



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique



Université de Larbi Tébessi –Tébessa-

Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie.

Département : Biologie Appliquée.

MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master.

Domaine : Sciences de la nature et de la vie.

Filière : Sciences biologiques.

Option : Microbiologie Appliquée.

Activité antimicrobienne et protéolytiques des bactéries lactiques isolées du lait et des produits laitiers fermentés.

Présenté et soutenu par : *Melle. Izerghouf Tinhinène.*

Le : *09/06/2021*

Melle. Habhoub Sara.

Devant le jury :

Présidente:

Melle: SMAALI Saoussan

MCB

Université de Laarbi Tébessi

Promoteur:

Mr: MECHAI Abdelbasset

Pr

Université de Laarbi Tébessi

Examinatrice:

Mme: AZIZI Nassima

MAA

Université de Laarbi Tébessi

Année universitaire : 2020/2021.

المخلص

الحليب ومنتجات الألبان بيئة ملائمة لنمو عدد كبير من البكتيريا الواقية. إن عزل وتنقية البكتيريا اللبنية ذات قابلية تكنولوجية وعدائية ضد الجراثيم غير المرغوب فيها من حليب الإبل الخام و جبن الماعز الطبيعي المحضر تقليدياً هو موضوع هذا العمل. أتاحت نتائج الفحوصات المجهرية والميكروسكوبية واختبار الـ *Catalase* عزل 8 سلالات لبنية ، 63% من حليب الإبل و 37% من جبن الماعز الطبيعي. نتائج اختبار التحلل للبروتين للسلالات اللبنية المعزولة مرضية ، ومعظم العزلات لها هذه الخاصية. لإثبات التأثير المضاد لهذه السلالات اللبنية ، درسنا في المختبر قدرتها التثبيطية ضد سبعة أنواع من البكتيريا المسببة للأمراض غالباً ما تشارك في حالات التسمم الغذائي والتسمم ، وهي *Staphylococcus aureus* ، *Bacillus supilis* ، *Escherichia coli* ، *Staphylococcus epidermis* ، *Salmonella.sp* ، *Bacillus cereus* ، *Micrococcus.sp* بثلاث طرق: طريقة البقع ، طريقة الانتشار عبر الثقوب وطريقة الأقراص ، أيضاً فيما يتعلق بالسلالتين الفطريتين *Cladosporium.sp* ، *Penicillium.sp* يتجلى التأثير المضاد من خلال ظهور مناطق فاتحة للتثبيط حول البقع، الثقوب والأقراص. تم تقدير الجهود المثبطة من خلال حساب الأقطار المختلفة لمناطق التثبيط المتكونة. أظهرت نتائج النشاط المضاد للميكروبات أن جميع العزلات تنتج وتفرز مواد مثبطة قادرة على تثبيط نمو وانتشار السلالات الممرضة والفطرية المختبرة. كان من الضروري إجراء مزيد من الاختبارات لتحديد طبيعة العوامل المسؤولة عن التثبيط. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن الخصائص المضادة للميكروبات لسلالات البكتيريا اللبنية المختارة ناتجة عن التأثير المشترك للعديد من العوامل البيولوجية الناشئة عن أنشطتها الأيضية ، ولا سيما الأحماض العضوية ، والمواد الأخرى ذات الطبيعة البروتينية المسماة "البكتريوسينات" وأيضاً من H_2O_2 .

الكلمات المفتاحية: الحليب ، منتجات الألبان ، حليب الإبل ، جبن الماعز الطبيعي، النشاط المضاد للميكروبات ، نشاط التحلل للبروتين.

Résumé

Le lait et les produits laitiers ont toujours constitué un milieu favorable pour la croissance d'une flore bactérienne protectrice. L'isolement et la purification des bactéries lactiques présentant des aptitudes technologiques et antagonistes vis-à-vis des germes indésirables à partir du lait cru de chamelle et du j'ben de chèvre préparé traditionnellement, fait l'objet de ce travail. Les résultats des examens macroscopique, microscopique et le test catalase ont permis d'isoler 8 souches lactiques dont 63% à partir du lait de chamelle et 37% à partir du j'ben. Les résultats du test protéolytique des souches lactiques isolées sont satisfaisants, la majorité des isolats possède cette propriété. Dans le but de mettre en évidence l'effet antagoniste de ces souches lactiques, nous avons étudié *in vitro* leur pouvoir inhibiteur contre sept bactéries pathogènes impliquées souvent dans les cas d'intoxications et d'empoisonnements alimentaires, à savoir : *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus épidermis*, *Salmonella.sp*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus.sp* par trois méthodes: la méthode des spots, méthode des puits et celle des disques. Aussi vis-à-vis de deux souches fongiques *Cladosporium.sp* et *Penicillium.sp*. L'effet antagoniste s'est manifesté par l'apparition des zones claires d'inhibition autour des spots, puits et disques. Les potentiels inhibiteurs ont été estimés en calculant les différents diamètres des zones d'inhibition formées. Les résultats de l'activité antimicrobienne ont révélé que la majorité des isolats produisent et excrètent des substances inhibitrices capables d'inhiber la croissance et la prolifération des souches pathogènes et fongiques testées. Des tests supplémentaires ont été nécessaires pour déterminer la nature des agents responsables de l'inhibition. Les résultats obtenus ont montré que les propriétés antimicrobiennes des souches lactiques sélectionnées résultent de l'effet combiné de plusieurs agents biologiques provenant de leurs activités métaboliques notamment les acides organiques, et d'autres substances de nature protéique dites « bactériocines » et aussi de l' H_2O_2 .

Mots clés: lait, produits laitiers, lait de chamelle, j'ben, activité antimicrobienne, activité protéolytique.

Abstract

Milk and dairy products have always been a favorable environment for the growth of a protective bacterial flora. The isolation and purification of lactic acid bacteria with technological and antagonistic abilities against unwanted germs from raw camel milk and traditionally prepared goat j'ben, is the subject of this work. The results of macroscopic and microscopic examinations and the catalase test made it possible to isolate 8 lactic strains, 63% of which were from camel milk and 37% from j'ben. The results of the proteolytic test of the isolated lactic strains are satisfactory, the majority of isolates have this property. In order to demonstrate the antagonistic effect of these lactic strains, we studied *in vitro* their inhibitory power against seven pathogenic bacteria often involved in cases of food poisoning and poisoning, namely: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermis*, *Salmonella.sp*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus.sp* by three methods: the spot method, the well method and that of the discs. Also with regard to two fungal strains *Cladosporium.sp* and *Penicillium.sp*. The antagonistic effect was manifested by the appearance of clear zones of inhibition around the spots, wells and discs. The inhibitory potentials were estimated by calculating the different diameters of the zones of inhibition formed. The results of antimicrobial activity revealed that all isolates produced and excreted inhibitory substances capable of inhibiting the growth and proliferation of the pathogenic and fungal strains tested. Further testing was necessary to determine the nature of the agents responsible for the inhibition. The results obtained have shown that the antimicrobial properties of the lactic acid strains selected result from the combined effect of several biological agents originating from their metabolic activities, in particular organic acids, and other substances of a protein nature called "bacteriocins" and also from the H₂O₂.

Key words: milk, dairy products, camel milk, j'ben, antimicrobial activity, proteolytic activity.

Remerciements

Nous remercions en premier lieu DIEU, le Clément, le Miséricordieux, le tout Puissant. Louange à ALLAH Seigneur des mondes, qui nous a permis de réaliser ce travail.

*Nous tenons ensuite à remercier notre promoteur **Pr. Mechai Abdelbasset** qui a accepté de nous encadrer, qui nous a guidées par ses précieux conseils et suggestions pertinentes et qui nous a bien expliqué les étapes de ce travail. Veuillez trouver ici, l'expression de notre profond respect et nos sincères remerciements.*

Nous tenons également à remercier :

***Melle. Smaali Saoussan** pour l'honneur qu'elle nous fait de présider le jury et d'évaluer notre travail.*

***Mme. Azizi Nassima** pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

***Mr. Menasria Taha** qui a contribué avec un soin particulier à la réalisation de ce travail. A tout moment, il a fait preuve de la plus grande disponibilité à notre égard. Nous vous prions de trouver ici le témoignage de notre profonde reconnaissance et de nos remerciements.*

*Nous ne pouvons pas oublier de remercier également le **Pr. Houali Karim** pour sa bienveillance, sa réception chaleureuse à l'Université Mouloud Maameri et son aide pour que ce travail soit accompli.*

Enfin, nous remercions tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce modeste travail, qu'ils trouvent ainsi l'expression de nos profondes gratitude et respects.

Dédicace

Je dédie ce travail à:

Mon père Izerghouf Ahmed, ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation, que Dieu te donne la santé et la longue vie.

Ma très chère mère Hakima, affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement, tu n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

Mes chers frères Idir, Oussema et mon petit ange Ghiles, que Dieu vous garde.

Toute ma famille maternelle et paternelle que j'estime énormément.

Mes chères copines Rania, Mariem, qui ont été toujours là pour moi.

Mon binôme Sara qui a subi cette épreuve avec moi.

Mon cher ami qui ma aider et qui a été toujours a mes côtés pendant toute mes 5 ans à l'université.



Izerghouf Tinhinène.

Dédicace

Avant tout je remercie ALLAH le Tout Puissant de m'avoir donné le courage, la force, la santé, et la patience pour pouvoir accomplir ce travail.

J'adresse mes plus sincères remerciements à celle que Dieu a donné le prestige et la dignité, celle qui m'a indiqué la bonne voie, la plus douce et merveilleuse de toutes les mamans. A une personne qui m'a tout donné sans compter, je te dédie à mon tour ce mémoire qui concrétise ton rêve le plus cher et qui n'est que le fruit de tes conseils et de tes encouragements. Tu as été et tu seras toujours un exemple à suivre pour tes qualités humaines, ta persévérance et ton perfectionnisme.

Au plus adorable papa qui m'a tout donné sans rien recevoir. Puisse Dieu tout puissant te protéger du mal, te procurer longue vie, santé et bonheur afin que je puisse te rendre un minimum de ce que je te dois.

A mon idole, mon frère Tarek que Dieu te protège, j'espère que nous nous rencontrerons bientôt. A ma mignonne sœur kholoud, ma petite sœur Aya que Dieu a donné le prestige et la dignité, et le petit Yaakoub.

Un grand merci à mes chers et proches Nada, Maroua B, Khaoula, Hala, Laila, maroua GH et Sara . j'espère que vous trouverez dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour.

A toutes mes amies et mes collègues Dhikra, Ouiem, Hala, Sahar, Loubna, Salma qui m'ont toujours soutenue et encouragée. A mon binôme Tinhinène qui à subi cette expérience avec moi.

A ma famille de m'avoir toujours soutenue notamment lors des périodes de révisions, je suis heureuse de vous présenter ce mémoire aujourd'hui.

Sara

Liste des tableaux

N°	Titre du tableau	Page
1	Composition du lait chez divers mammifères	3
2	Paramètres physico-chimiques du Jben	8
3	Quelques genres de bactéries lactiques	12
4	Classification des bactériocines	27
5	Quelques bactériocines utilisées dans la conservation des produits laitiers	29
6	Souches lactiques tests et leurs origines	38
7	Les souches indicatrices du test d'antagonisme	38
8	Caractères morphologiques et biochimiques des souches lactiques sélectionnées	47
9	Spectre d'activité antimicrobienne des souches lactiques par la méthode de spot	51
10	Spectre d'activité antimicrobienne des souches sélectionnées par la méthode de diffusion en puits	56
11	Les résultats des tests d'antagonisme des différentes souches sélectionné vis-à-vis des germes <i>E coli</i> , <i>Salmonella.sp</i> , <i>S épidermis</i> et <i>B subtilis</i>	59
12	Le ph du surnageant des isolats avant et après la neutralisation	60
13	Estimation de la substance inhibitrice des souches indicatrices	61
14	Activité antifongique des souches lactique vis-à-vis de <i>Clodosporium</i> sp et <i>Penicillium</i> sp par la méthode de stries.	61

Liste des figures

N°	Titre de la figure	Page
1	Les principales voies métaboliques des bactéries lactiques	10
2	Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et les genres associés, obtenu par analyse des ARNr 16S	14
3	Souche de lactobacilles observée par microscopie électronique à balayage	15
4	Morphologie cellulaire de <i>Streptococcus thermophilus</i> observée par microscope électronique	16
5	Morphologie cellulaire d' <i>Enterococcus faecalis</i> observée par microscopie électronique	17
6	Morphologie en microscope électronique de <i>Lactococcus lactis subsp lactis</i> x1000	17
7	Morphologie cellulaire de <i>Bifidobacterium longum</i> observée par microscopie électronique	19
8	Protocole d'isolement, de purification des bactéries lactiques	36
9	Schéma de conservation à courte durée des bactéries lactiques purifiées	37
10	Illustration des étapes de l'activité protéolytique	37
11	Illustration des étapes du test des spots	40
12	Schéma représentatif de la méthode de diffusion en puits	41
13	Aspect macroscopique des souches lactiques sous binoculaire (×6)	45
14	La forme microscopique des isolats après coloration de Gram (G×100)	46
15	Résultat négatif de test catalase pour les souches lactiques sélectionnées	46
16	Mise en évidence de l'activité protéolytiques des isolats étudiées	48
17	Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des souches sélectionnées vis-à vis de <i>Staphylococcus aureus</i> , par la méthode de spot	49
18	Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des souches sélectionnées vis-à vis de <i>Bacillus cereus</i> , par la méthode de spot	49

Liste des figures

19	Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des souches sélectionnées vis-à-vis de <i>Bacillus subtilis</i> , par la méthode de spot	49
20	Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des souches sélectionnées vis-à-vis de <i>E.coli</i> , par la méthode de spot	50
21	Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des souches sélectionnées vis-à-vis de <i>Salmonella. sp</i> , par la méthode de spot	50
22	Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des souches sélectionnées vis-à-vis de <i>Staphylococcus épidermidis</i> , par la méthode de spot	50
23	Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des souches sélectionnées vis-à-vis de <i>Micrococcus .sp</i> , par la méthode de spot	51
24	Mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches sélectionnées vis-à-vis de la souche <i>E.coli</i> par la méthode de puits	53
25	Mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches sélectionnées vis-à-vis de la souche <i>Salmonella sp</i> par la méthode de puits	53
26	Mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches sélectionnées vis-à-vis de la souche <i>Bacillus subtilis</i> par la méthode de puits	53
27	Mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches sélectionnées vis-à-vis de la souche <i>Staphylococcus aureus</i> par la méthode de puits	54
28	Mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches sélectionnées vis-à-vis de la souche <i>Micrococcus sp</i> par la méthode de puits	54
29	Mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches sélectionnées vis-à-vis de la souche <i>Staphylococcus epidermidis</i> par la méthode de puits	54
30	Mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches sélectionnées vis-à-vis de la souche <i>Bacillus cereus</i> par la méthode de puits	55
31	Exemples des résultats obtenues par la méthode de disques.	58
32	Mise en évidence de l'activité antimicrobienne de certains souches sélectionnées vis-à-vis des bactéries pathogènes par la méthode de	59

Liste des figures

	diffusion en puits.	
33	Mise en évidence de l'activité antifongique des souches sélectionnées vis-à-vis de <i>Cladosporium</i> sp.	62
34	Mise en évidence de l'activité antifongique des souches sélectionnées vis-à-vis de <i>Penicillium</i> sp.	63
35	Mise en évidence de l'activité antifongique des isolats vis-à-vis de <i>Cladosporium</i> sp par la méthode des puits.	64
36	Mise en évidence de l'activité antifongique des isolats vis-à-vis de <i>Penicillium</i> sp par la méthode des puits.	64

Abréviations

- ♦ **ADN:** Acide désoxyribonucléique.
- ♦ **ADNr 16S:** Séquences d'ADN (ADN) 16S.
- ♦ **ARNr 16S:** Séquences d'ARN ribosomal (ARNr) 16S.
- ♦ **ATCC:** American Type Culture Collection.
- ♦ **ATP:** Adénosine triphosphate.
- ♦ **C° :** Degré celsius.
- ♦ **CFS :** Cell free supernatant (surnagent stérile).
- ♦ **CO₂:** Dioxyde de carbone.
- ♦ **°D:** Degré Dornic.
- ♦ **EMP :** La voie d'Embden-Meyerhof
- ♦ **G :** Grossissements.
- ♦ **g :** gram.
- ♦ **GC%:** Pourcentage Guanine Cytosine.
- ♦ **h:** Heur.
- ♦ **H₂O₂:** Peroxyde d'hydrogène.
- ♦ **KDa:** kilo dalton, 1Da=1.66 x10⁻²⁴g.
- ♦ **LAB:** Lactic acid bacteria
- ♦ **min :**Minute.
- ♦ **ml:** Millilitre.
- ♦ **mm:** Millimètre.
- ♦ **MRS:** Man, Rogosa, Sharpe.
- ♦ **MH:** Muller Hinton.
- ♦ **NaCl:** Chlorure de sodium.

