation in cheese by a bacteriocin producing adjunct lactic culture. *Biotechnology. Letters*, 19, Pp: 101-1014.
- Grade S., Avila M., Medina M. & Nunuz M.** (2004). Fast induction of nisin resistance In: *Streptococcus thermophilus* INIA463 during growth in milk. *International Journal of Food Microbiology*, 96, Pp: 165-172.
- Gravesena A., Ramnatha M., Rechingerb K. B., AndersenN., Jansch L., Héchard Y., Hastings J. W. & Knøchel S.** (2002). High-level resistance to class IIa bacteriocins is associated with one general mechanism in *L. monocytogenes*. *Microbiology*, 148, Pp: 2361-2369.
- Guarner F., et Schaafsma G. J.** (1998). Probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 39, Pp: 237-238.
- Guarner F., Perdigon G., Corthier G., Salminen S., Koletzko B. & Morelli L.** (2005). Should yoghurt cultures be considered probiotic *Br Jo. Nutr.* 93 (deuil), Pp: 783-786.
- Guenguen L.** (1995). Apports minéraux par le lait et les produits laitiers. *Cah, Nutr Diet*, 3, Pp: 213-217.
- Guessas B., Adjoudj F., Hadadji M & Kihal M.** (2012). Isolation and identification of lactic acid bacteria from Dhan, a traditional butter and their major technological traits. *World Applied Sciences Journal*, 17(4), Pp: 480-488.
- Guinane C. M., Cotter P. D., Hill C. & Ross P.** (2005). A review: microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota of food. *Jo. Appl. Microbiol.*, 98, Pp: 1316-1325.
- Guiraud J. P.** (1998). Analyse du lait. In: Microbiologie alimentaire. 1^{ère} Ed., *Dunod*. Paris, Pp:136-391.
- Guiraud J.P.** (2003). Microbiologie Alimentaire. *Tec & Doc, Dunod*. Paris, Pp: 90-292.
- Gusils C., Chaia A. P., Olivier G. & Gonzalez S.** (2010). Micro technique for identification of lactic acid bacteria. *Methods in molecular biology*, Vol. (268): Public Health Microbiology: *Methods and Protocols*. Humana Press. Otowa, Canada, Pp: 453-458.
- Gyosheva B., Petrova I. & Mutafchieva M.** (1995). Preservation of *Streptococcus thermophilus* strains after long term storage in lyophilized state. *Collection*. Vol. (1), Pp: 34-37.
- Hamama A., El Mouktafi M.** (1990). Étude de la qualité hygiénique du lait cru produit au Maroc. *Maghreb Vét.*, 5, Pp: 17-20.
- Hamann J., Zecconi A.** (1998). Evaluation of the electrical conductivity of milk as a mastitis indicator. *Bulletin of the IDF*, 334, Pp: 26.
- Hammes W. P. & Hertel C.** (2006). The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., & Stackebrandt, E. (Eds). The prokaryotes, Vol. (4). *Springer Science and Business Media*. New York, USA, Pp: 320-40.

- Hardie J. M.** (1986). Methods for the isolation and identification of anaerobes. *Soc Appl. Bactériol Symp ser*, 13, PP: 397-410.
- Hassaïne O., Zadi-Karam H. & Karam N. E.** (2007). Technologically important properties of lactic acid bacteria isolated from raw milk of three breeds of Algerian dromedary (*Camelus dromedarius*). *Afr. Jo. Biotechnol*, 6 (14), Pp: 1720-1727.
- Hayes P. S., Feely J. C., Graves L. M., Ajello G. W. & Fleming D. W.** (1986). Isolation of *Listeria monocytogenes* from raw milk. *Appl. Envir. Microbio*, 51, Pp: 438- 440.
- Hécharde Y., Pelletier C., Cenatiempo Y. & Frère J.** (2001). Analysis of sigma (54)-dependent genes in *Enterococcus faecalis*: a mannose PTS permease (EII (Man)) is involved in sensitivity to a bacteriocin, mesentericin Y105. *Microbiology*, 147, Pp: 1575-1580.
- Helinck S., Le Bars, D., Moreau D., Yvon M.** (2004). Ability of *thermophilic* lactic acid bacteria to produce aroma compounds from amino acids. *Appl. Environn. Microbiol.* 170, (7), Pp: 3855-3861.
- Hofvendahl K, Hahn-Hagerdal B.** (2000). Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources (1). *Enzyme Microbiology and Technology*, 26, Pp: 87-107.
- Hols P., Hancy F., Fontaine L., Grossi ord B., Prozzi D., Leblond-Bourget N., Decaris B., Bolotin A., Delorme C., Ehrlich D., Guedon E, Monnet V., Renault P. & Kleerebezem M.** (2005). New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative. *FEMS. Microbiology. Reviews*, (29), Pp: 435–463.
- Holzapfel W. H., Haberer P., Geisen R., Bjorkroth J., Schillinger U.** (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms **In:** food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, Pp: 365-373.
- Howell T. H., Fiorellini J. P., Blackburn P., Projan S. J., de la Harpe J. & Williams R. C.** (1993). The effect of a mouthrinse based on nisin, a bacteriocin, on developing plaque and gingivitis in beagle dogs. *Jo. Clin Periodontol*, 20, 5, Pp: 335-9.
- Idoui T. & Karam N. E.** (2008). Lactic acid bacteria from Jijel butter: isolation, identification and major technological traits. *Gr. Y. Aceites*, 59(4), Pp: 361-367.
- Idoui T., Boudjerda J., Leghouchi, E. & Karam N. E.** (2009). Lactic acid bacteria from “Sheep’sDhan”, a traditional butter from sheep’s milk: Isolation, identification and major technological traits. *Gr. Y. Aceites*, 60(2), 6 Pp: 177-183.
- Imran M., Khan H., Hassan S. & Khan R.** (2008). Physicochemical characteristics of various milk samples available in Pakistan. *Jo. of Jhejang University Science B*, 9(7), Pp: 546-511.
- Jeness R., Sloan R. E.** (1970). The composition of milk of various species: *A Review, Dairy science abstract*, 32, Pp: 599-612.
- Joffin C. & Joffin, J. N.**(1993). Microbiologie alimentaire. 3^{eme} Edition: Centre Régional de Documentation-75 conrs Alsace- Lorraine, 33075, France, Pp: 94-97.
- Kacem M. & Karam N. E.** (2006). Physicochemical and microbiological study of “shmen”, a traditional butter made from camel milk in the Sahara (Algeria): Isolation and identification of lactic acid bacteria and yeasts. *Grasas Y Aceites. Abril-Junio*, 57 (2), Pp: 198-204.
- Kamphuis C., Pietersma D., van der Tol R., Wiedemann M., Hogeveen H.** (2008). Using sensor data patterns from an automatic milking system to develop predictive variables for classifying clinical mastitis and abnormal milk. *Computers and electronics in agriculture*, 62, Pp: 169-181.

- Kandler O. & Weiss N.** (1986a). Regular non sporing Gram-positive rods. **In:** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams, Wilkins, Baltimore, 2, Pp: 1208-1209.
- Kandler O. & Weiss N.** (1986b). Genus *Lactobacillus Beijerinck* 1901, 212AL. **In:** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams, Wilkins, Baltimore, 2, Pp: 1209-1234.
- Karam N. E. & Karam H.** (1994). Isolement et caractérisation des bactéries lactiques de laits crus d'Algérie. **In:** Alimentation, Génétique et Santé de l'enfant, Ed. M. Touhami et J-F. Des jeux, L'Harmattan, Pp: 257-264.
- Keskin M., Avsaryk & Bicerio A.** (2004). Comparative study milk yield and milk composition of two different goat genotypes under the climat of eastern Mediterranean. *Turkish Jo. of Veterenary and Animal Science*, 28, Pp: 531-536.
- Khedid K. M., Faid M. A., Mokhtari A. A., Soulaymani A. A., Zinedine A.** (2008): Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. *Microbiological Research*, 64, Pp: 81-91.
- Klaenhammer T. R.** (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70, Pp: 337-349.
- Klaenhammer T. R.** (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria, *FEMS Microbiol Rev.*, 12, Pp: 39-86.
- Klaenhammer T. R., Altermann E., Arigoni F., Bolotin A., Breidt F., Broadbent J., Cano R., Chaillou S., Deutscher J., Gasson M., Van de Guchte M., Guzzol J., Hartke A., Hawkins T., Hols P., Hutkins R., Kleerebezem M., Kok J., Kuipers O., Lubbers M., Maguin E., Mc Kay L., Mills D., Nauta A., Overbeek R., Pel H., Pridmore D., Saier M., van Sinderen D., Sorokin A., Steele J., O'Sullivan D., de Vos W., Weimer B., Zagorec M. & Siezen. R.** (2003). Discovering lactic acid bacteria by genomics. *Van Leeuwenhoek*, 82, Pp: 29-58.
- Kouakou P. et al.** (2008). Enhancing the antilisterial effect of *L. curvatus* CWBI-B28 in pork meat and cocultures by limiting bacteriocin degradation. *Meat Sci.*, 80(3), Pp: 640-648.
- Labioui H., Elmoualdi L., Benzakour A., El yachoui M., Berny E., Ouhssine M.** (2009). Etude physicochimique et microbiologique de lait cru. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 148, Pp: 7-16.