Abréviations

- ◆ **NADH** : Forme réduite du Nicotinamide Adénine Dinucléotide.
- ◆ **NCFS**: (Neutralcell free supernatant) Surnageants stérile et neutralisé.
- ◆ **pH**: Potential hydrogène.
- ◆ **Pp**: La voie des pentoses phosphates.
- ◆ **tr**: Tour
- ◆ **U.V**: Ultraviolet.
- ◆ **V** : Volume.
- ◆ **µl**: Microlitre.

TABLE DES MATIERES

ملخص

Résumé.

Abstract.

Remerciement.

Dédicace.

Liste des tableaux.

Liste des figures.

Abréviations.

Table des matières.

Introduction générale..... 01

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

Lait et produits laitiers

Introduction	03
I.1 Définition du lait	03
I.1.1 Le lait de chamelle	03
I.2 Composition biochimique du lait	04
I.3 Caractéristiques physico-chimiques du lait	04
I.4 La microflore du lait	05
I.4.1 La microflore indigène ou originelle	05
I.4.2 La microflore contaminante	05
I.5 Les produits laitiers	06
I.5.1 Rayeb	06
I.5.2 L'ben	07
I.5.3 Zebda et Smen	07
I.5.4 Bouhezza	07
I.5.5 Le J'ben	07

CHAPITRE II

Les bactéries lactiques

Introduction	09
II.1. Définition	09
II.2. Groupes des bactéries lactiques	09
II.3. Origine	11
II.4. Caractéristiques générales	11
II.5. Classification des bactéries lactiques	12
II.6. Principaux genres de bactéries lactiques	14
II.6.1 Le genre lactobacilles.....	14
II.6.2 Le Genre <i>Carnobacterium</i>	15
II.6.3 Le genre <i>Streptococcus</i>	16
II.6.4 Le genre <i>Enterococcus</i>	16
II.6.5 Le genre <i>Lactococcus</i>	17
II.6.6 Le genre <i>Leuconostoc, Oenococcus</i> et <i>Weissella</i>	17
II.6.7 Le genre <i>Pediococcus</i> et <i>Tetragenococcus</i>	18
II.6.8 Le genre <i>Bifidobacterium</i>	18
II.7 Aptitudes technologiques des bactéries lactiques	19
II.7.1 Aptitude acidifiante	19
II.7.2 Aptitude protéolytique	20
II.7.3 Aptitude lipolytique	20
II.7.4 Aptitude aromatisante	20
II.7.5 Aptitude texturante	21
II.8 Intérêts des bactéries lactiques	21

CHAPITRE III

L'activité antimicrobienne des bactéries lactiques

Introduction	23
III.1 Les composés antimicrobiens produits par les bactéries lactiques	23
III.1.1 Les acides organiques	23
III.1.2 Le peroxyde d'hydrogène	24
III.1.3 Les acides gras	24

III.1.4 Le dioxyde de carbone	25
III.1.5 Les composants aromatiques	25
III.1.5.1 Diacétyle	25
III.1.5.2 Acétaldéhyde	25
III.1.6 La reutérine	25
III.1.7 Les bactériocine.....	26
III.1.7.1 Classification des bactériocines	26
III.1.7.2 Les propriétés des bactériocines	28
III.1.7.3 L'application des bactériocines	28
III.1.7.3.1 Applications en Agroalimentaire	28
III.1.7.3.2 Applications médicales des bactériocines	29
III.1.8 Peptides antifongique (similaire aux bactériocines)	30

PARTIE EXPERIMENTALE

I. Matériel Et Méthodes

I.1 Cadre de l'étude	31
I.2 Matériel et produit	31
I.2.1 Milieu de culture	31
I.2.2 Produits chimiques et réactifs	32
I.2.3 Appareils utilisés	32
I.3 Méthodes	33
I.3.1 Echantillonnage	33
I.3.2 Réalisation des dilutions décimales	34
I.3.3 Isolement des bactéries lactiques	34
I. 3.3.1 Examen macroscopique	34
I.3.3.2 Examen microscopique	34
I.3.3.3 Recherche de la catalase	35
I.3.4 La purification	35
I.3.5 La conservation	36
I.3.5.1 Conservation à court terme	36
I.3.5.2 Conservation à longue durée	37
I.4 Etude de l'activité protéolytique	37
I.5 Etude de l'activité antibactérienne des souches lactiques	38
I.5.1 Souches bactériennes et leurs origines	38

I. 5.2 La méthode de Spot (méthode direct)	39
I. 5.2.1 Préparation de préculture	39
I. 5.2.2 Test de spot	39
I.5.3 La méthode de diffusion en puits	40
I.5.3.1 Préparation du surnageant	40
I.5.3.2 Mesure de diamètre des zones d'inhibition	41
I.5.4 Méthode de disque	42
I.5.5 Mise en évidence de l'agent inhibiteur	42
I.6 Etude de l'activité antifongique des souches lactiques	43
I.6.1 Préparation de suspension monosporale	43
I.6.2 Méthode des stries (Double couche)	43
I.6.3 Méthode des puits	43
II. Résultats et discussion	
I. Résultats	
I.1 Isolement et purification des souches lactiques	45
I.1.1 Etude macroscopique	45
I.1.2 Etude microscopique	46
I.1.3 Test de catalase	46
I.2 Activité protéolytique.....	47
I.3 Activité antibactérienne des souches lactiques sélectionnées	48
I.3.1 La méthode de Spot (méthode direct)	48
I.3.2 La méthode de diffusion en puits	52
I.3.3 La méthode de disque	58
I.4 Mise en évidence de l'agent inhibiteur	58
I.5. Activité antifongique des souches lactiques	61
II. Discussion	65
Conclusion et perspectives	68
Références bibliographiques	70
Annexes.	

Introduction

Générale

Introduction générale

Le lait est un aliment nutritif complet pour les êtres humains (**Muiris and Liam, 2017**). Grâce à la richesse de sa composition et la variété de ses constituants, le lait est un aliment qui se distingue par une forte concentration en nutriments (**Handford, et al 2016**). Il représente un milieu biologique fortement altérable par voie microbienne en raison de sa forte teneur en eau, de son pH voisin de la neutralité et de sa richesse en composants biodégradables (lactose, protéines et lipides) (**Lucey, 2015; Loss et al. 2015; Iqbal et al. 2016; Muiris et Liam, 2017**).

Les bactéries lactiques regroupent un ensemble d'espèces hétérogènes dont le trait commun est la production d'acide lactique. Elles sont connues par leur capacité à produire lors de leur croissance des composés actifs (**Guettouache et al., 2015**).

Ces ferments lactiques sont largement utilisés dans l'élaboration des produits d'industrie alimentaire, cosmétique et de la médecine (**Alaoui et al., 2016; Oliveira et Lemsaddek, 2018**). À la base du processus de la fermentation des divers produits, ils assurent non seulement des caractéristiques particulières (la texture, la saveur et la production de composés aromatiques), mais ils agissent comme des cultures protectrices pour l'augmentation de la durée de conservation et de commercialisation des produits (**Florou-Paneri et al., 2013; Alaoui et al., 2016; Bergamaschi et al. 2016**).

Cette sécurité alimentaire est favorisée par la production d'acide lactique et par conséquent abaisser le pH du produit (**Hassaine, 2013; Zarour et al., 2013**). Les LAB sont également capables de synthétiser beaucoup de substances comme le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyle, l'acétaldéhyde et des substances de nature protéique «les bactériocines» leur permettant de se développer préférentiellement dans divers écosystèmes). (**Dib., 2015 ; Hadj Abderrahman, 2015 Kermanshahi et Qamsari.,2015; Boullouf., 2016**)

Malgré les changements apportés aux procédés de fabrication des aliments suite à l'évolution des procédés technologiques et aux habitudes alimentaires fiables et adéquates (réfrigération, congélation, stérilisation, séchage, préservation, etc.), des germes pathogènes émergent et donc la contamination et la détérioration des produits alimentaires par les micro-organismes n'est pas encore sous contrôle.

L'emploi de conservateurs chimiques provoque des effets indésirables sur la santé humaine. Pour se soigner, l'on utilise des antibiotiques. L'utilisation répétée de ces substances entraîne l'apparition des souches résistantes. Par ailleurs, les consommateurs refusent de plus en plus les aliments préparés avec des agents conservateurs d'origine chimique. C'est pourquoi, les chercheurs se retournent vers la bio-conservation ou bien la technologie dite «douce» de conservation des aliments, c'est une conservation naturelle qui préserve les propriétés organoleptiques et nutritionnelles de l'aliment par l'utilisation de microorganismes vivants «bioconservateurs» (Costard *et al.* 2017; Samedi et Linton, 2019; Ringo, Van Doan *et al.*, 2020). C'est le cas des bactériocines des bactéries lactiques qui montrent une activité contre les microorganismes résistants aux antibiotiques classiques.

Les bactériocines sont des substances produites par des bactéries naturellement immunisées à leurs propres bactériocines, de nature protéique sécrétées dans le milieu extracellulaire présentant une activité inhibitrice à l'encontre d'un grand nombre de germes d'altérations (Cotter *et al.*, 2013; Woraprayote *et al.*, 2016). Leur spectre d'activité peut être plus ou moins large, quelque fois limité aux espèces proches phylogénétiquement des bactéries productrices (Woraprayote *et al.*, 2016).

L'objectif de notre travail est d'isoler et de purifier des souches lactiques à partir de lait de chamelle et de j'ben de chèvre de la région de Bir El Ater et de Gueriguer respectivement, wilaya de Tébessa, et de tester leur pouvoir antimicrobien dans le but de sélectionner des souches possédant une activité inhibitrice contre les germes pathogènes. Il s'agit aussi de vérifier le pouvoir protéolytique des LAB à hydrolyser les caséines du lait.

Ce manuscrit est divisé en deux parties, la première est consacrée à une synthèse bibliographique articulée autour du lait et des produits laitiers, à des généralités et à la classification des bactéries lactiques et leurs aptitudes technologiques, aussi à l'activité antimicrobienne de ces dernières et de la nature des substances inhibitrices. La seconde partie présente le matériel et les méthodes mises en œuvre dans le cadre de la réalisation de ce travail, les résultats obtenus et leurs discussions sont rassemblés aussi dans cette partie.

Chapitre

I

Le lait et les produits laitiers fermentés

Introduction

Le lait est un produit alimentaire indispensable pour les enfants, comme il s'avère très bénéfique pour l'adulte et fut de tous temps un symbole de fertilité, de richesse et d'abondance. Il représente un milieu biologique fortement altérable par voie microbienne en raison de sa forte teneur en eau, de son pH voisin de la neutralité et de sa richesse en composants biodégradables (lactose, protéines et lipides) (**Huyghebaert, 2006**). On peut le consommer à l'état frais ou alors le préserver comme produit laitier industriellement ou traditionnellement fabriqué, sa transformation lui permet une conservation de longue durée (**Bencharif, 2001**). L'Algérie a une tradition bien établie sur les produits laitiers, transmise de génération en génération. (**Claps et Morone, 2011**). Une grande variété de produits laitiers fermentés est préparée traditionnellement par l'intermédiaire des bactéries lactiques, dont le but est la biopréservation du lait. (**Benkerroum et al., 2004**).

I.1. Définition du lait

Le lait destiné à l'alimentation humaine a été défini en 1909 par le congrès international de la répression des fraudes : « le lait est le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum » (**Achezegag et al., 2008**).

Le lait est alors un aliment complet qui est produit de la sécrétion mammaire normale des mammifères comme la vache, la chèvre, et la brebis, destiné à l'alimentation du jeune animal naissant, obtenu par une ou plusieurs traites, sans aucune addition ou soustraction. Il apparaît comme un liquide opaque, sa couleur est généralement blanchâtre, mate, plus ou moins jaunâtre selon sa teneur en β -carotènes et en matière grasse, à odeur peu marquée mais reconnaissable et un goût douceâtre, sécrété par les glandes mammaires. (**Marcel, 2007**).

I.1.1. Le lait de chamelle

Le lait camelin est d'une couleur blanche opaque, en raison de sa structure et de sa teneur en matière grasse, relativement pauvre en β . carotène. Il est légèrement sucré, avec un goût acide, parfois même salé et/ou amer (**Siboukeur, 2008**). Il est plus visqueux que le lait bovin, mousseux quand il est légèrement secoué et considéré comme ayant un goût désagréable. Ces caractéristiques dépendent du type de fourrage ingéré ainsi que de la disponibilité en eau (**Sboui et al., 2009**). Le lait de dromadaire frais a un pH compris entre 6.5- 6.7, il est légèrement plus acide que le lait de vache mais similaire à celui du lait de

brebis. Son point de congélation varie entre -0.57°C et -0.61°C , il est donc plus bas que celui du lait bovin (-0.51°C à -0.56°C) (Park et Haenlein, 2006).

I.2. Composition biochimique du lait

De manière générale, le lait contient une forte proportion d'eau environ 87%. Le reste est représenté par l'extrait sec (environ 130g par litre). Les principaux constituants de cet extrait sec sont : les lipides (constitués essentiellement de graisses ordinaires : triglycérides), les protides (caséine, albumine et globuline), les glucides, essentiellement le lactose et les éléments minéraux (Ca^{2+} , Na^{+} , K^{+} , Mg^{2+} , Cl^{-}). De nombreux autres constituants sont présents en quantité minime comme les vitamines, les enzymes, les nucléotides, et du gaz dissous dont certains ont une grande importance du fait de leur activité biologique. Cette composition varie selon différents facteurs liés généralement aux animaux. Les principaux facteurs sont : l'individualité, la race, les périodes de lactation, l'alimentation, la saison, l'âge et l'espèce (Lapointe-Vignola, 2002; Vimahieu, 2005).

Tableau 1: Composition du lait chez divers mammifères (Dillon, 2008).

Eléments en g/l	Vache	Chèvre	Brebis	Chamelle
Eau	900-910	900	860	902
Extrait sec total (EST)	125-135	140	190	140
Matière grasse	35-45	45-50	70-75	46
Matière protéique	30-36	35-40	55-60	36
Caséines	27-30	30-35	45-50	28
Protéines solubles	4-5	6-4	8-10	8
Matière minérale	7.5-8.2	8-10	10-12	7.2
Lactose	40-50	40-45	45-50	50

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

I.3. Caractéristiques physico-chimiques du lait:

Les principales propriétés physico-chimiques du lait sont représentées par sa densité, son point de congélation, son point d'ébullition et son acidité. Sur le plan physique, c'est à la fois:

- une solution (lactose, sels minéraux).
- une suspension (matières azotées).
- une émulsion (matières grasses).

Son pH est légèrement acide (compris entre 6.5 et 6.8 pour le lait de vache et entre 6.2 et 6.82 pour le lait de chèvre). Par contre, il est légèrement basique pour le lait humain (compris entre 7 et 7.5), l'acidité du lait augmente avec le temps suite à la transformation du lactose en acide lactique. Cette acidité permet d'avoir un indicateur du degré de conservation. Pour cela, on utilise le degré Dornic (°D) (Hebboul *et al.*, 2005 ; Dillon, 2008). Le lait est un produit très complexe. Une connaissance approfondie de sa composition, de sa structure et de ses propriétés physiques et chimiques est indispensable à la compréhension de ses différentes transformations (Amiot *et al.*, 2002).

I.4. La microflore du lait

Les microorganismes du lait sont répartis en deux grandes classes:

I.4.1. La microflore indigène ou originelle

Ensemble des microorganismes retrouvés dans le lait à la sortie du pis, ces microorganismes dépendent de l'alimentation, de la race et d'autres facteurs. Les genres dominants sont principalement des microorganismes mésophiles (*Micrococcus* sp., *Lactobacillus* sp. *Streptococcus* ou *Lactococcus* et les bactéries à gram négatif) (Lamontagne *et al.*, 2002).

I.4.2. La microflore contaminante

Ensemble des microorganismes ajoutés au lait de la récolte jusqu' à la consommation, elle peut se composer d'une flore d'altération qui cause des défauts sensoriels ou qui réduit la durée de conservation des produits et d'une flore pathogène.