- Labres E. H. A.** (2006). Etude de la prévalence et analyse du risque de *Listeria monocytogenes* dans les laits crus dans la région centre. Thèse Doctorale, Centre Universitaire EL-Taref-Algerie, Pp: 112.
- Lais C., Blanc B.** (1975). Milk proteins biochemical and biological aspects, *World Rev Nutr Diet*, 20, Pp: 67-147.
- Larpent J. P.** (1989). Les bactéries lactiques, Les microorganismes de fermentations. Dans: Microbiologie Alimentaire, Tome 2, Bourgeois, C. M., Larpent, J. P. Eds. *Techniques et documentation Lavoisier*, Pp: 3-15.
- Larpent J. P., Copin M. P., Germonville A., Jaquet M., Thétas J. L. & Fontaine M. B.** (1997) Microbiologie du lait et des produits laitiers, manipulation N: 56. **In:** Microbiologie alimentaire, Techniques de laboratoire, Edition *Tech et Doc Lavoisier*. Paris, Pp: 799-780.
- Le Berre N.** (1999). Le lait. Edition *Charles corlet*, Pp: 113-114.
- Le tort C., Nardi M., Garult P., Monnet V. & Juillard V.** (2002). Casein utilisation by *Streptococcus thermophilus* results in a diauxic growth in milk. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68; (6), Pp: 3162-3165.
- Leroy F. & De Vuyst L.** (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification, and food applications. *Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 13, Pp: 194-199.

- Leveau J. Y. & Bouix M.** (1993). Les levures. Dans: Microbiologie industrielle, Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In: Lactic acid bacteria. *Salminen S. and von Wright A., Marcel Dekker INC. New York*, Pp: 1-63.
- Lindgren S. E. & Dobrogosz W. J.** (1990). Antagonistic activities of lactic bacteria. In: food and feed fermentations. *FEMS Microbiol Rev*, 7(1-2), Pp: 149-63.
- Lovett J., Francis D. W. & Hunt J. M.** (1987). *Listeria monocytogenes* in raw milk detection, incidence and pathogenicity. *Jo.of Food. Prot*, 50, Pp: 188-192.
- Luchansky J. B. & Call J. E.** (2004). Evaluation of nisin-coated cellulose casings for the control of *L.monocytogenes* inoculated onto the surface of commercially prepared frankfurters. *Jo. Food Prot.*, 67, Pp: 1017-1021.
- Lukas S. & Rey Rolle J.** (1989). Etude d'un lot de ferments lactiques mésophiles équilibrés des flores aux cours de la première étape de fabrication du levain. *Le Lait*, 69(2), Pp: 121-130.
- Lukas S. & Rey Rolle J.** (1989). Etude d'un lot de ferments lactiques mésophiles équilibrés des flores aux cours de la première étape de fabrication du levain. *Le Lait*, 69(2), 121-130.
- Luquet F. M. & Corrieu G.** (2005). Bactéries lactiques et probiotiques. *Tec &Doc, Lavoisier*. Paris. Pp: 3-37.
- M1ariglio.** (1986). Contrôle de la qualité des produits laitiers: analyses physiques et chimiques. *AFNOR, ITSV*, 3ème Ed, Pp: 1030.
- Mabrook M. F., Petty M. C.** (2001). Application of electrical admittance measurement to the quality control of milk *Sensors and Actuators B.*, 84, Pp: 136-141.
- Mabrook M. F., Petty M. C.** (2003). Effect of composition on the electrical conductance of milk. *Journal of Food Engineering*, 60, Pp: 321-325.
- Mahieu H., Le Jaouen J. C.** (1977). Etude comparative de la composition et de la contamination des laits des espèces laitières Bovines, Ovines et Caprines. *Le lait*, 57, Pp: 565-568.
- Majdi A.** (2008). Stage au centre professionnel d'agroalimentaire de cite EL KHADRA *Institut National Agronomique de Tunisie*.
- Makarova K., A. Slesarev, et al.** (2006). "Comparative genomics of the lactic acid bacteria." *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(42), Pp: 15611-6.
- Mangia N. P., Murgia M. A., Garau G., Sanna M. G. & Deiana P.** (2008). Influence of selected LAB cultures on the evolution of free amino acids, free fatty acids and Fiore Sardo cheese microflora during the ripening. *Food Microbiol.*, 25, Pp: 366-377.
- Marshall N., Bourdon J. L. & Richard C. L.** (1987). Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. 3^{ème} Ed. *Doin*, Pp: 200-210.
- Marteau P. & Seksik P.** (2004). Place des probiotiques dans la prévention et le traitement des diarrhées post antibiotiques. *Re. Fran. Lab.*, Pp: 73-76.
- Martley F. G.** (1983). Temperature sensitivities of thermophilic starter strains. *New Zeal Jo. Dairy Sci. Technol.* 18, Pp: 191-196.
- Masle I. & Morgan F.** (2001). Aptitude du lait de chèvre à l'acidification par ferments lactiques. *Facteurs de variation liés à la composition du lait*, 81, Pp: 561-569.
- Mathieu J.** (1998). Initiation à la physicochimie du lait. Paris: *Lavoisier, «Tec et Doc»*, Pp: 220.

- Mathot A.G., Beliard E., huault D.** (1996). Propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques. In: microbiologie alimentaire tome 2, aliments fermentés et fermentation alimentaire. *Tec & Doc, Edition Lavoisier*, Pp: 432-447.
- Maurer J., Schaeren W.** (2007). Le lait de brebis: un aliment de haute valeur nutritive. *Revue suisse agric*, **39(4)**, Pp: 205-208.
- Mc Auliffe O. & Hill C.** (2001). Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *Fems Microbiol. Rev.*, **25**, Pp: 285-308.
- Mechai A & Kirane D.** (2008). Antimicrobial activity of autochthonous lactic acid bacteria isolated from Algerian traditional fermented milk "Raib" *African Journal of Biotechnology*, **7 (16)**, Pp: 2908-2914, 18.
- Meribai A., Ait-Abdeslam A., Krantar K., Mahi M^{ed}., Benzeguir F. M., Slimane N., Maghnia D., Mouadene R & Bensoltane A.** (2010). Biotechnological study of a thermophilic acid starter isolated from Algerian cow's raw milk. Egypt. *Jo. of Appl. Sci.*, **25 (4B)**, Pp: 243–254.
- Meryman H. T.** (1971). Cryoprotective agents. *Cryobiol.* **8**, Pp: 173-183.
- Metlef S., Dilmi-Bouras A.** (2009). Effet antagoniste de *Lactococcus lactis*, souches extrêmophiles locales, sur des espèces de la flore intestinale résidente, naturelles locales *Revue Nature et Technologie*, Pp: 33-44.
- Mohamed A., Fredrick D., Falkiner R.** (1996). Bacteriocins, nature, function and structure *Micron* **6**, Pp: 467-479.
- Monnet C., Pernoud S., Sepulchre A., Fremaux C. & Corrieu G.** (2004). Selection and properties of *Streptococcus thermophilus* mutants deficient in urease. *Jo. Dairy Sci.*, **87**, Pp: 1634–1640.
- Monnet C., Mora D. & Corrieu G.** (2005). Gluthamine synthesis is essentiel for growth of *Streptococcus thermophilus* in milk and is linked to urea catabolism. *Appl and Env. Microbiol.* **71(6)**, Pp: 3376-3378.
- Monnet C. & Corrieu G.** (2007). Selection and properties of alpha acétolactate decarboxylase deficient spontaneous mutants of *Streptococcus thermophilus*. *Food. Microbiolog*, **24 (6)**, Pp: 601-606.
- Mora D., Maguin E., Masiero M., Parini C., Ricci G., Manachini P. L. & Daffonchio D.** (2004). Characterization of urease genes cluster of *Streptococcus thermophilus*. *Jo Appl Microbiol.* **96 (1)**, Pp: 209-219.
- Mora D., Monnet C., Parini C., Guglielmetti S., Mariani A., Pintus P., Molinari F., Daffonchio D. & Manachini P. L.** (2005). Urease biogenesis .In: *Streptococcus thermophilus. Researc. In Microbiology*, **156**, Pp: 897–903.
- Morgan F.** (1999). Cellules somatiques du lait de chèvre: conséquences sur la composition du lait et la technologie L'égide N°17, décembre.
- Morgan S. M. et al.** (2005). Sequential actions of the two component peptides of the lantibiotic lactacin 3147 explain its antimicrobial activity at nanomolar concentration. *Antimicrob. Agents Chemother*, **49(7)**, Pp:2606-2611.
- Motlagh A. M., Johson M. C. & Ray B.** (1991). Viability Loss of foodborne pathogens by starter culture metabolites. *Jo. Food protect*, Pp: 837-878.
- Moulay M., Aggad H., Benmechernene Z., Guessas B., Henni. D. E. & KihalM.** (2006). Cultivable Lactic Acid Bacteria Isolated from Algerian Raw Goat's Milk and Their Proteolytic Activity. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, **1(1)**, Pp: 12-18.

- Mozzi F., Raya R. R. & Vignolo G. M.** (2010). Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications. *Blackwell. Publishing*, Pp: 13.
- Naghmouchi K., Kheadr E., Lacroix C. & Fliss I.** (2007). Class I class IIa bacteriocin cross-resistance phenomenon. *In: L. monocytogenes. Food Microbiol.*, 24, Pp: 718-727.
- Nes I. F. & Holo H.** (2000). Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers.*, 55,1, Pp: 50-61.