- **La microflore d'altération:** responsable de diverses dégradations du produit au niveau du goût, de l'arôme, de l'apparence ou de la texture. Par exemple, texture visqueuse à la surface du fromage, présence de longs filaments dans le lait, caillage du lait, production de mauvaises odeurs (soufrée, ammoniacale, fruitée et atypique) dues à certaines activités métaboliques telles que la protéolyse ou la lipolyse et gazéification du lait provoquant des trous involontaires ou des gonflements durant l'affinage du fromage. Les principaux microorganismes d'altération sont :

Pseudomonas sp., *Proteus sp.*, Coliformes, principalement *E. coli*, *Enterobacter*, les sporulés tels que les *Bacillus sp.*, *Clostridium* et certaines levures et moisissures. (Lamontagne *et al.*, 2002).

- **La microflore pathogènes:** sa présence dans le lait est due à l'animal, à l'environnement ou à l'homme. Ces bactéries sont infectieuses ou toxigènes responsables des affections liées à la santé des manipulateurs et des consommateurs. (Lamontagne *et al.*, 2002). On en retrouve deux genres :
- **Les bactéries infectieuses:** qui doivent être vivantes dans l'aliment lors de sa consommation pour agir. Une fois ingérées, elles dérèglent le système digestif. Apparaissent alors divers symptômes connus, tels que la diarrhée, les vomissements, les maux de tête et même la mort, dans certains cas extrêmes. Il s'agit de *Salmonella sp.*, *E. coli* 0157 :H7, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Brucella* et *Campylobacter sp.* (Lamontagne *et al.*, 2002).
 - **Les bactéries toxigènes:** qui produisent une toxine dans l'aliment et c'est cette toxine qui rend le consommateur malade. Il n'est donc pas suffisant de détruire la bactérie pour éviter l'incidence de la maladie. De plus, certaines toxines sont très résistantes aux traitements thermiques, telle que la pasteurisation et même la stérilisation, dans certains cas. Il s'agit de *Staphylococcus sp.* et *Clostridium botulinum*. (Lamontagne *et al.*, 2002).

I.5. Les produits laitiers fermentés

Les produits laitiers algériens ont été peu caractérisés. Ils sont cousins de produits laitiers largement consommés dans beaucoup de pays méditerranéens et sub-sahariens. (Koussou *et al.*, 2007). En Algérie, le lait fermenté et fromages sont fabriqués traditionnellement le plus souvent par les femmes à la maison (Medouni *et al.*, 2005) et servent à l'autoconsommation, le surplus pouvant être vendu. (Bencharif, 2001).

I.5.1. Rayeb

Le Rayeb est un lait caillé, traditionnellement obtenu après acidification spontanée à température ambiante durant une période qui varie de 24h à 72h selon la saison. (Mechai *et al.*, 2014; Bendimerad, 2013). La fermentation est associée à des bactéries lactiques mésophiles appartenant aux *leuconostocs* et aux *lactocoques* présents naturellement dans le lait cru. (Guizani *et al.*, 2001 ; Benkerroum et Tamime, 2004).

I.5.2. L'ben

L'origine de ce produit remonte à des temps immémoriaux,. Sa fermentation lactique lui donne son arôme naturel et sa saveur inimitable. Le lait est abandonné à lui-même jusqu'à sa coagulation. Celle-ci se fait à température ambiante et dure 24h à 48h selon la saison. Le barattage qui lui succède dure 30 à 40 minutes. A la fin du barattage, on ajoute généralement un certain volume d'eau tiède (environ 10% du volume du lait), de façon à ramener la température de l'ensemble à un niveau convenable au rassemblement des grains de beurre. **(Ouadghiri., 2009 ; Benkerroum et Taamime., 2004).**

I.5.3. Zebda et Smen

Le beurre frais Zebda est obtenu après barattage du Rayeb. Ce dernier est occasionnellement augmenté d'une quantité d'eau tiède (40-50 °C) à la fin du barattage pour favoriser l'agglomération des globules lipidiques et accroître le rendement en beurre. Les globules gras apparaissant en surface, à la suite du barattage, ils sont séparés par une cuillère perforée. Le beurre frais obtenu présente une consistance molle du fait de la forte concentration en eau. Le surplus de beurre produit est transformé en beurre rancie Smen par lavage du beurre frais à l'eau tiède, puis saumurage et salage à sec (saupoudrage à la surface; 8-10g/ 100g) **(Benkerroum et Tamine, 2004).**

I.5.4. Bouhezza

Ce type de fromage est répandu dans le territoire des Aurès (Zone Chaouia). Il est fabriqué à partir du lait de chèvre, de vache ou de brebis baratté et écrémé (lben). **(Aissaoui et al., 2006).** Le salage, l'égouttage et l'affinage sont réalisés simultanément dans une outre perméable (chkoua) avec incorporation de poudre du piment rouge, la fabrication de bouhezza dure plusieurs semaines à plusieurs mois, il a un goût acidulé fort caractérisé au fromage. **(Zaidi., 2002).**

I.5.5. Le J'ben

Le J'ben est un produit laitier connu et consommé en Algérie depuis fort longtemps au niveau des zones steppiques et sahariennes aussi bien en milieu rural qu'en milieu urbain. Ce fromage est le produit d'une transformation des laits d'un cheptel diversifié et d'une fermentation par une flore lactique indigène.

Ce fromage frais traditionnel regroupe des produits aux caractéristiques très variées issues de pratiques de fabrication différentes **(Nouani et al., 2009).**

Le jben est généralement obtenu par macération de certaines plantes (fleurs de chardon ; *Cynara cardunculus L*, *Cynara scolymus*) dans le lait de vache ou de brebis pour assurer la coagulation ou par ajout de caillette séchée de jeunes ruminants au lait, et l'égouttage se fait dans une mousseline pendant 2 à 3 jours suivant la saison. le coagulum obtenu après cette opération représente le j'ben (Ouahghiri *et al.*, 2005).

Tableau 02 : Paramètres physico-chimiques du Jben (Guétouache *et al.*, 2015).

pH	Acidité D°	Matière sèche	Matière grasse	Teneur en protéine	NaCl	Lactose	Cendre
4.42	79.4	55.8 g/ml	16.83 %	15.8 %	0.5 g/100g	4.1 g/100g	28 g

Chapitre



Les bactéries lactiques

Introduction

Les bactéries lactiques sont depuis longtemps associées à leurs multiples rôles dans les industries agro-alimentaires. Leur intervention est à la base de la transformation de la matière première et à l'élaboration des produits fermentés.

Des traces archéologiques ont été retrouvées en Egypte, indiquant que depuis le néolithique, l'homme maîtrise les procédés de caillage du lait (Carée-Mlouka, 2019). Très rapidement l'homme, a su exploiter les bactéries lactiques pour la production d'aliments fermentés lactés tels que les yaourts ou les fromages, mais également des produits à base de légumes, de céréales, de poissons ou de viande, afin de modifier le goût et la texture des produits fermentés, et inhibent les bactéries d'altération des aliments en produisant des substances inhibant leur croissance (Kenneth, 2011). Des progrès importants dans la classification de ces bactéries sont apparus quand les similitudes entre les bactéries du lait acidifié et les autres bactéries productrices d'acide lactique étaient reconnues (Axelsson., 2004).

II.1. Définition

L'appellation de bactéries lactiques (*lactic acid bacteria*) avant le vingtième siècle, a été utilisée pour désigner les organismes du lait acidifié (Milk-souring organisms). Significativement, la première culture pure de ces bactéries qui a été obtenue par Lester (1873), était celle de *bacterium lactis* (probablement *lactococcus lactis*) (Axelsson., 2004). Actuellement, les bactéries lactiques forment treize groupes de genres bactériens différents: *lactococcus*, *lactobacillus*, *streptococcus*, *enterococcus*, *pediococcus*, *aerococcus*, *alococcus*, *carnobacterium*, *oenococcus*, *weisella*, *tetragenococcus*, *vagococcus*, et *bifidobacterium* (Dortu et Thonart, 2009). De plus ils ont en commun la capacité de fermenter les sucres en acides lactiques, ainsi de synthétiser leur ATP durant cette fermentation.

II.2. Groupes des bactéries lactiques

Selon le type de fermentation, les bactéries lactiques sont subdivisées en deux groupes principaux :

- **Groupes des bactéries homofermentaires** : produit majeur (85%) de cette fermentation est l'acide lactique (Reddy *et al.*, 2008; Ross *et al.*, 2002). Elles fermentent les hexoses

principalement le glucose par la voie glycolytique (Figure 1), mais elles ne peuvent pas fermenter les pentoses ou le gluconate. Ce groupe comprend tous les lactobacilles thermophiles trouvés dans les cultures starter, *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii*, subsp. *bulgaricus* et subsp. *lactis* (Hammes et Hertel, 2009). Cette classe regroupe aussi les *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*

-Groupes des bactéries hétérofermentaires: ce groupe exploite la voie (hexose monophosphate ou pentose), ce qui conduit à la production des quantités équimolaires de lactate, CO₂, d'éthanol ou d'acétate. Les membres de ce groupe incluent *Leuconostoc*, *Weissella* et quelques lactobacilles. (Ross et al., 2002; Vasiljevic et Shah, 2008).

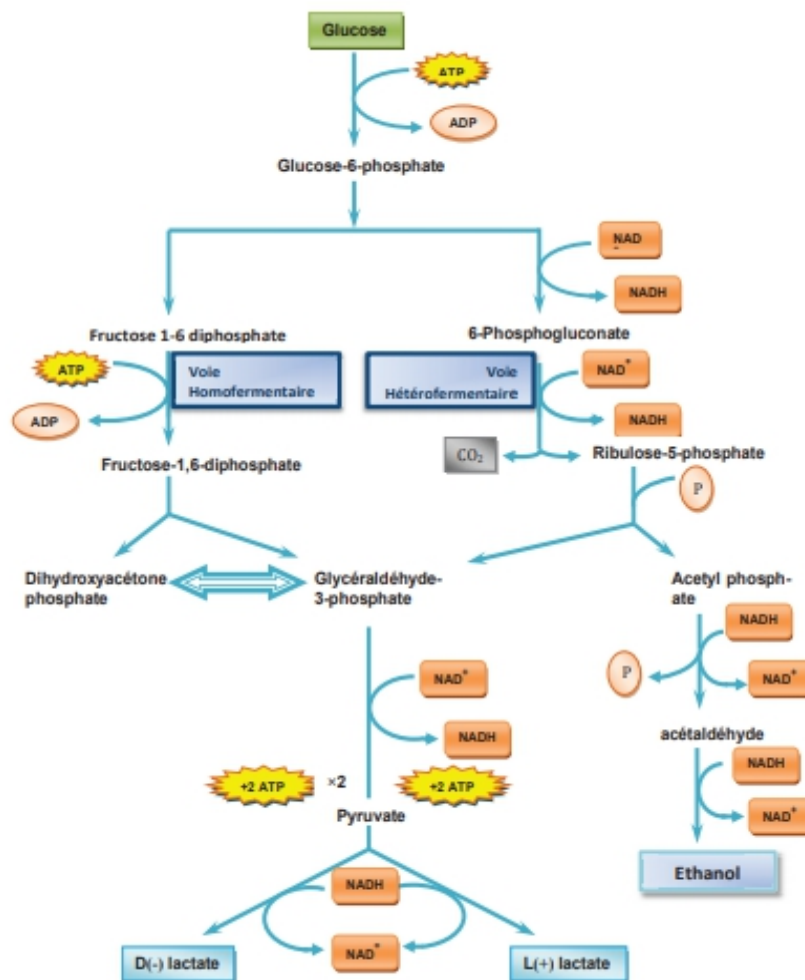


Figure 01 : Les principales voies métaboliques des bactéries lactiques (Source Perry et al., 2004).

II.3. Origine

Les bactéries lactiques se trouvent généralement dans certains aliments riches en sucres simples. Elles sont très ubiquistes, colonisent de nombreux habitats comme le lait et les produits laitiers, les végétaux, la viande, le poisson, les muqueuses humaines, et les eaux d'égout. Il semble que chaque espèce ou groupe d'espèces ait un métabolisme bien adapté à son environnement (**Corrieu et luquet, 2008**).

Les espèces du genre *Lactococcus* sont isolées du lait ou de certains végétaux, les réservoirs naturels de la plupart de ces espèces. Les espèces *Lactococcus lactis, subsp. lactis* sont isolées pour la première fois à partir du lait fermenté en 1873 par Lister et reconnues comme agent primaire de l'acidification du lait caillé (**Bergey's manual., 2009**).

Parmi les espèces du genre *Streptococcus*, *Streptococcus thermophilus* est isolée à partir du lait pasteurisé, du matériel de laiterie et de levains artisanaux.

Les espèces du genre *Leuconostoc* sont présentes dans différents produits comme: le lait, les produits laitiers, les fruits, les légumes (en particulier la betterave), les végétaux en fermentation (comme la choucroute), les produits de la panification et des solutions visqueuses de sucre dans les sucreries.

Les espèces du genre *Pediococcus* se trouvent surtout dans les végétaux en décomposition, parfois dans les boissons alcoolisées, le lait, les différents fromages (Parmesan et autres fromages italiens) et certaines préparations culinaires (Saucisses, anchois salés ou sauce de soja) (**Bekhouche ., 2006**).

Les espèces du genre *Lactobacillus* sont isolées de différents milieux : dans le lait, le yaourt, le fromage, les végétaux, la bouche, le tractus intestinal, le rumen, le fourrage, le kéfir, les produits carnés et le pain.

II.4. Caractéristiques générales

Les bactéries lactiques sont un groupe de bacilles ou coccobacilles à Gram positif qui ont moins de 55 mol % de contenu G+C dans leur matériel génétique (à l'exception des bifidobactéries) (**Ammour, 2004**). Ce sont des procaryotes hétérotrophes et chimioorganotrophes, non sporiformes, sauf *Sporolactobacillus inulinus* qui est une bactérie lactique sporulée unique (**Doores, 2014**), généralement immobiles, dont certaines d'entre elles sont flagellées et présentent une mobilité ; *Lactobacillus agilis* et *Lactobacillus ruminis*

(Akinobu *et al.*, 2016). Elles sont dépourvues de catalase et de cytochrome et se comportent comme des «anaérobies aérotolérants» ; tolèrent de petites quantités d'oxygène mais de trop grandes teneurs peuvent être néfastes, à cause de la présence d'une peroxydase qui est moins efficace que la catalase dans l'élimination du H₂O₂ toxique accumulé (Mathieu, 2007; Kenneth, 2011). Les LAB ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminées, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les sucres. (Mathieu, 2007).

II.5. Classification des bactéries lactiques

Depuis la description de *Bacterium lactis*, la taxonomie des LAB est en évolution permanente. Le nombre des nouvelles espèces a augmenté énormément. Les réorganisations effectuées ont contribué à fusionner des espèces en une seule, ou identifier une espèce comme un nouveau genre (Pot,2008). La première classification des bactéries lactiques a été établie par Orla Jensen en 1919, il les a classés traditionnellement selon les caractéristiques observables comme la morphologie, les propriétés biochimiques et physiologiques (Tableau 3). Les marqueurs chimiotaxonomiques, comme la composition des acides gras et les constituants de la membrane cellulaire, ont été également utilisés pour la classification (Holzapfelet *al.*, 2001).

Tableau 3: Quelques genres de bactéries lactiques (Bekhouche., 2006).

Genres	Cellules		fermentation	ADN G+C(%)
	Forme	Arrangements		
<i>Streptococcus</i>	Coques	Chaines	Homolactiques	34-46
<i>Leuconostoc</i>	Coques	Chaines	hétérolactiques	36-43
<i>Pediococcus</i>	Coques	Tétrades	Homolactiques	34-42
<i>Lactobacillus</i>	Bacilles	Chaines	Homolactiques et hétérolactiques	32-53

Des études concernant cette classification phénotypiques, basées sur la comparaison des séquences de l'ARN ribosomal 16S ont montré que certains taxons générés sur la base de la caractérisation phénotypique ne concordent pas avec les relations phylogénétiques suggérées.

Donc, certaines espèces ne sont pas faciles à distinguer par leurs caractéristiques traditionnelles (Gevers, 2002). Par conséquent, Les méthodes de typage moléculaire comme: l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE), la réaction de polymérisation en chaîne utilisant des éléments répétés (rep-PCR), sont extrêmement précieux lors de la caractérisation et la détection des bactéries lactiques (Holzapfel *et al.*, 2001).