- Nilsen T., Nes I. F. & Holo H.** (2003). Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG2333. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(5), Pp: 2975-2984.
- Norberg E., Hogeveen H., Korsgaard I. R., Friggens N. C., Sloth K. H. M. N., Lovendahl P.** (2004). Electrical conductivity of milk: ability to predict mastitis status. *Jo. Dairy Sci.*, 87, Pp: 1099-1107.
- Norme: ECOC8800150D G. français. (1988). Décret n°:88-1203 du 30 décembre 1988 relatif aux laits fermentés et au yaourt ou yoghourt.**
- Novel G.** (1993). Les bactéries lactiques. *In: Microbiologie industrielle, les microorganismes d'intérêt industriel.* Leveau, J.Y, Bouix, M. Ed .*Tech. et Doc. Lavoisier Paris*, Pp: 170-374.
- Nunez M., Tomillo J.,Gaya P. & Medina M.** (1996). Bacteriocin quantification by the critical dilution method: A comparison of arbitrary units with diameter and area of the zone of growth inhibition .*Milchwirtschaft*, 51, Pp: 7-10.
- Ogier J. C., Casalta E., Farrokh C. & Saihi A.** (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Leuconostoc* genus. *Int. Jo. Food Microbiol.*, 126, Pp: 286-290.
- Onda T., Yanagida F., Tsuji M., Shinohara T. & Yokotsuka K.** (2003). Production and purification of a bacteriocin peptide produced by *Lactococcus* sp. strain GM005, isolated from Miso-paste. *Int. Jo. Food Microbiol*, 87(1-2), Pp: 153-159.
- Ong L., Henrikssonb A. & Shaha N.P.** (2007). Proteolytic pattern and organic acid profiles of probiotic Cheddar cheese as influenced by probiotic strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Lb.paracasei*, *Lb. casei* or *Bifidobacterium* sp. *Int. Dairy Jo.*, 17, Pp:67-78.
- Oppegard C. et al.** (2007). The two-peptide class II bacteriocins: structure, production and mode of action. *Jo. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 13(4), Pp:210-219.
- Patton G. C. & Van Der Donk W. A.** (2005). New developments in lantibiotic biosynthesis and mode of action.*Curr. Opin. Microbiol.*, 8, Pp: 543-551.
- Pirisi A.** (1994). Composition et coagulation du lait de brebis. *Lait*, Pp: 425-442.
- Pitt W. M., Harden T. J. & Hull R. R.** (2000). Behaviour of *Listeria monocytogenes* in pasteurised milk during fermentation with lactic acid bacteria.*Jo.Food. Prot*, 63, (7), Pp: 910- 920.
- Pointurier H.** (2003) .La gestion matière dans l'industrie laitière, *Tec et Doc, Lavoisier*, France, 64, Pp: 388
- Pougheon S.** (2001). Contribution à l'étude des variations de la composition du lait et ses conséquences en technologie laitière, Thèse doctorat d'état, université Paul sebatier de toulouse, France.
- Poutrel B.** (1992). *Les staphylocoques et les streptocoques* de mammites. *In: Les groupes microbiens d'intérêt laitier. CEPIL*, Paris, Pp: 415-453.
- Poutrel B.** (2004). Le diagnostic des mammites pour et par le vétérinaire praticien, intérêt et limites. Journées Nationales des *G.T.V.*, Tours, Pp: 805-810.
- Qin J., Li R., Raes J., Arumugam M., Burgdorf K. S., Manichanh C., Nielsen T., Pons N., Levenez F., Yamada T., Mende D. R., Li J., Xu J., Li S., Li D., Cao J., Wang B., Liang H., Zheng H., Xie Y.,**

- Tap J., Lepage P., Bertalan M., Batto J. M., Hansen T., Le Paslier D., Linneberg A., Nielsen H. B., Pelletier E., Renault P., Sicheritz-Ponten T., Turner K., Zhu H., Yu C., Li S., Jian M., Zhou Y., Li Y., Zhang X., Li S., Qin N., Yang H., Wang J., Brunak S., Doré J., Guarner F., Kristiansen K., Pedersen O., Parkhill J., Weissenbach J.; MetaHIT Consortium, Bork P., Ehrlich S. D., Wang J.** (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285), Pp: 59-65.
- Rasolofoa A. E.** (2010). Analyse de microbiote du lait par les méthodes moléculaires. *Thèse Doc. Facu. Etu. Super. Laval*. Quebec, Pp: 58-78.
- Remeuf F., Lenoir J. & Duby C.** (1989). Etude des relations entre les caractéristiques physicochimiques des laits de chèvre et leur aptitude à la coagulation par la présure. *Lait*, 69, Pp: 499-518.
- Remeuf F.** (1993). Influence du polymorphisme génétique de la caséine As1 caprine sur les caractéristiques physico-chimiques et technologiques du lait. *Lait*, 37, Pp: 549-557.
- Remeuf F., Guy R., Brignon G. & Grosclaude F.** (2001). Influence de la teneur en caséine- β sur les caractéristiques physicochimiques et l'aptitude à la coagulation enzymatique du lait de chèvre. *Lait*, 81, Pp:731-742.
- Rodgers S.** (2001). Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures: a review. *Trends Food Sci. Technol.*, 12, Pp: 276-284.
- Rodier J., Legube B., Merlet N. et al.** (2009). L'analyse de l'eau. 9^{ème} Ed, *Dunod*, France, Pp 747-784.
- Rodriguez E., Gaya P., Nunez M. & Medina M.** (1998). Inhibitory activity of a nisin-producing starter culture on *Listeria innocua* in raw ewe's milk manchego cheese. *cheese.*, 39, Pp: 129-132.
- Rodriguez J. M., Martinez M. I., Horn N. & Dodd H. M.** (2002). Heterologous production of bacteriocin by lactic acid bacteria. *International. Journal.of. Food. Microbiology.* 80, Pp: 101-116.
- Rodriguez L. R ,Teixeira J. A ,VanderMei H. C.& Oliveira R.** (2006). Isolation and partial characterization of a biosurfactant produced by *Streptococcus thermophilus* A. *Colloids and surface. B: Biosurfactant*, 53, Pp: 105-112.
- Rogosa M., Franklin J. G, Perry K. D.** (1961). Correlation of the vitamin requirements with cultural and biochemical characters of *Lactobacillus* subsp. *Journal of General Microbiology*, 24, Pp: 473-482.
- Rouissat L. & Bensoltane A.** (2006). Physico-chemical, microbiological and biotechnological studies of lactic acid bacteria isolated from ewe's milk of Algerian two breeds (Ouled Djallal and El Hamra). Egypt. *Jo. Appl. Sci.*, 21, Pp: 567-582.
- Roukas T. & Kotzekidou P.** (1998). Lactic acid production from deproteinized whey by mixed cultures of free and coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells using fed batch culture. *Enz.Microbiol. Technol.*, 22, Pp: 199-204.
- Santos J. E. P., Cerri R. L. A., Ballou M. A., Higginbotham G. E. & Kirk J. H.** (2004). Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of Holstein dairy cows. *Animal Reproduction Sci.*, 80, Pp: 31-45.
- Savado A., Ouattara C. A. T., Bassole I. H. N. & Traore S. A.** (2006). Bacteriocins and lactic bacteria- a mini review. *African Journal of Biotechnology*. Vol.5 (9), Pp: 678-683.
- Savoy de Giori G. & Hébert M.** (2001). Methods to determine proteolytic activity of lactic acid bacteria. Methods. In: Biotechnology, Vol. (14): *Food Microbiol. protocols. Humana Press. Totow*, Pp: 197-202.

- Saway W. N., Safi W. J., Al-Shalhat A. F. & Al-Mohammad M. M. (1984). Chemical composition and nutritive value of goat milk. *Jo .of Dairy Science*, 67, Pp: 1655-1659.
- Sboui A., Khorchani T., Djegham M. & Belhadj O. (2009). Comparaison de la composition physicochimique du lait camelin et bovin du Sud Tunisien; variation du pH et de l'acidité à différentes températures. ISSN 1813-548X. *AfriqueScience*, 05(2), Pp: 293-304.
- Scardovi V. (1986). Genus bifidobacterium. Orla-Jensen 1924, 472AL. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Williams et Wilkins, Baltimore, 2, Pp: 1418-1434.
- 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. *Systematic and Applied Microbiology*, 6, Pp: 183-195.
- Schleifer K. H. (1986). Gram-positif cocci. Dans: bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams et Wilkins, Baltimore, 2, Pp: 999-1002.
- Schleifer K-H., Ehrmann M, Krusch U, Neve H. (1991). Revival of the species *Streptococcus thermophilus* (ex Orla-Jensen, 1919) nom. rev. *Syst. Appl. Microbiol*, 14, Pp: 02.
- Schöbitz R., Suazo V., Costa M. & Ciampi L. (2003). Effects of a bacteriocin- like inhibitory substance from *Carnobacterium piscicola* against human and salmon isolates of *Listeria monocytogenes.*, *Int. Jo. Food Microbiol.*, 84, Pp: 237-244.
- Sebti I. (2002). Bio-emballage actif incorporant la nisine, diffusion de cette bactériocine en gel d'agarose. Thèse de doctorat .France.
- Serhan M., Linder M., Hosri C. & Fanni J. (2008). Physic-chemical modifications and evolution of lipolysis and proteolysis during ripening of traditional Lebanese Darfiyeh cheese. *Jo. Dairy Res.*, 88, Pp: 1123-1130.