Les bactéries lactiques se trouvent dans deux embranchements différents selon les données de séquençage de 16S et 23S de l'ARNr (Figure 2). Au sein des firmicutes les genres les plus importants sont *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* (Carine *et al.*, 2009), qui appartiennent à l'ordre des lactobacillales et sont des organismes à faible teneur en GC (31-49%). Les bactéries lactiques typiques ont une teneur en G+C inférieure à 50%. Mais au sein de la branche des actinomycètes qui comprend *Propionibacterium*, *Brevibacterium* et aussi le genre *Bifidobacterium* a une teneur élevée en GC (58-61%) (Klaenhammer *et al.*, 2005; Pfeiler et Klaenhammer 2007; Horvath *et al.*, 2009).

Il y a peu de corrélation entre la classification traditionnelle et la parenté phylogénétique des bactéries lactiques. Ainsi les genres morphologiquement distincts, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus*, sont phylogénétiquement entremêlés (Gevers, 2002).

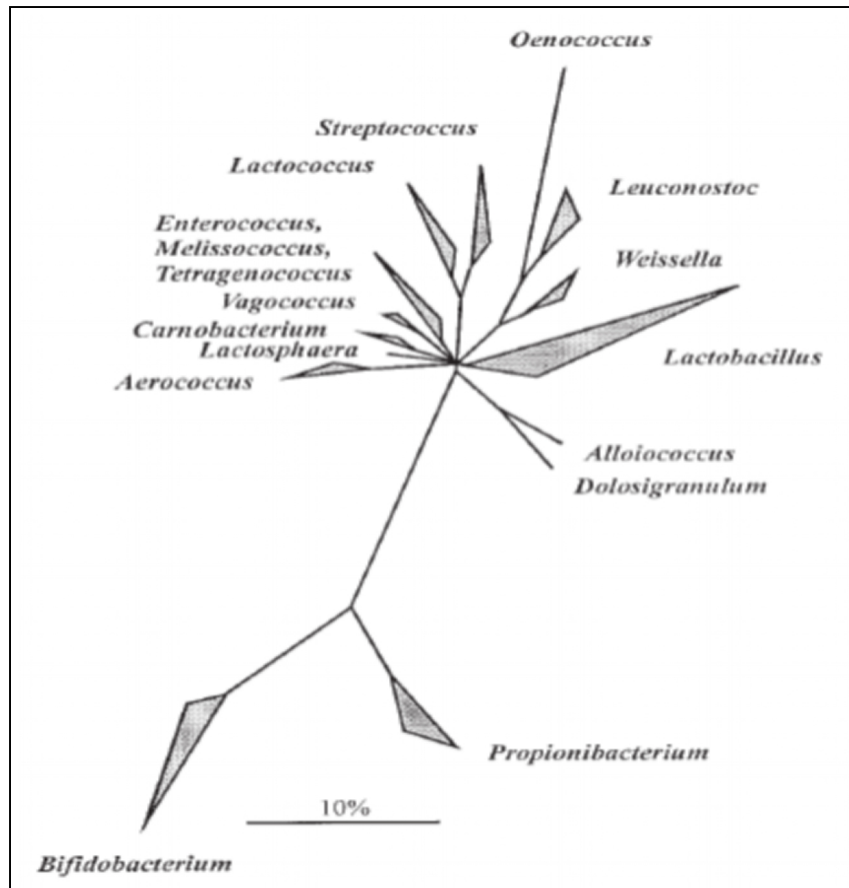


Figure 2: Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et les genres associés, obtenu par analyse des ARNr 16S. (Stiles&Holzapfel., 1997).

II.6. Principaux genres de bactéries lactiques

II.6.1. Le genre *lactobacilles*

Considérées comme les plus importantes bactéries dans l'industrie alimentaire et en nutrition humaine, plusieurs espèces de ce genre sont utilisées comme ferments dans la biopréservation des aliments. De plus, elles sont exploitées comme probiotiques ou encore comme vecteurs de vaccin. Les cellules se présentent en forme de bâtonnets (parfois incurvés) non sporulants et parfois des coccobacilles, isolés ou en chainettes de taille variable (Figure 3), asprogènes, immobiles ou mobiles grâce à des flagelles péritriches, dépourvues de catalase et de cytochrome oxydative. Les *lactobacilles* sont généralement anaérobies facultatifs ou microaérophiles. Les *lactobacilles*, sont connues pour leur acidophilie (pH optimal entre 5.5 et 6.2 mais peuvent tolérer des pH allant de 3 à 8) et pour leur aptitude de croissance dans un large spectre de températures allant de 2°C à 53°C. Leur GC% est de 36 à 47 (Salvetti *et al.*, 2012).

Les *lactobacilles* réalisent la fermentation homolactique suivant la voie d'Embden-Meyerhof (EMP) ou la fermentation hétérolactique suivant la voie des pentoses phosphates (PP). Selon le type fermentaire et le résultat des produits de fermentation, les *lactobacilles* sont subdivisés en trois sous-groupes (Salveti *et al.*, 2012) :

- ◆ **Groupe A “*Thermobacterium*”** : les espèces de ce groupe ont un métabolisme strictement homofermentaire, ce groupe ne fermente que les hexoses en acide lactique via la voie EMP, obligatoire **thermophile**. Il est principalement connu par les espèces : *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. acidophilus*; souvent utilisées en industrie laitière.
- ◆ **Groupe B “*Streptobacterium*”** : comprenant les *lactobacilles* hétérofermentaire facultatifs et mésophiles. Ce groupe connu par les espèces : *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. graminis*...etc, est caractérisé par la capacité de fermenter les hexoses en acide lactique via la voie EMP ; et à dégrader les pentoses et le gluconate par la voie du PP avec production de l'acide acétique, de l'éthanol et de l'acide formique.
- ◆ **Groupe C “*Betabacterium*”** : englobant les *lactobacilles* hétérofermentaires stricts ; les bactéries de ce groupe fermentent exclusivement, les hexoses et les pentoses en acide lactique, de l'acide acétique, éthanol et CO₂ à travers la voie du phosphogluconate. Ce groupe comprend des espèces à faible capacité acidifiante (0.5% d'acide lactique) tels que : *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, *Lb. fermentum*, *Lb. kefir*...etc.



Figure 3 : Souche de lactobacilles observée par microscopie électronique à balayage. (Tirée de www.inra.fr)

II.6.2. Le Genre *Carnobacterium*

Considéré pendant longtemps comme des *lactobacilles* atypiques, isolés généralement des produits d'origine animale (bœuf, volaille, poisson...), réfrigérés ou emballés sous vide.

Elles se présentent en forme de petits bâtonnets isolés, par paires ou en courtes chaînes, asporogènes, mobiles ou non, ces bactéries peuvent se développer à 10°C mais pas à 45°C, ni en présence de 8% de NaCl, comme elles peuvent supporter un pH allant de 6.8 à 9. Ce genre est désigné par l'espèce type *Carnobacterium divergens* et cinq autres : *Cb.mobile*, *Cb.funditum*, *Cb.alterfunditum*, *Cb.gallinarum*, *Cb.pscicola* (Hammes et Hertel, 2006).

II.6.3. Le genre *Streptococcus*

Englobant les streptocoques lactiques, en forme de coque ou bacilles courts, groupés en longues chaînes (Figure 4), à Gram positif, catalase négative, non mobile, asporogènes et muni d'un métabolisme homofermentaire. La majorité des streptocoques sont des opportunistes pathogènes ; qui colonisent les muqueuses membranaires humaines et animales et sont souvent retrouvés sur la peau, la gorge et les voies respiratoires supérieures (Krzyściak *al.*,2013). Connu par l'espèce type *Streptococcus salivarius*, ce genre peut pousser dans un spectre de température variant de 10°C à 45°C, comme il peut croître à un pH de 9.6 et en présence de 6.5% de NaCl et 0.1 % bleu de méthylène.



Figure 4: Morphologie cellulaire de *Streptococcus thermophilus* observée par microscopie électronique. Tirée du site :

(https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Streptococcus_thermophilus).

II.6.4. Le genre *Enterococcus*

Ce genre regroupe les streptocoques fécaux qui appartiennent au groupe D. Ce sont des commensaux de l'intestin. Les espèces rencontrées dans l'alimentation sont essentiellement *En. faecalis* et les espèces proches. Les entérocoques sont des coques qui peuvent être mobiles (Figure 5), homofermentaires, généralement différenciées par la fermentation de

l'arabinose et le sorbitol, ils croissent entre 10°C et 45°C dans un milieu salé à 6,5% de NaCl, à un pH de 9,6 ou dans un milieu contenant 40% de bile (Tamime, 2002 ; Ho *et al.*, 2007).

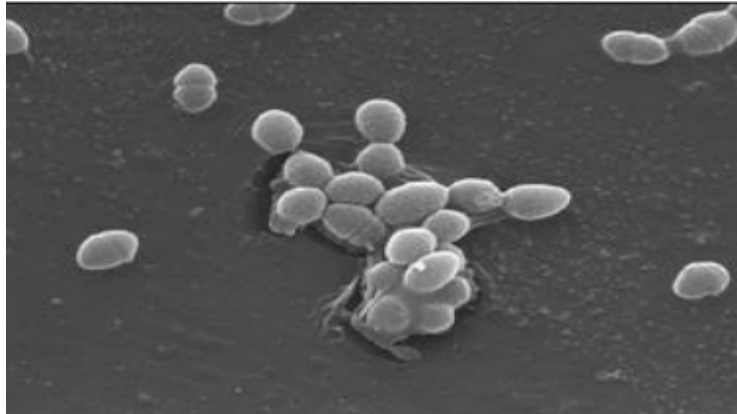


Figure 5 : morphologie cellulaire d'*Enterococcus faecalis* observée par microscope électronique. Adaptée du site :

(https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Enterococcus_faecalis).

II.6.5. Le genre *Lactococcus*

Le genre *Lactococcus* (streptocoque du groupe N) regroupe des cocci associés en paires ou en chaînes (Figure 6), à Gram positif (Lazreg, 2017). Ils sont des aéro-anaérobie facultatifs, immobiles, mésophiles, homofermentaires, produisant uniquement l'acide lactique, à l'exception de *Lactococcus lactis*, Ssp. *Lactis*, Biovar. *diacetylactis* qui produit le diacétyle. Leur température optimale de croissance est proche de 30°C, capable de se développer jusqu'à 10°C, mais pas à 45°C. Les lactocoques jouent un rôle d'agent acidifiant « bioconservateur » en technologie laitière. (Tchamba, 2007).

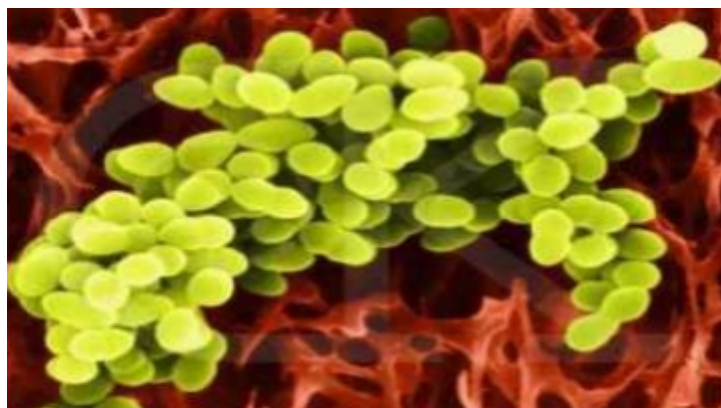


Figure 6 : Morphologie en microscope électronique de *Lactococcus lactis subsp lactis* x1000 (Menad, 2017).

II.6.6. Le genre *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*

Ce sont des microorganismes procaryotes, mésophile, saprophytes, asporulés, habituellement non mobiles, dépourvus d'oxydase et de catalase, à Gram positif. Les bactéries de ce genre définies pour la première fois par Vantieghem (1878), appartenant à la famille des *Leuconostocaceae*, anaérobies facultatives avec une forme ovoïde, associées en paires ou en chaînes courtes, elles colonisent des écosystèmes très variés tels que les végétaux et les animaux (**Hannachi ., 2008**). Leur température optimale de croissance se situe entre 25°C et 30 °C. Les *leuconostoc* sont caractérisés par un métabolisme hétérofermentaire, ils produisent de l'acide lactique, du CO₂ et de l'éthanol (**Ho, 2008**). Les caractéristiques telles que l'hydrolyse de l'esculine, la formation de dextrane, les conditions de croissance, la capacité à croître à différentes pH et température, l'assimilation de citrate et/ou malate permettent la différenciation entre les genres *Leuconostoc* et *Weissella* (**Pilet et al., 1998; Ho et al., 2007**). Les *Leuconostocs* sont également anaérobies facultatifs et exigeants au point de vue nutritionnel et leur croissance est toujours lente. En association avec les *lactocoques*, les *leuconostoc* principalement *Ln.mesenteroide* sssp. *cremoris* et *Ln. Lactis* sont utilisés pour produire en plus de l'acide lactique et du CO₂, des substances aromatiques tels que le diacétyl et l'acétoïne à partir des citrates du lait dans l'industrie laitière (**Hassan et Frank., 2001 ; Guiraud, 2003 ; Ogier et al., 2008**).

II.6.7. Le genre *Pediococcus* et *Tetragenococcus*

Les *Pediococcus* sont des coques homofermentaires, le caractère particulier de ce genre est le regroupement en tétrade. Ils sont mésophiles, le plus souvent incapables d'utiliser le lactose, la présence de divers facteurs de croissance est obligatoire pour leur développement. Certaines espèces, comme *Pediococcus halophilus*, renommés *Tetragenococcus halophilus* et *Tetragenococcus muriaticus* ont une capacité à teneur en sel très élevée qui tolère jusqu'à 18% de NaCl (**Pilet et al., 2005**). Les espèces de *Tetragenococcus* ont un rôle crucial dans la fabrication des produits alimentaires à concentration élevée en sel telles que les sauces de soja, alors que les *Pedicoques* sont parfois utilisés comme levains lactiques pour les charcuteries (**Guiraud et Rosec., 2004 ; Tosukhowong et al., 2005**).

II.6.8. Le genre *Bifidobacterium*

Le genre *Bifidobacterium* est considéré comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques grâce à la similarité de ses propriétés physiologiques et biochimiques et à sa présence dans le même habitat écologique, tel que le tube gastro-intestinal. Ces microorganismes sont phylogénétiquement sans rapport avec ces dernières. Ils sont davantage

liés au phylum Actinobacteria (anciennement Actinomycètes) des bactéries Gram positif dont l'ADN est à haut pourcentage de G +C. Les bifidobactéries se caractérisent par leur forme très irrégulière en forme V, X ou Y mais pouvant être coccoïdes (Figure 7). La présence d'une enzyme, la fructose-6-phosphate phosphocétolase leur permet de fermenter les hexoses en produisant de l'acide acétique et de l'acide lactique. Leur température de croissance varie de 36°C à 43°C (Axelsson, 2004; Holzapfel & Wood, 2014).

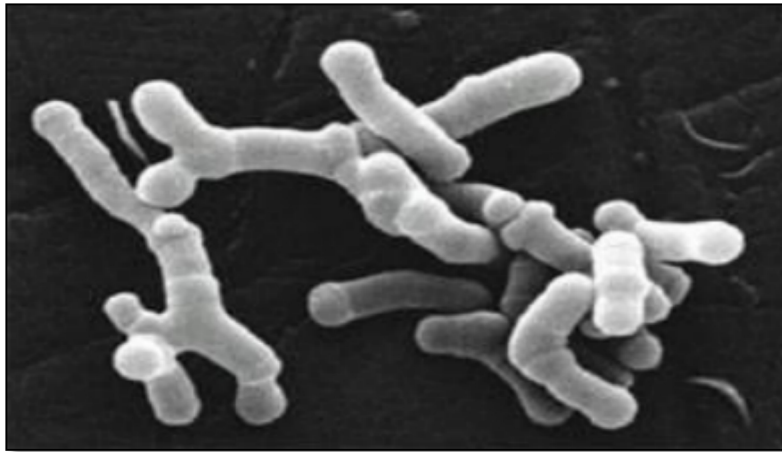


Figure 7: Morphologie cellulaire de *Bifidobacterium longum* observée par microscope électronique. Adaptée du site : (https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bifidobacterium_longum).

II.7. Aptitudes technologiques des bactéries lactiques

II.7.1. Aptitude acidifiante

La fonction acidifiante constitue la propriété métabolique la plus recherchée des bactéries lactiques utilisées dans les industries alimentaires. Elle se manifeste par la production de l'acide lactique à partir de la fermentation des hydrates de carbone au cours de la croissance bactérienne (Mäyrä- Mäkinen et Bigret, 2004 ; Monnet *et al.*, 2008). Les conséquences, d'ordre physico-chimique et microbiologique, peuvent se présenter par:

- ◆ Accumulation d'acide lactique participant à la saveur des aliments fermentés.
- ◆ Abaissement progressif du pH des milieux de culture et des matrices alimentaires.
- ◆ Limitation des risques de développement des flores pathogènes et d'altération dans les produits finaux.