- Singh E. (1972). A study on the nitrogen distribution in goat's milk. *Milch wess enschaft*, Pp: 167-167.
- Solis G. C. G., De Los R. G. (2010). Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota. In: breast-milk and the infant gut. *Anaerobe*, 16 (3), Pp: 307-10.
- Sondergaard A. K. (2005). Application of probiotics in food. In: Luquet, F.-M. et Corrieu, G. (Ed.). Bactéries lactiques et probiotiques. *Tec et Doc Lavoisier*, Paris, Pp: 195-209.
- Srairi M. T., Hasni Alaoui I., Hamama A. & Faye B. (2005). Relations entre pratiques d'élevage et qualité globale du lait de vache en étables suburbaines au Maroc. *Revue Méd. Vét.*, 156 (3), Pp: 155-162.
- Sriranganathan N., Seidler R., Sandine W. & Elliker P. R. (1973). Cytological and deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization studies on *Lactobacillus* isolates from San Francisco sourdough. *Applied Microbiology*, 25, N3, Pp: 461-470.
- Stackebrandt E., Fowler V. J. & Woese C. R. (1983). A phylogenetic analysis of *Lactobacilli*. *Pediococcus pentosaeus* and *Leuconostoc mesenteroides*. *Systematic and Applied Microbiology*, 4, Pp: 326-337.
- Stackebrandt E. & Teuber M. (1988). Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70, Pp: 317-324.
- Stein kraus K. H. (1997). Classification of fermented food: Worldwide review of household fermentation techniques *food Control*, 8(5/6), Pp: 311-317.
- Stiles M. E. & Holzapfel W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Inetrnational journal of food Microbiology*, 36, Pp: 1-29.

- Sun Z., Chen X., Wang J., Zhao W., Shao Y., Wu L., Zhou Z., Sun T., Wang L., Meng H., Zhang H., Chen W. (2011). "Complete genome sequence of *Streptococcus thermophilus* strain ND03." *Jo Bacteriol*, 193(3), Pp: 793-4.
- Sutra. L., Federighi. M. & Jouve J. L. (1998). Manuel de bactériologie alimentaire. Ed: *Polytechnica, Paris*, 308(6), Pp: 31-249.
- Tabak S & Bensoltane A. (2011). L'activité antagoniste des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* et *Lactobacillus bulgaricus*) vis-à-vis de la souche *Helicobacter pylori* responsable des maladies gastro-duodénales. *Nature & Technologie*, 06, Pp: 71-79.
- Tagg J. R. & MC Given A. R. (1971). Bacteriocin activity can be detected and assayed by a modification of the punch hole *Method. Appl. Micro*, Vol 21(5), Pp: 943.
- Tagg J. R., Dajani A. S., Wanamaker L. W & Gray E. D. (1973). Group (A) *Streptococci* bacteriocins. *The Journal of Experimental Medicine*, Vol 1, (138), Pp: 68-1183.
- Tango M. S. A., Ghaly. A. E. (1999). Effect of temperature on lactic acid production from cheese whey using *Lactobacillus helveticus* under batch conditions. *Biomass and bioenergy*, 16, Pp: 61-78.
- Tarzaghi B. E. & Sandine W. E. (1975). Improved medium for lactic *Streptococcus* and their bacteriophage, *Appl. Microbiol*, 29, Pp: 807-813.
- Ten Brink B., Minekus M., Van der vossen J. M. B.M. & Leer R. J. (1994). Antimicrobial activity of *Lactobacilli* preliminary characterization and optimisation of production of *acidocin B* a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. *Journal of Applied Bacteriol.*, 77, Pp: 140-148.
- Ten Brink B., Huis in't veld J. H. J. & Minekus M. (1990). Antimicrobial activity of *Lactobacillus* M46, Optimisation of production and partial characterization. *Microbiology Reviews*, 87, p 91.
- Thivierge N. (1999). Caractérisation des souches de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* pour le développement des ferments mésophiles à aptitudes fromagère élevées (Cheddar). *Mémoire M. Sc. National Library of Canada*.
- Thomas A. & Chamba J. F. (2000). Mise en évidence de l'évolution des aptitudes technologiques des bactéries lactiques thermophiles utilisées dans les fromages à pâte pressée cuite. *Sciences des Aliments*, 20, Pp: 159-167.
- Thompson J. K., Collins M. A. & Mercer W. D. (1996). Characterization of a proteinaceous antimicrobial produced by *Lactobacillus helveticus* CNRZ450. *Journal of Applied Bacteriology*, 80, 3, Pp: 338-348.
- Titiek F. D., Endang S. R., Djoko W. & Slamet S. (1996). Antimicrobial substance produced by *Lactobacillus* sp. TGR-2 isolated from *Growol*. *Indonesian Food Nutr. Prog.*, 3(2), Pp: 29-34.