- ◆ Déstabilisation des micelles de caséines, coagulation des laits et participation à la synérèse.

II.7.2. Aptitude protéolytique

Les bactéries lactiques possèdent des protéinases et des peptidases nécessaires à la dégradation des protéines du lait en peptides et acides aminés, ceux-ci peuvent alors être transformés en alcools et en acides, Cette activité protéolytique intervient de ce fait dans les caractéristiques du produit final.

Technologiquement, l'activité protéolytique constitue un caractère très important qui fait des bactéries lactiques les seuls agents microbiens d'affinage de la majorité des fromages (**Mahi, 2010**), De nombreuses protéases sont synthétisées par les bactéries lactiques qui peuvent être des aminopeptidases, dipeptidases ou tripeptidases, situées au niveau de la membrane plasmique ou dans le cytoplasme (**Bennama, 2012**).

II.7.3. Aptitude lipolytique

Les propriétés lipolytiques sont généralement faibles chez les bactéries lactiques, les *lactocoques* sont considérés comme plus lipolytiques que *Streptococcus thermophilus* et les lactobacilles. Elles peuvent cependant présenter un intérêt pour certaines applications fromagères (**Béal et al., 2008**). D'une manière générale on distingue les estérases qui hydrolysent de façon préférentielle les esters formés avec les acides gras à chaîne courte (C2-C8) et les lipases qui sont actives sur des substrats émulsifiés contenant des acides gras à chaîne longue (>C8), ces enzymes sont impliquées dans l'hydrolyse de mono, di, et triglycérides (**Béal et al., 2008 ; Serhan et al., 2009**).

II.7.4. Aptitude aromatisante

La production de composés aromatiques est liée à l'activité microbienne, plusieurs espèces de bactéries lactiques sont capables de les synthétiser, à partir du citrate notamment, divers composés tels que le diacétyle, l'acétoïne, l'acétate, principaux composés responsables de l'arôme des produits laitiers fermentés.

Le diacétyle est le principal composé qui participe à l'arôme de très nombreux produits laitiers qui sont issus du métabolisme du citrate par différentes espèces de bactéries lactiques. D'autres travaux ont montré la capacité de certaines bactéries lactiques à convertir les acides aminés en molécules aromatiques (**Hammi, 2016 ; Belkheir, 2017**).

II.7.5. Aptitude texturante

La capacité des bactéries lactiques à synthétiser des exopolysaccharides (EPS) joue un rôle important pour la consistance et la rhéologie des produits transformés. Les *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* produisant des EPS sont utilisés dans la fabrication des yaourts, ceci afin d'améliorer la texture, éviter la synérèse et augmenter la viscosité des produits finis. L'utilisation des EPS produits par la souche *Lc. lactis ssp. cremoris* est très prometteuse pour la structure et la viscosité des produits laitiers fermentés (Leroy et De Vuyst., 2004 ; Ho et al.,2007).

II.8. Intérêt des bactéries lactiques

Les LAB font partie des bactéries bénéfiques c'est pourquoi elles jouent un rôle d'un maillon très important que ce soit dans l'industrie alimentaire ou dans le domaine thérapeutique.

- **Dans l'industrie alimentaire** : les bactéries lactiques sont impliquées dans la fermentation et la bioconservation de différents aliments. Ainsi, les souches de *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* sont utilisées pour la production du yaourt, des fromages et des laits fermentés (Yateem et al., 2008). Le vin, les poissons, les viandes, les charcuteries, le pain au levain entre autres sont aussi des produits de fermentation par des bactéries lactiques (Badis et al., 2005). L'utilisation de ces dernières a pour but l'amélioration des caractéristiques organoleptiques des produits fermentés et l'augmentation de leur durée de conservation sans l'utilisation de conservateurs chimiques grâce aux substances antimicrobiennes qu'elles secrètent (Dortu et Thonart, 2009). Les souches utilisées en industrie alimentaire doivent répondre à certains critères : absence de pathogénicité ou activité toxique, capacité d'améliorer les caractéristiques organoleptiques, capacité de dominance, facilité de culture et de conservation, et maintenance des propriétés désirables durant le stockage (Marth et Steele, 2001).

- **Dans le domaine thérapeutique** : étant des probiotiques, les bactéries lactiques apportent des bénéfices à l'hôte en conférant une balance de la microflore intestinale, et en jouant également un rôle important dans la maturation du système immunitaire (Yateem et al.,2008). Différentes études ont démontré le rôle préventif aussi bien que curatif de ces bactéries sur plusieurs types de diarrhées (Mkrtchyan et al., 2010). D'autres ont cité leur capacité de diminuer les allergies liées aux aliments grâce à leur activité protéolytique (El-Ghaish et al.,

2011). Uehara *et al.*, (2006) ont démontré la capacité des souches de *Lactobacillus crispatus*, utilisées sous forme de suppositoires pour empêcher la colonisation du vagin par les bactéries pathogènes et de prévenir ainsi les rechutes chez les femmes qui souffrent d'inflammations fréquentes et répétées de la vessie.

Chapitre

III

*L'activité antimicrobienne des bactéries
lactiques*

Introduction

Les bactéries lactiques sont utilisées depuis longtemps de façon consciente ou non dans la fermentation et la bioconservation des aliments pour leur activité antimicrobienne (antibactérienne et antifongique). Cette activité leur permet de se développer préférentiellement dans divers écosystèmes. L'activité antagoniste des bactéries lactiques résulte de l'effet combiné de différents facteurs biologiques provenant de leurs activités métaboliques (**Chentouf, 2015**). Elles synthétisent des molécules à actions bactéricides et ou bactériostatiques (**Bouzaid et al., 2016**) tel que l'acide lactique et autres acides organiques, les acides gras, peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyl, la reutérine et les bactériocines.

III.1. Les composés antimicrobiens produits par les bactéries lactiques

III.1.1. Les acides organiques

Les acides organiques sont considérés comme le produit principal du métabolisme des bactéries lactiques. Ces derniers sont produits soit par voie homofermentaire dont le métabolisme du pyruvate conduit à la formation uniquement de l'acide lactique, soit par voie hétérofermentaire qui conduit à la formation d'acide lactique, acétique et formique, d'éthanol et de dioxyde de carbone (**Liu, 2003**).

Dûes à la production des acides organiques, les bactéries lactiques abaissent le pH du milieu dans lequel elles se multiplient en inhibant une partie de la flore qui s'y développe (**Dorti, 2008**). Outre la diminution du pH du milieu le pouvoir antimicrobien des acides organiques repose sur la pénétration de l'acide indissocié dans le cytoplasme des autres cellules. En effet, la forme non dissociée de l'acide peut traverser librement la membrane ou elle s'ionise (production des protons) provoquant ainsi l'acidification du cytoplasme, ce qui affecte le métabolisme cellulaire en inhibant certaines fonctions, par interférence avec le potentiel membranaire cellulaire en inhibant le transport actif (**Cotter et Hill, 2003; Janssen et al., 2007; Ross et al., 2002**). L'activité antagoniste des acides est influencée selon leurs types et leurs taux de production pendant la fermentation.

Les acides organiques présentent l'avantage d'avoir un large spectre d'action comprenant des bactéries à Gram positif, à Gram négatif, des levures et des moisissures (**Ross et al., 2002**).

III.1.2. Le peroxyde d'hydrogène

Les LAB ne possèdent pas de catalase, ou bien une pseudo-catalase. Dans les deux cas, elles ne peuvent pas dégrader le peroxyde d'hydrogène, produit en croissance aérobie grâce à des flavoprotéines oxydases, à des NADH peroxydases, NADH oxydases ou α -glycérophosphate oxydases (**Ross *et al.*, 2002 ; Magnusson, 2003**). Cette molécule présente de nombreux inconvénients qui limitent son utilisation en tant qu'agent conservateur. Elle a notamment un effet nocif sur les organismes impliqués dans l'élaboration des aliments ainsi que sur la santé humaine et peut avoir des effets potentiellement négatifs ou indésirables sur les qualités sensorielles des aliments (**Dortu, 2008**). Elle présente ainsi un spectre d'activité plus large, notamment contre les champignons. Ce système a par exemple montré son efficacité contre *Candida albicans* (**Magnusson, 2003**)

III.1.3. Les acides gras

Les acides gras, produits par les bactéries lactiques à partir des lipides, mais également à partir des acides aminés, interviennent dans la qualité sensorielle des aliments (**Ganesan et al., 2004**). En concentration suffisante, ils sont aussi connus pour conférer des propriétés antimicrobiennes (**Magnusson, 2003**). Leur mécanisme d'action n'est pas connu, mais il est supposé qu'il altère la fluidité des membranes et la composition des lipides, ou bien encore qu'il interfère avec la germination des spores (**Ström, 2005**).

L'activité antimicrobienne augmente avec la longueur de la chaîne, ainsi, l'acide caprylique (C₈) et les acides gras plus longs, sauf l'acide un décylénique (C₁₁), sont les plus efficaces. Les acides caprique (C₁₀) et laurique (C₁₂) ont révélé des activités contre *C. albicans* (**Bergsson et al., 2001**). De même, les acides gras hydroxylés qui possèdent une chaîne à 12 carbones présentent les plus fortes activités (**Magnusson, 2003**). Par contre, ceci n'est plus vrai quand la chaîne carbonée est trop longue car elle diminue la solubilité de l'acide gras. Les levures semblent être les microorganismes les plus sensibles aux acides gras hydroxylés (**Magnusson, 2003**).

De plus, même si leur activité dans des écosystèmes naturels n'a pas encore été démontrée, plusieurs acides gras ayant une activité antifongique ont déjà été isolés de produits fermentés, et ceci est un point positif par rapport à la conservation des produits laitiers (**Schnürer and Magnusson, 2005**).

III.1.4. Le dioxyde de carbone

Le dioxyde de carbone est produit principalement par les bactéries lactiques hétérofermentaires. En plus de sa propre activité antimicrobienne, le dioxyde de carbone agit sur la conservation des produits, en créant un environnement anaérobie, non favorable pour de nombreux pathogènes. L'activité antimycosique engendrée par le CO₂ est due à l'inhibition de la décarboxylation enzymatique et à son accumulation dans la double couche de lipide membranaire aboutissant au dysfonctionnement de la perméabilité (Šušković *et al.*, 2010).

III.1.5. Les composants aromatiques

Certains LAB sont capables de produire des composés d'arômes qui participent aux qualités organoleptiques des fromages. La plupart des composés d'arôme sont issus de métabolisme du citrate : l'acétoïne et le diacétyl sont les plus importants.

III.1.5.1. Diacétyl

Il est synthétisé par différents genres de bactéries lactiques comme *Lactococcus* sp, *Leuconostoc* sp, *Lactobacillus* sp et *Pediococcus* sp. Le diacétyl (C₄H₆O₂) est un composé aromatique associé au goût du beurre (Ross *et al.*, 2002 ; Magnusson., 2003 ; Dortu., 2008). Son spectre d'activité antimicrobienne comprend les levures, les bactéries à Gram négatif et des bactéries à Gram positif non lactiques, ces dernières y sont néanmoins moins sensibles (Ammor *et al.*, 2006a).

III.1.5.2. Acétaldéhyde

L'acétaldéhyde est le composé aromatique qui donne son goût caractéristique au yaourt (Wouters *et al.*, 2002). Ce composé est synthétisé par *S. thermophilus*, mais il ne peut être métabolisé ni par l'espèce productrice, ni par *Lb. bulgaricus*. Son accumulation dans l'aliment peut atteindre des concentrations suffisantes pour inhiber certains microorganismes (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica sub sp. enterica* et *Escherichia coli*) (Yang., 2000). Cependant, son activité antifongique n'a à ce jour pas été démontrée.

III.1.6. La reutérine

Chez les LAB la seule voie de dégradation du glycérol se fait à travers la synthèse de la reutérine (ou 3-hydroxypropionaldehyde, ou 3-HPA) (Magnusson., 2003). Cette molécule peut être synthétisée par différentes espèces du genre *Lactobacillus* (*Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, *Lb. collinoides*, *Lb. coryniformis* et *Lb. reuteri*) pendant la phase stationnaire de croissance anaérobie, lorsque le glycérol est présent dans l'environnement et lorsqu'il y a une faible concentration de glucose (Schnürer et Magnusson, 2005; Dortu, 2008). Cette synthèse

implique l'enzyme glycéroldéshydratase (Ross *et al.*, 2002; Vollenweider et Lacroix, 2004; Martin *et al.*, 2005). La reutérine interfère avec la réplication de l'ADN par l'inhibition de la ribonucléotide réductase, impliquée dans la biosynthèse de l'ADN. Elle a des applications aussi bien dans le domaine médical que dans le domaine alimentaire (Dalié *et al.*, 2010; Vollenweider et Lacroix, 2004). La reutérine possède un large spectre d'action, elle est active contre des bactéries Gram positif, Gram négatif, des levures (*Candida*, *Torulopsis*, *Saccharomyces*) et des moisissures (*Aspergillus* et *Fusarium*), et peut aussi toucher les cellules productrices (à l'exception de *Lb. reuteri* qui y est résistant) (Vollenweider et Lacroix, 2004; Schnürerand Magnusson, 2005; Cleusix *et al.*, 2007; Dortu, 2008).

III.1.7. Les bactériocines

La définition d'une bactériocine a évolué considérablement pour finalement se simplifier. Cotter *et al.*(2006), ont proposé une définition de bactériocines qui reste la plus adaptée à toutes les bactériocines connues. Ils ont défini les bactériocines comme étant « des substances d'origine bactérienne, de nature protéique, synthétisées par des ribosomes et sécrétées dans le milieu extracellulaire pour inhiber la croissance des bactéries typiquement proches de la bactérie productrice et qui exprime, quant à elle, une immunité spécifique contre sa propre bactériocine » (Cotter *et al.*,2006).

III.1.7.1. Classification des bactériocines

Les bactériocines représentent une classe large hétérogène qui varie considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leur spectre d'action et de leur mode d'action (Dortu et Tonart, 2009) et le rang d'hôte sensible. Ces derniers sont répartis en quatre classes, comme proposé par Klaenhammer (1993) (Dortu et Tonart, 2009). Ces quatre classes sont présentées dans le tableau 4.

Tableau 4 : Classification des bactériocines.

Classes	Sous classes	Exemples
<p>Classe I: Lantibiotiques</p> <p>-Peptides de taille <5 kDa.</p> <p>-Thermostables.</p> <p>-Contiennent des acides aminés inhabituels soufrés (Ex: la lanthionine) formés post-traductionnellement.</p>	<p>-Sous classe A: lantibiotiques linéaires comprend des peptides cationiques hydrophobes allongés contenant jusqu'à 34 acides aminés</p>	<p>-La nisine produite par <i>Lc. Lactis</i> (Morisset et al., 2005).</p>
	<p>Sous classe B :lantibiotiques globulaires comprend les peptides globulaires chargés négativement ou sans charge nette et contenant jusqu'à 19 acides aminés.</p>	<p>-La mutacine II produite par <i>St. mutans</i> (Morisset et al., 2005).</p>
<p>Classe II :NonLantibiotique (Bactériocine nonmodifiées)</p> <p>-Peptides de taille <10 kDa.</p> <p>-Hydrophobes.</p> <p>-Thermostables.</p>	<p>Sous classe IIa: Pediocine like peptide, simple peptide contient la séquence à YGNGVN terminal et une partie C-terminal.</p> <p>-Anti-listeria</p>	<p>-La sakacine P produite par <i>Lb. curvatus</i> (Privat et al., 2011).</p>
	<p>-Sous classe IIb:composé de deux peptides.</p>	<p>-La lactobine A produite par <i>Lb.amylovorus</i> .</p>
	<p>-Sous-classe IIc:les bactériocines non classées.</p>	<p>-Enterocin AS-48 produite par <i>Enterococcus faecalis</i> (Bharti et al.,2015).</p>
<p>Classe III : Bactériolysines</p> <p>-Des protéines de taille supérieure à 30 kDa.</p> <p>-Sensible à la chaleur.</p>		<p>-La Caseicin80 produite par <i>Lactobacillus casei B80</i>. (Bharti et al.,2015).</p>
<p>Classe IV :</p> <p>-Cette classe est hypothétique.</p> <p>-Des bactériocines qui forment de grands complexes avec d'autres macromolécules.</p>		<p>Actuellement aucune bactériocine n'appartient à cette classe.</p>

III.1.7.2. Les propriétés des bactériocines

Certains critères des bactériocines produits par les bactéries lactiques justifient leur choix comme bioconservateurs (Gálvez *et al.*, 2007 ; Thakur et Roy, 2009) :

- ✓ Considérées comme « GRAS » (**Generally Recognized As Safe**).
- ✓ Inactives et non toxiques contre les cellules eucaryotes
- ✓ Généralement thermostables et tolérantes aux variations du pH
- ✓ Possèdent un spectre d'activité relativement large dirigé contre les espèces apparentées à la souche productrice.
- ✓ Un site d'attachement spécifique sur les cellules sensibles.
- ✓ Mode d'action généralement bactéricide (membrane cytoplasmique).
- ✓ Déterminants génétiques codés par les plasmides.
- ✓ La bactérie productrice synthétise une molécule qui la protège contre sa propre bactériocine.
- ✓ Sensibilité aux protéases et digestibilité dans le tractus intestinal.

III.1.7.3. L'application des bactériocines

Ces dernières décennies, les bactériocines compte tenu de leur innocuité ont été proposées pour plusieurs applications.

III.1.7.3.1. Applications en Agroalimentaire

La bioconservation d'un aliment consiste à augmenter sa durée de vie et à améliorer sa sécurité sanitaire en utilisant des microorganismes et /ou leurs métabolites (Ross *et al.*, 2002). Les bactéries lactiques produisent des substances (éthanol, peroxyde d'hydrogène, diacétyle, composés antifongiques, acides phényl-lactiques, antibiotiques et bactériocines) aux propriétés antimicrobiennes ; c'est pourquoi elles sont reconnues comme de bons agents de conservation des produits alimentaires (Lavermicocca *et al.*, 2000; Atrih et Foster, 2001; Robertson *et al.*, 2004). De plus, les bactériocines ne sont pas toxiques pour les cellules eucaryotes et perdent leur activité en présence des protéases dans le tractus gastro-intestinal ; d'où l'intérêt accru porté à leurs applications ces dernières décennies. Le tableau 5 présente quelques bactériocines utilisées dans le monde pour augmenter la durée de vie des produits laitiers.

Tableau 5 : Quelques bactériocines utilisées dans la conservation des produits laitiers. (Gálvez *et al.*,2011).

Application	Bactériocine	Classe	Effet
Dans les produits laitiers.	Nisine	I	Prévenir la prolifération d'endospores de <i>Clostridium botulinum</i> et la contamination par <i>Listeria monocytogenes</i> dans le fromage.
	Lacticine 3147	I	Inhibition de <i>Listeria monocytogenes</i> dans les yaourts naturels et le fromage écrémé.
	Pédiocine PA-1/AcH	IIa	Inhibition de <i>Listeria monocytogenes</i> dans les fromages blancs, crèmes et sauces à base de fromage.
	Entéroccine AS-4S	IIc	Inhibition de <i>Listeria monocytogenes</i> et inhibition lente de <i>Staphylococcus aureus</i> dans le lait écrémé.

III.1.7.3.2. Applications médicales des bactériocines

L'émergence de la résistance aux antibiotiques conventionnels ces dernières années a orienté la recherche vers l'étude de nouveaux agents antimicrobiens telles que les bactériocines. On peut distinguer les applications potentielles suivantes :

- ✓ **Traitements d'infections cutanées** : Utilisation de la mersacidine, la lacticine 3147, l'épidermine et la gallidermine (Sass *et al.*, 2008; Sutyaket *et al.*, 2008).
- ✓ **Traitements de la gingivite** : La nisine et la BLIS K12™ (BacteriocinLikeInhibitory Substances K12™) sont utilisées (Tagg, 2004).
- ✓ **Traitements de la mastite** : Administrée par voie intra-mammaire chez les vaches, la nisine A inhibe la prolifération des souches de *Staphylococcus* et *Streptococcus* à l'origine de cette infection (Bradley, 2002; Cotter *et al.*, 2005b).
- ✓ **Traitements de l'otite** : La nisine et la bactériocine ST4SA sont utilisées (Knoetze *et al.*, 2008).
- ✓ **Traitements d'infections systémiques** : La piscicoline 126, l'abp-118, la divercine V41 et la nisine sont les bactériocines recommandées (Dicks *et al.*, 2011).
- ✓ -Les Colicines E1 et N ont montré des résultats satisfaisant in vitro dans la lutte contre les souches d'*E. coli* responsable des diarrhées chez les enfants et dans le traitement des œdèmes. (Stahl *et al.*, 2004).

III.1.8. Peptides antifongique (similaire aux bactériocines)

L'activité des bactériocines est cependant limitée puisqu'elle concerne des espèces proches de la souche productrice, donc des Gram positifs (De Vuyst et Leroy., 2007; Dortu et Thonart., 2009). Ces métabolites secondaires ne sont donc pas actifs contre les champignons et ne présentent pas d'intérêt pour la préservation contre les altérations fongiques (Ross *et al.*, 2002; Gálvez *et al.*, 2007; Dortu and Thonart., 2009). Des exceptions ont cependant été relevées et mettent en évidence des activités contre des souches bactériennes phylogénétiquement éloignées (Cleveland *et al.*, 2001) et/ou contre des champignons (Topisirovic *et al.*, 2006). Ces composés protéiques présentent l'avantage de posséder un plus large spectre d'action que les bactériocines. Ils inhibent pour la plupart des bactéries Gram négatif et Gram positif ainsi que des champignons (Atanassova *et al.*, 2003). On retrouve par exemple le peptide TV35b, ou pentocine, de taille moyenne (environ 3,9 kDa), produit par *Lb. pentosus* et présentant une activité *fongistatique* (Ström *et al.*, 2002 ; Schnürer et Magnusson., 2005). Ce peptide a notamment révélé son efficacité contre *Candida albicans*. Un autre petit peptide, produit par *Lb. Coryniformis* subsp. *coryniformis* a également été détecté et présente des activités contre plusieurs moisissures et contre *D. hansenii* et *K. marxianus* à des pH compris entre 3 et 6 (Magnusson et Schnürer, 2001; Magnusson, 2003).

Matériel et méthodes

I.1. Cadre d'étude

Le présent travail porte sur la mise en évidence des bactéries lactiques isolées à partir du lait de chamelle et du j'ben et sur leur activité antimicrobienne et protéolytique. La partie expérimentale est réalisée au sein du Laboratoire de microbiologie générale, Université Laarbi Tebessi, Tébessa, sous la direction et l'orientation du Pr. MECHAI Abdelbasset, durant la période allant du mois de février au mois d'avril 2021. Le travail vise la recherche de bactéries susceptibles de développer une activité antifongique et antibactérienne ainsi que l'activité protéolytique.

I.2. Matériel et produits

I.2.1. Milieu de culture

-La gélose MRS (**Man, Rogosa, Sharpe**) fournie par **Conda/pronadisa- Espagne** a a été utilisée pour la culture et l'isolement des bactéries lactiques plus précisément l'espèce de lactobacilles.

-Le bouillon MRS (**MRS-broth**) fournie par **Conda/pronadisa- Espagne** a été utilisé pour le repiquage et l'enrichissement des souches lactiques cibles.

-La gélose M17 (M17 agar) fournie par **Biokar diagnostics-France**, a été utilisée pour la culture et l'isolement et pour le dénombrement des lactocoques (particulièrement *Lactococcus lactis*) et de *Streptococcus thermophilus* dans les produits laitiers.

-La gélose MH (**Muller Hinton**) fournie par **HIMEDIA** a été utilisée dans l'étude de l'évaluation de l'activité antibactérienne des souches lactiques.

-Le bouillon nutritif (**Nutrient Broth**) fourni par **Biokar diagnostics-France**, a été utilisé pour le repiquage et l'enrichissement des souches pathogènes utilisées.

-Le bouillon d'extrait de malt de levure (**YM broth pour Yeast Malt Broth**) fourni par **Conda/ pronadisa- Espagne**, a été utilisé pour l'évaluation de l'activité antifongique des souches lactiques.

-La gélose PCA (Plate Count Agar) fournie par **Conda/ pronadisa- Espagne**, a été utilisée pour favoriser la croissance des bactéries pathogènes utilisées.

-La gélose sabouraud (**Sabouraud Dextrose Agar**), fournie par **Biolife -Italie**, a été utilisée pour l'évaluation de l'activité antifongique des souches lactiques.

I.2.2. Produits chimiques et réactifs

Produits chimiques et réactifs		Utilisation
Colorants	Violet de Gentiane.	Coloration de Gram
	La fuchsine.	
Autres produits	L' eau oxygénée H ₂ O ₂ (10V).	Pour la réalisation du test catalase.
	NaOH (0,1N).	Pour ajuster les pH des cultures.
	Eau physiologique.	Pour la préparation des dilutions et les frottis.
	Eau distillée.	Pour la préparation des milieux de culture et ainsi pour le rinçage durant la coloration de Gram.
	Huile à immersions.	Pour augmenter la résolution du microscope.
	Ethanol.	Pour la décoloration lors de la coloration de Gram.
	Lugol.	Pour la fixation des colorants pendant la coloration de Gram.

I.2.3. Appareils utilisés

-Étuve réglable à 37°C (**Memmert**), utilisée pour l'incubation des souches lactiques et pathogènes utilisées.

-Étuve réglable à 30°C (**Salvis LAB Incucenter, Suisse**), utilisée pour l'incubation des souches fongiques.

-Haute U.V (**Angelantoni industrie Steril-GEMINI**).

-Agitateur vortex (**IKA VORTEX 3**).

-Centrifugeuse (**SIGMA-2-16P**), avec une vitesse maximale de 12000 tr/min.

-Microscope optique (**OPTIKA, Italie**).

-Le pH/MV mètre (**HI 22 11 HANNA instruments**) avec électrode, ph de 0 à 13.

-Plaque chauffante avec agitateur magnétique (**DAIHAN LabTech CO.,LTD**).

- Balance de précision avec une précision de 0,0001.
- Binoculaire (**Motic**).
- Four Pasteur réglable à 160°C (**Memmert**).
- Jarre d'anaérobiose utilisée pour la culture des bactéries lactiques.
- Cocotte autoclave.
- Réfrigérateur

I.3. Méthodes

I.3.1. Échantillonnage

Origine des échantillons du lait : Les échantillons du lait de chamelle proviennent des fermes d'élevage, se situant dans la région de Bir El Ater , wilaya de Tébessa. La collecte du lait cru a été réalisée selon les règles d'hygiène et d'asepsie recommandées en microbiologie, c'est-à-dire après lavage et rinçage des pis des chammelles à l'eau javellisée suivie d'une élimination des premiers jets de laits, sans oublier une bonne hygiène des mains de l'éleveur. C'est à partir de ce moment que le lait cru a été recueilli dans des flacons de 250 ml stériles étiquetés, immédiatement conservés à 4°C et acheminés au laboratoire dans une glacière pour être analysé à l'arrivée.

Concernant le j'ben, il est fabriqué traditionnellement par une femme expérimentée à partir du lait de chèvre qui provient des fermes d'élevage situées à la commune de Gueriguer, Tébessa. Le Lait est chauffé pendant 4 minutes jusqu'à devenir tiède (45°C), puis le fabricant introduit dans le lait un petit morceau de présure "Hakka" protégé dans un tissu poreux, il est plongé sans cesse pendant un bon bout de temps (5 à 10 min), puis il laisse le lait se reposer. Après 10 à 15 mn, le lait devient caillé. Il est mis ensuite dans un tissu poreux et propre pour l'égouttage. Ensuite il est découpé et mis dans un sachet stérile et transporté dans une glacière pour être analysé à l'arrivée.

◆ **Définition de Hakka**

Hakka est une substance organique extraite de la caillette des jeunes ruminants non sevrés, obtenue à partir de l'estomac de chevreaux et d'agneaux, après son salage elle est attachée à un fil propre et accrochée en exposition au soleil loin de l'humidité pour accélérer

le séchage. Cette présure animale contient une enzyme, la chymosine qui agit comme une endopeptidase capable de couper la liaison phénylalanine — méthionine. Elle permet ainsi de séparer le glycopeptide de la caséine K qui assure la stabilité du lait.

I.3.2. Réalisation des dilutions décimales

Peser 1 g de j'ben de manière aseptique et le déposer dans un tube contenant 9 ml d'eau physiologique. Le bien homogénéiser avec un agitateur vortex jusqu'à l'obtention d'une solution homogène, et on obtient la dilution dite la 10^{-1} (Figure 8). Pour réaliser la dilution 10^{-2} , prendre 1 ml de la suspension précédente (10^{-1}) et le mettre dans un tube contenant 9 ml d'eau physiologique. Continuer l'opération jusqu'à l'obtention de la dilution 10^{-6} .

Le même protocole est réalisé pour l'échantillon du lait de chamelle (à l'aide d'une micropipette, on prend 1 ml de lait).

I.3.3. Isolement des bactéries lactiques

Les échantillons de lait et du j'ben dilué (10^{-1} à 10^{-6}) dans l'eau physiologique ont été ensemencés par étalement sur gélose MRS (lactobacilles) et M17 (Lactocoques) et ensuite incubés à 37°C pendant 24h à 48h. Après incubation, un examen macroscopique est réalisé.

I.3.3.1. Examen macroscopique

Ce test consiste à apprécier la taille des colonies, leur couleur, leur forme (opaques ou translucides) sur boîtes de pétri contenant du MRS après incubation à 37°C pendant 24h à 48 heures.

On a récupéré seulement les colonies de couleur blanchâtre ou laiteuse, au hasard, sur lesquelles on a appliqué un test préliminaire comprenant la coloration de Gram et le test de catalase. Seules les souches à Gram positif et catalase négative ont été prises en considération.

I.3.3.2. 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, les isolats ont été soumis à la coloration de Gram (Annexe), celui-ci permet de différencier les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif, les bâtonnets, les coques et le mode de regroupement.

I.3.3.3. Recherche de la catalase

Chez les bactéries douées d'un métabolisme oxydatif, le système respiratoire compte parmi d'autres enzymes une catalase, celle-ci décompose l'eau oxygénée selon la réaction suivante :



Ce test a été réalisé selon le protocole expérimental décrit par **Prescott *et al.*, (2003)**. La catalase est mise en évidence en émulsionnant la culture bactérienne à tester dans une solution fraîche d'eau oxygénée à 10 volumes. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse traduit la décomposition de l'eau oxygénée, ce qui signifie la production de la catalase et que le test est positif.

I.3.4. La purification

La purification consiste à réaliser des repiquages successifs sur gélose et bouillon MRS (Figure 8), avec une incubation à 37°C pendant 24h, jusqu'à l'obtention des colonies de même taille, de même forme et de même couleur renseignant sur la pureté des souches (**Badis *et al.*, 2004**).