- Twomey D., Ryan M., Meaney B. & Hill C. (2002). Antibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82, Pp: 165-185.
- Vadyvaloo V., Snoep J. L., Hasting J. W. & Rautenbach M. (2004). Physiological implications of class IIa bacteriocin resistance. In: *L. monocytogenes* strains. *Microbiology*, 150, Pp: 335-340.
- Vandamme P., Pot, B., Gillis M., de Vos P., Kersters K. & Swings J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial. *Systematics. Microbiol Rev*, 60 (2), Pp: 407-438.

- Vignolo G., Palacios, J., Farias M. E.** (2000). Combined effect of bacteriocins on the survival of various *Listeria* species in broth and meat system. *Curr. Microbiol.*, 41, Pp:410.
- Vinderolla C. G. & Reinheimer J. A.** (2003). Lactic acid starters and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and rheological barrier resistance. *Food Research International*, 36, Pp: 895-904.
- Vinod Kumar J., Somesh S. & Neerja S.** (2006). Production, purification, stability and efficacy of bacteriocin from isolated of Natural Lactic acid fermentation of vegetables. *Food technology and Biotechnology*, 44(3), Pp: 435-439.
- Vuillemard J. C.** (1986). Microbiologie des aliments. Evolution de l'activité protéolytique des bactéries lactiques. *Tec & Doc, Lavoisier*, Paris, 3, Pp: 1-65.
- Walstra P.** (1978). The milk fat globule natural and synthetic, XX international dairy congress Paris, *International Dairy Federation*, Brussels, 75(5T), Pp: 1-18.
- Wehrmuller K., Ryffel S.** (2007). Produits au lait de chèvre et alimentation. *ALP actuel*, No 28.
- Whitford M. F., McPherson M. A., Forster R. J., & Teather R.M.** (2007). Identification of bacteriocin like inhibitors from rumen *Streptococcus thermophilus* ssp and isolated and characterization of *ofbovicin 255* *Applied and Environm Microbiol.* Pp: 569-574.
- Wiedemann I., Böttiger T., Bonelli R. R., Wiese A., Hagge S. O., Gutschmann T., Seydel U., Deegan L., Hill, Ross P., Sahl H. G.** (2006). The mode of action of the lantibiotic lactacin 3147-a complex mechanism involving specific interaction of two peptides and the cell wall precursor lipid II. *Mol. Microbiol*, 61(2), Pp: 285-296.
- Wijaya A., Neudeker C., Holzappel W. & Franz C.** (2006). Influence of bacteriocin-producing *Enterococcus faecalis* BFE 1071 on *Lactobacillus* spp. In: the rat gastrointestinal tract. In: Proceedings of Food Micro, August. *University of Bologna, Bologna*, Italy, Pp: 124.
- Willey J. M. & van der Donk W. A.** (2007). Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Annu. Rev. Microbiol.*, 61, Pp: 477-501.
- Yamato M., Ozaki K. & Ota F.** (2003). Partial purification and characterization of the bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* YIT 0154. *Microbiol. Res*, 158, Pp: 169-172.
- Yang R., Johnson M. C. & Ray B.** (1992). Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol*, 58, Pp: 3355–3359.
- Zago M., Fornasari M. E., Carminati D., Burns P., Suárez V., Vinderola G., Reinheimer J. & Giraffa G.** (2011). Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiol*, 28, Pp: 1033-1040.
- Zamfir M., Callewaert R., Cornea P. C. & De Vuyst L.** (2000). Production kinetics of acidophilin 801, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. *FEMS Microbiol. Letters*, 190, Pp: 305–308.
- Zamfir M., Callewaert R., Cornea P. C., Savu L., Vatafu I. & De Vuyst L.** (1999). Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. *Jo Appl Microbiol*, 87, Pp: 923-931.
- Zotta T., Ricciardi A., Rossano R. & Pareute E.** (2008). Urease production by *Streptococcus thermophilus*. *Food Microbiology*. (25), Pp: 113-119.
- Zourari A., Accolas J. P. & Desmazeaud M. J.** (1992). Metabolism and Biochemical characteristics of yogurts bacteria, a review. *Lait*, 72, Pp: 1-34.

- Zourari A., Desmazeaud M. J.** (1991): Caractérisation des bactéries lactiques thermophiles isolées des yogourts artisanaux Grecs: II-souches des *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* et cultures mixtes avec *Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophilus*. **Le lait**, 71, Pp: 463-482.
- Zourari, A., Roger, S., Chabanet, C., Desmazeaud M. J.** (1991). Caractérisation des bactéries lactiques thermophiles isolées du yaourts artisanaux Grecs: I souches de *Streptococcus thermophilus* *Salivarius* subsp *thermophilus*, **Lait**, 71, Pp: 445-461.