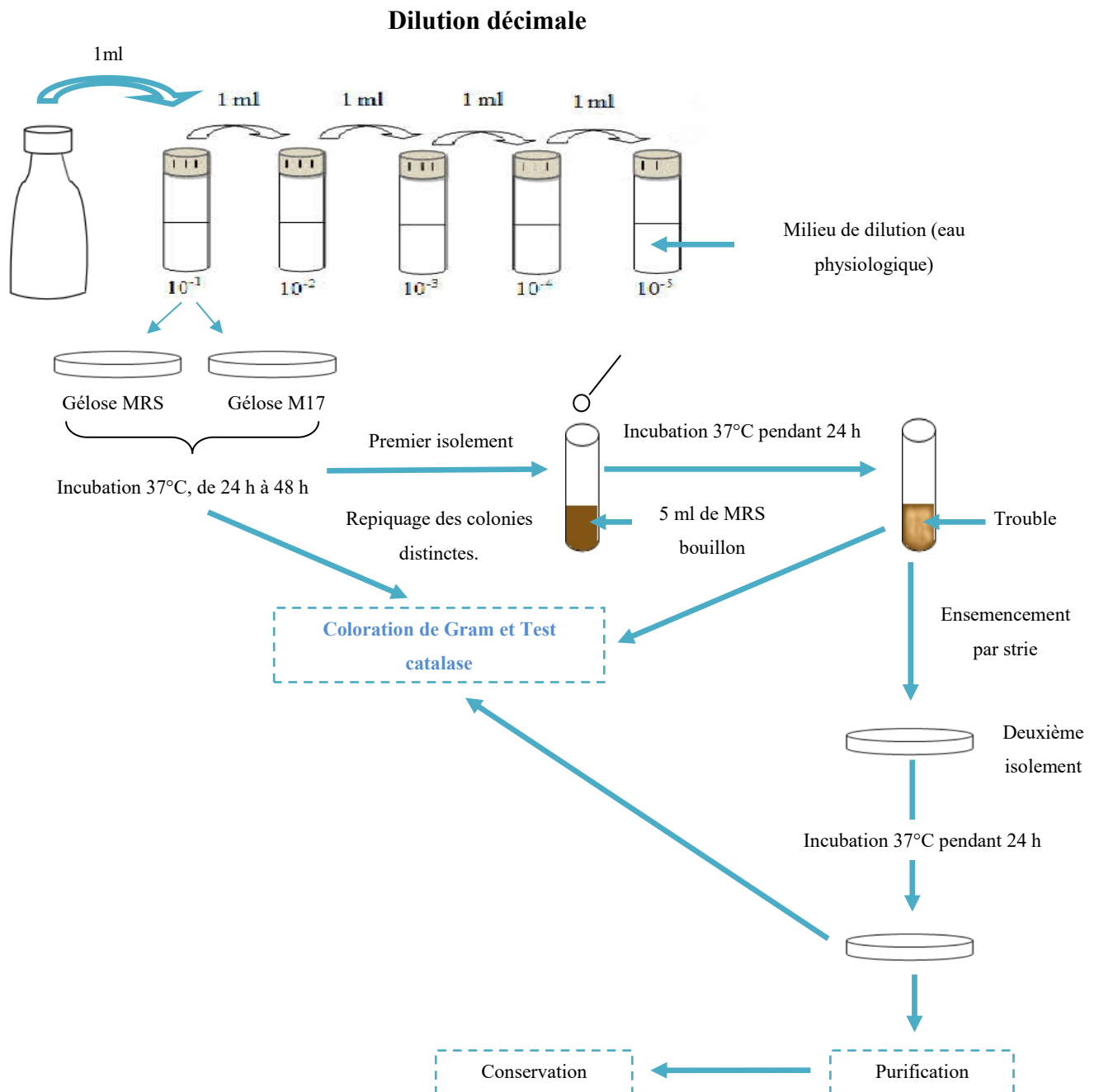


Figure 8: Protocole d'isolement, de purification des bactéries lactiques.

I.3.5. La conservation

I.3.5.1. Conservation à court terme

La conservation à court terme des souches pures est effectuée sur milieu MRS solide incliné (Figure 9). Seules les bactéries (coccobacilles) à Gram positif et catalase négative ont été retenues. Après croissance à la température optimale, les cultures sont maintenues à 4°C et le renouvellement des souches se fait par repiquage toutes les 4 semaines (**Badis *et al.*, 2005; Khedid *et al.*, 2009**).

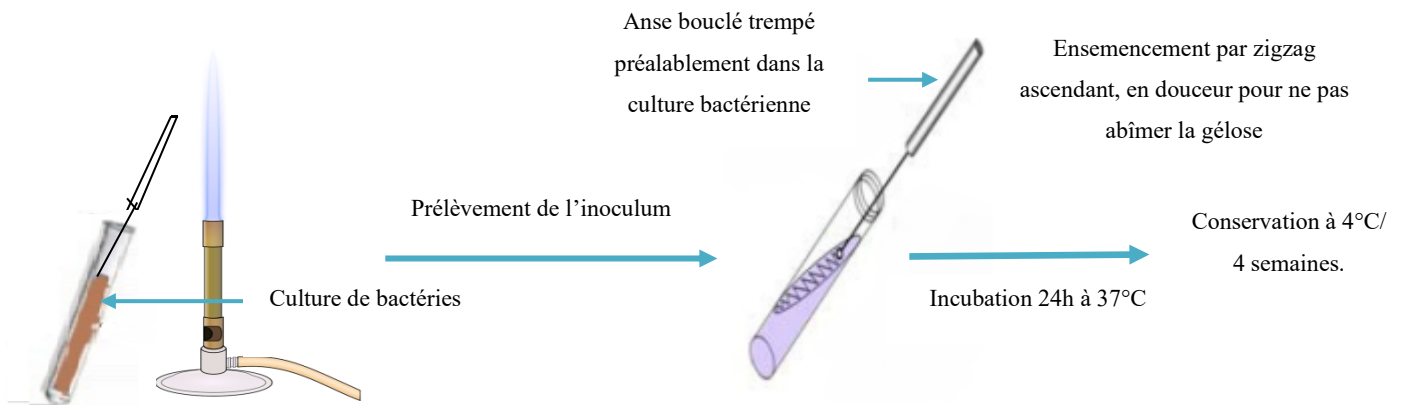


Figure 9 : Schéma de conservation à courte durée des bactéries lactiques purifiées (**Badis et al.,2003**).

3.5.2. Conservation à longue durée

Elle se fait par ensemencement des souches dans des eppendorfs, les cultures lactiques jeunes à raison de 70% additionnées de 30% de glycérol et placées au congélateur à -20°C (**Badis et al.,2003**).

I.4. Etude de l'activité protéolytique

Le test est réalisé sur gélose MRS semi-concentrée additionnée de lait stérile (Candia Silhouette) (Annexe), l'ensemencement se fait par touche à l'aide d'un cure-dent. La protéolyse est révélée par la présence d'un halo clair autour des colonies (Figure 10).

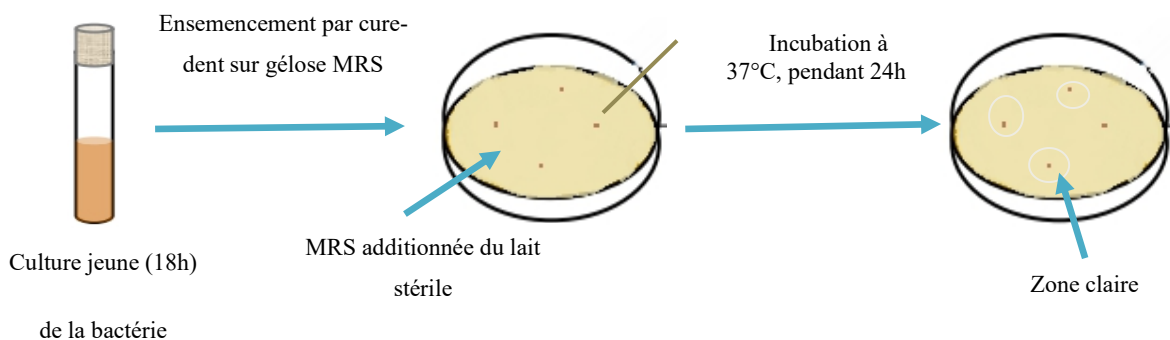


Figure 10: illustration des étapes de l'activité protéolytique.

I.5. Étude de l'activité antibactérienne des souches lactiques

I.5.1. Souches bactériennes et leurs origines

Les bactéries utilisées comme souches tests (souches testées pour leur activité antagoniste) et souches indicatrices (souches sur lesquelles est testée l'action inhibitrice des bactéries productrices de facteurs antimicrobiens) sont fournies par Dr MENASRIA Taha (Tableau 6).

Tableau 6: Souches lactiques tests et leurs origines.

Les souches lactiques	Origines
Ch1	Lait de chamelle.
Ch2	Lait de chamelle.
Ch3	Lait de chamelle.
Ch4	Lait de chamelle.
Ch5	Lait de chamelle.
J1	J'ben de chèvre.
J2	J'ben de chèvre.
J3	J'ben de chèvre.

Tableau 7: Les souches indicatrices du test d'antagonisme.

Souches Indicatrices	Code	Origine
Bactéries Gram (+)		
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 8	Institut pasteur (Collection Dr MENASRIA Taha)
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14578	Institut pasteur (Collection Dr MENASRIA Taha)
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25293	Institut pasteur
<i>Staphylococcus épidermidis</i>	MA	Collection Dr MENASRIA Taha
<i>Micrococcus.sp</i>	MA	
Bactéries Gram (-)		
<i>Esherichia coli</i>	ATCC 25422	Institut pasteur (Collection Dr MENASRIA Taha)

<i>Salmonella.sp</i>	MA	Collection Dr MENASRIA Taha
Souches fongiques	Code	Origine
<i>Penicillium.sp</i>	S7F ₁₄ C ₁	Collection Université Mouloud Maamri (Tizi Ouzou) (Laboratoire de microbiologie)
<i>Clodosporium.sp</i>		Collection Université Mouloud Maamri (Tizi Ouzou) (Laboratoire de microbiologie)

I.5.2. La méthode de Spot (méthode direct)

Appelée aussi méthode de **Fleming et al. (1975)**, permet d'évaluer le pouvoir inhibiteur des bactéries lactiques ensemencées en spot dans la gélose molle. Elle met en évidence les inhibitions dues à la production d'agents inhibiteurs mais aussi à l'effet de pH, H₂O₂, compétition vis-à-vis du substrat et l'inhibition par contact cellulaire. L'activité antimicrobienne des bactéries lactiques isolées est évaluée contre sept souches cibles.

I.5.2.1. Préparation de préculture

La préculture consiste à ensemencer une colonie pure d'une souche lactique sélectionnée dans un tube à essai stérile contenant de 5-10 ml de milieu de culture MRS bouillon à pH 6,5. Les tubes ensemencés sont incubés à une température de 37°C pendant 18h dans une jarre d'anaérobiose, sans agitation.

Les souches indicatrices ont été cultivées dans un bouillon nutritif (BN) pendant 18h à température optimale (30°C ou 37°C).

I.5.2.2. Test de spot

Une solution fraîche de bactéries lactiques de 18h est ensemencée par technique des spots en déposant 20 µl de cette suspension sur la gélose MRS, puis incubée en anaérobiose à une température de 37°C, à un intervalle de temps de 20 à 24h favorisant ainsi le temps nécessaire pour leur développement.

Après cette période d'incubation, 10 ml d'une gélose MH liquéfiée (en surfusion à 45°C) sont ensemencés avec 100 µl d'une suspension bactérienne des souches cibles, ensuite coulés délicatement sur la gélose MRS après une légère homogénéisation, afin d'éviter le décollement des spots (Figure 11). Les boîtes sont incubées en aérobie pendant 24h à une température de 37°C, L'inhibition se traduit par l'apparition des halos d'inhibition (≥2mm) autour des souches productrices (**Mami et al., 2008**). Témoinnant ainsi l'effet antibactérien de ces dernières.

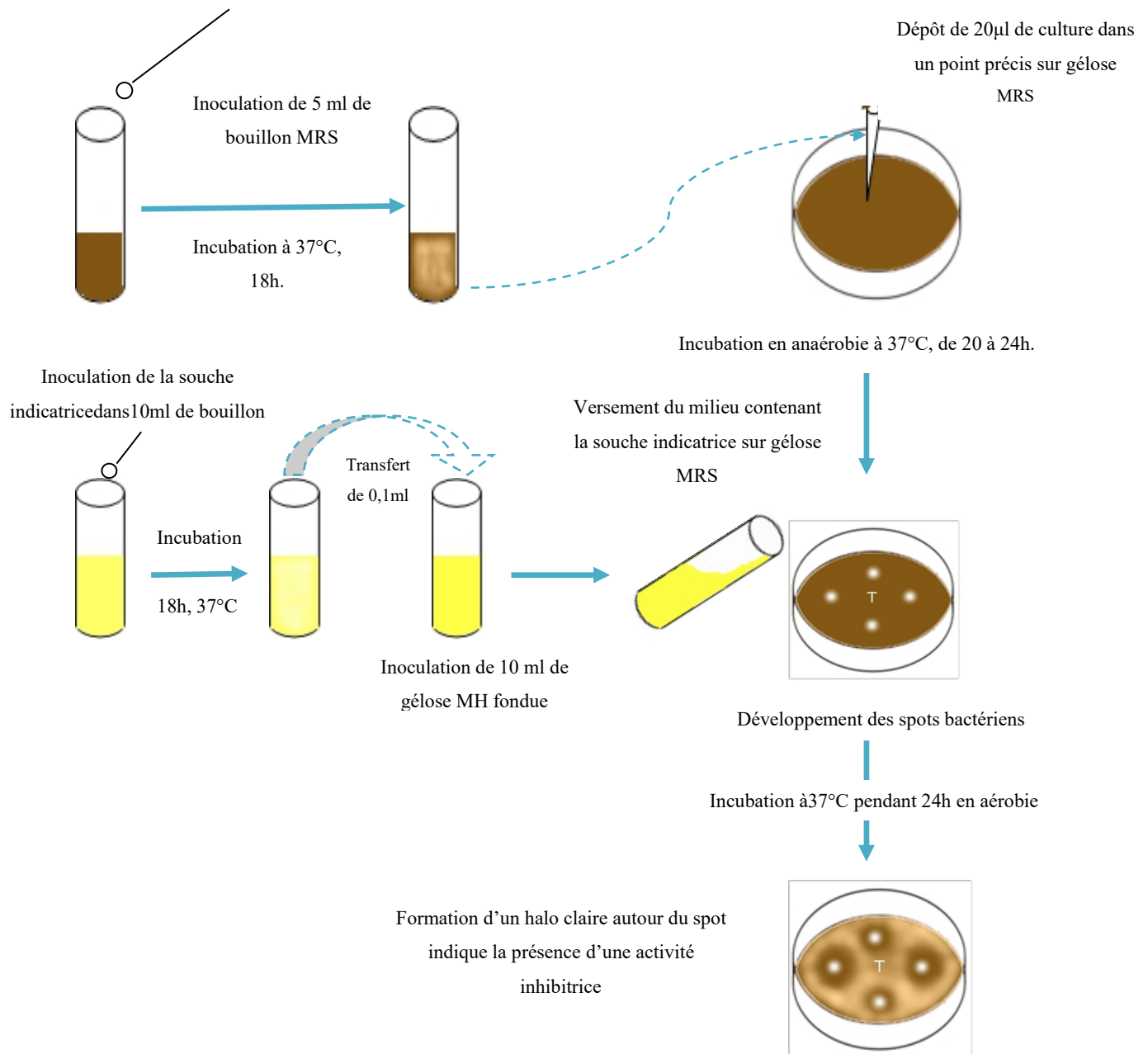


Figure 11: Illustration des étapes du test des spots.

I.5.3. La méthode de diffusion en puits

On a utilisé la méthode décrite par **Barefoot et Klaenhammer en 1983**. Cette technique consiste à mettre en contact le surnageant de la souche lactique productrice de la substance antibactérienne avec la souche indicatrice dans un milieu solide.

I.5.3.1. Préparation du surnageant

Les souches productrices de substances inhibitrices sont cultivées dans un milieu MRS liquide et incubées pendant 18 heures à 37°C. Après incubation, le milieu est centrifugé (8000

tr/min, 10 min). Après la récupération du surnageant dans des eppendorfs, ces derniers sont exposés aux radiations ultraviolettes pour éliminer toute cellule existante dans le surnageant et s'assurer de sa stérilité. Enfin le surnageant est conservé à 4°C.

Dans une boîte de Pétri contenant du Müller Hinton solide et ensemencé par la souche test (100 µl), préalablement coulée et solidifiée, des puits de 9 mm de diamètre sont perforés avec un emporte-pièce sur la gélose, remplis avec un volume de 50 µl du surnageant. Laisser les boîtes d'une heure à deux heures pour assurer une meilleure diffusion de la substance antibactérienne. Les boîtes sont alors incubées pendant 24 h à 37°C (Figure 12).

I.5.3.2. Mesure de diamètre des zones d'inhibition

L'effet antibactérien des surnageants des bactéries lactiques isolées est mis en évidence par l'apparition d'une zone d'inhibition (zone claire) autour des puits. La lecture de l'activité inhibitrice se fait par la mesure du diamètre d'inhibition autour des puits (Z_i), exprimée en mm (Allouache *et al.*, 2010). Une inhibition est considérée positive si le diamètre est supérieur à 2 mm Thomopson *et al* (1984) cité par Doumandji *et al* (2010). La mesure du diamètre d'inhibition (Z_i) est effectuée selon la formule suivante:

Z_i en (mm) = diamètre de la zone d'inhibition obtenue (mm) – diamètre de puits. (Allouache *et al.*, 2010).

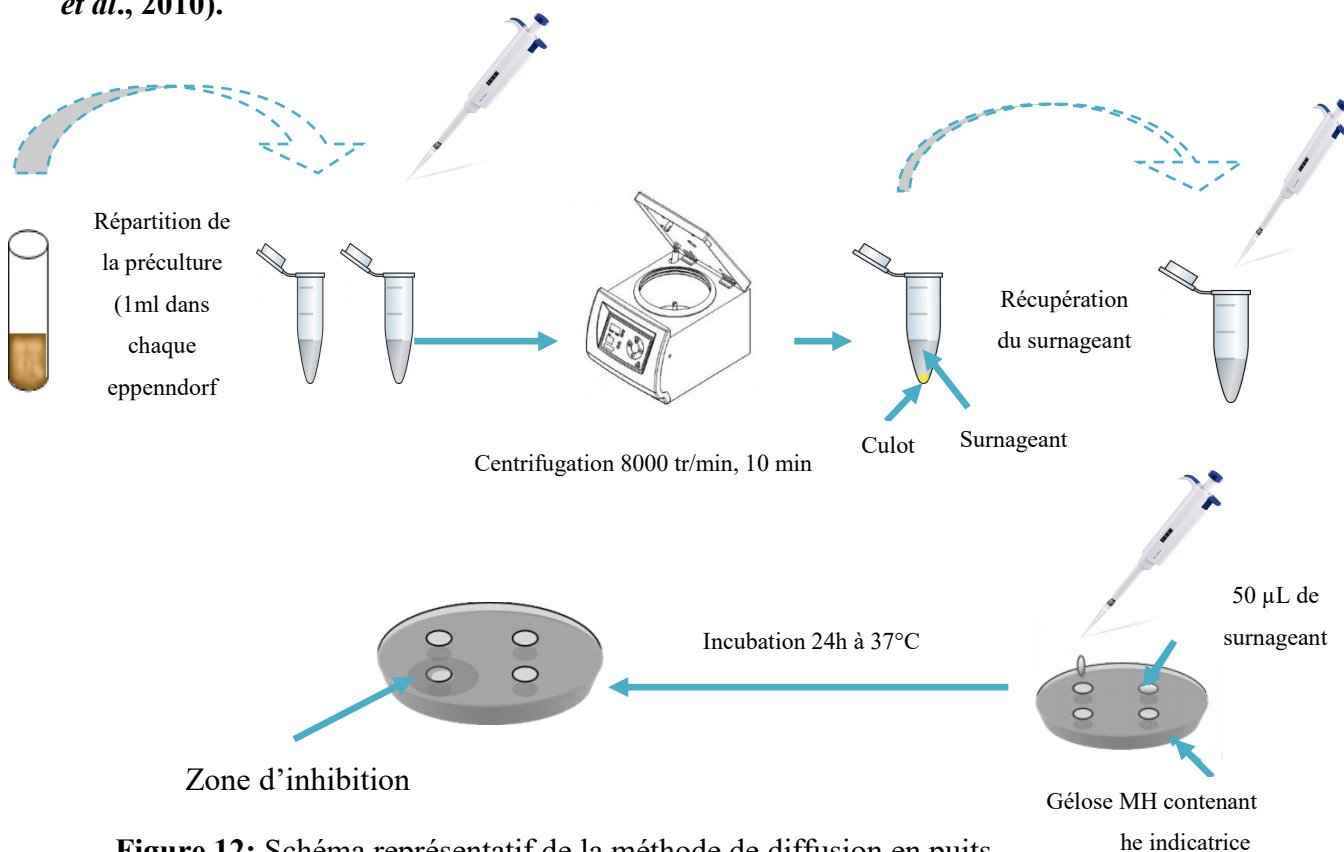


Figure 12: Schéma représentatif de la méthode de diffusion en puits.

I.5.4. Méthode de disque

Un volume de 10 ml du milieu MH agar est coulé dans des boîtes de Pétri stériles. Après solidification du milieu, les boîtes sontensemencées en surface par la suspension de la souche pathogène formant ainsi un tapis bactérien, l'ensemencement se fait à l'aide des écouvillons. Les disques (papier Wathman) de 6 mm de diamètre sont imbibés par 20 μ L de surnageant obtenu après une centrifugation à 8000 tr/ min pendant 10 min et ensuite exposé à la radiation UV pendant 1 h pour s'assurer de la stérilité du surnageant. Ensuite les disques sont déposés sur le milieu de culture, la diffusion des agents antimicrobiens dans le milieu gélosé est améliorée par une incubation des boîtes à 37°C pendant 24 heures.

I.5.5. Mise en évidence de l'agent inhibiteur

Afin d'estimer la nature de la substance inhibitrice produite par les souches lactiques, il est impératif de réaliser une série de tests. Ces tests sont effectués seulement sur les souches qui ont présenté une activité dans les tests précédents.

Dans le but de réduire l'effet peroxyde d'hydrogène et l'activité des protéases dans le processus d'inhibition de la croissance, le surnageant est traité thermiquement à une température de 80°C pendant 10 à 12 min (**Todorov et Dicks, 2009**). Et à cet égard, l'élimination de l'effet des acides organiques produits est réalisée par neutralisation du surnageant d'une manière à obtenir un pH égal à 6,5 (**Todorov et Dicks, 2009; Vizoso Pinto et al.,2006**).

Pour ce faire, l'ajustement et la neutralisation de la valeur du pH ont été procédés avec 1N NaOH, des extraits bruts contenant l'agent inhibiteur pour les différentes souches sélectionnées testées.

15 mL du milieu de culture MH en surfusion à 45°C sont inoculés avec un volume de 1% de la suspension bactérienne de la souche cible (Tableau 7). Ensuite, homogénéisés et coulés sur une boîte Pétri.

Trois puits de 6 mm de diamètre sont perforés sur la gélose, remplis avec un volume de 50 μ l du surnageant stérile (CFS), surnageant stérile et neutralisé (NCFS) et le surnageant neutralisé traité thermiquement dans l'ordre. Afin de permettre une répartition homogène des agents inhibiteurs produits, les boîtes sont pré-incubées dans un réfrigérateur pendant 2 heures à 4°C. Les boîtes sont ensuite incubées en aérobiose à une température de 37°C pendant 18-24

heures. Une lecture positive se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour des puits, exprimée en mm comme suit :

- ◆ Pas d'inhibition ou activité antimicrobienne. (-).
- ◆ Diamètre ≤ 10 mm Inhibition faible. (+).
- ◆ $11 \text{ mm} < \text{Diamètre} < 15 \text{ mm}$ Inhibition modérée. (++).
- ◆ Diamètre ≥ 15 mm Inhibition forte. (+++).

I.6. Étude de l'activité antifongique des souches lactiques

I.6.1. Préparation de suspension monosporale

Dans un premier temps, repiquer la souche à monosporer dans une boîte contenant du milieu PDA et la laisser se développer sur la totalité de la surface de la boîte pendant 5 à 6 jours.

Prélever un explant à partir de la périphérie de la boîte et l'introduire dans un tube contenant 1 ml d'eau physiologique stérile, après agitation, on obtient la suspension indiquée.

I.6.2. Méthode des stries (Double couche)

Pour la recherche de l'activité antifongique, la méthode de double couche ou de recouvrement décrite par **Magnusson et al. (2003)** a été utilisée. Les isolats ont été d'abord ensemencés en deux stries sur MRS, puis incubés à 30°C pendant 48h. Les colonies obtenues ont été ensuite recouvertes par 10 ml de milieu d'extrait de malt agar (0.7 % d'agar) contenant 0.1 ml de suspension monosporale (10^3 spores/ml). Après 72h d'incubation à 30°C, les zones d'inhibition ont été évaluées autour des stries de bactéries selon les critères suivants :

- ◆ (-): absence de zone d'inhibition.
- ◆ (+): Zone d'inhibition comprise entre 0.1 à 3 % de la surface de la boîte de Pétri.
- ◆ (++) : Zone d'inhibition comprise entre 3 à 8 % de la surface de la boîte de Pétri.
- ◆ (+++) : Zone d'inhibition supérieure à 8 % de la surface de la boîte de Pétri.

(Magnusson et al., 2003)

I.6.3. Méthode des puits

Des puits sont réalisés en utilisant l'emporte-pièce sur la boîte de Pétri contenant 10 ml de MRS recouverts par 10 ml de milieu d'extrait de malt agar contenant la suspension monosporale (10^3 spores/ml), ensuite 100 μ l de surnageant des bactéries lactiques sont

déposés dans les puits .Les souches lactiques ont été cultivées dans un bouillon MRS à 37°C, après 18h d'incubation, les cellules ont été centrifugées à 8000 tr/min pendant 10 min. Après 72h d'incubation à 30°C, les zones d'inhibition ont été évaluées autour de chaque puit.

Résultats et discussion

I. Résultats

I.1. Isolement et purification des souches lactiques

Après avoir eu un problème de contamination de notre boîte préalablement ensemencée par les dilutions du lait de chamelle et celles de j'ben, on a réussi à isoler huit souches lactiques à partir de deux échantillons de lait de chamelle et un échantillon de j'ben. Les colonies ont été purifiées, et les tests préliminaires ont montré que les isolats possédaient les caractéristiques des bactéries lactiques.

I.1.1. Étude macroscopique

Les colonies des souches sélectionnées cultivées sur milieu MRS solide apparaissent sous forme rondes de couleur blanchâtre à blanc crème et présentent un aspect lisse en surface et elles sont de petites tailles (Figure13). Sur bouillon, les souches présentent un trouble homogène qui caractérise le groupe des bactéries lactiques.

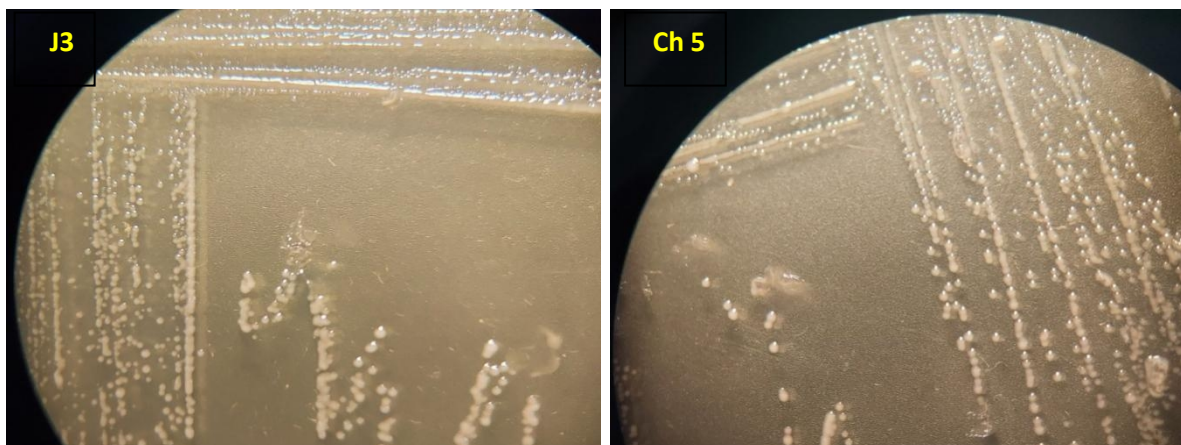


Figure 13: Aspect macroscopique des souches lactiques sous binoculaire ($\times 6$).

J3 : souche isolée du j'ben.

Ch 5 : souche isolée du lait de chamelle.

I.1.2. Étude microscopique

Les résultats des observations microscopiques aux grossissements ($G : \times 100$) avec l'huile à immersion, après coloration de Gram ont montré que les colonies des souches cultivées présentent des cellules à Gram positif, en forme de cocobacilles isolées, groupées en paires, et en chaînes (Figure 14).

L'observation microscopique à l'état frais a permis de déterminer la mobilité des souches lactiques étudiées. Les résultats de cette observation montrent que toutes les souches sont immobiles.

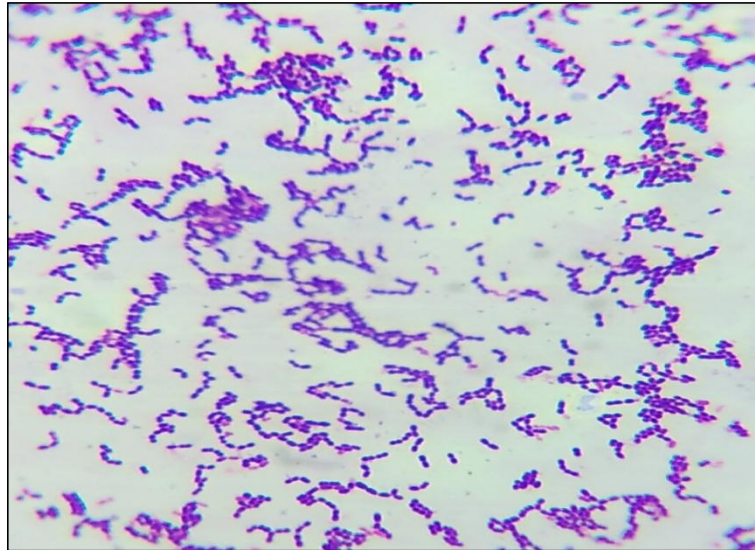


Figure 14 : La forme microscopique des isolats après coloration de Gram (G×100).

I.1.3. Test de catalase

Toutes les souches isolées ne représentent pas d'effervescence lors de l'ajout d'une goutte de H_2O_2 , ce qui s'explique par le fait que ces bactéries ne possèdent pas d'activité catalasique. (Figure 15).

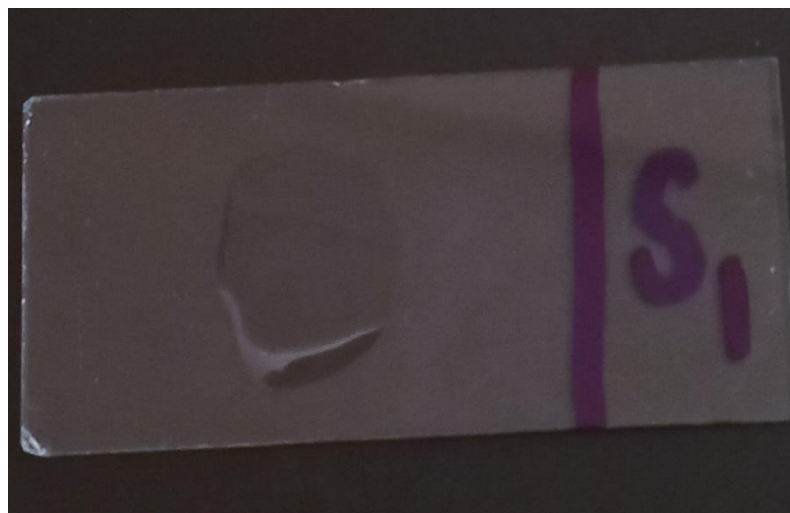


Figure 15 : Résultat négatif de test catalase pour les souches lactiques sélectionnées. Le tableau ci-dessous résume tous ces résultats.

Tableau 8: Caractères morphologiques et biochimiques des souches lactiques sélectionnées.

Souche test	Caractères macroscopique			Caractères microscopique			Mobilité	Test catalase
	Taille	Aspect	Couleur	Regroupement	Gram	Forme		
CH 1	Petite	Ronde, bombée, lisses.	Blanchâtre	En chaînettes En diplo	+	Coccobacille	-	-
CH 2	Petite	Ronde, bombée, lisses.	Blanchâtre	En chaînettes En diplo	+	Coccobacille	-	-
J 1	Petite	Ronde, bombée, lisses.	Blanchâtre	En chaînettes En diplo	+	Coccobacille	-	-
J 2	Petite	Ronde, bombée, lisses.	Blanchâtre	En chaînettes En diplo	+	Coccobacille	-	-
J 3	Petite	Ronde, bombée, lisses.	Blanchâtre	En chaînettes En diplo	+	Coccobacille	-	-
CH 3	Petite	Ronde, bombée, lisses.	Blanchâtre	En chaînettes En diplo	+	Coccobacille	-	-
CH 4	Petite	Ronde, bombée, lisses.	Blanchâtre	En chaînettes En diplo	+	Coccobacille	-	-
CH 5	Petite	Ronde, bombée, lisses.	Blanchâtre	En chaînettes En diplo	+	Coccobacille	-	-

♦ **Ch**: Souche lactique isolée de lait de chamelle.

♦ **J**: Souche lactique isolée de J'ben.

+ : positif.

- : négatif.

I.2. Activité protéolytique

La figure 16, représente les résultats d'hydrolyse des protéines par les souches bactériennes.

D'après les résultats, on conclut que les isolats retenus sont tous protéolytiques avec des intensités différentes d'une souche à une autre, sauf la souche Ch 4 où l'activité était presque inexistante.

Les souches isolées du lait de chamelle présentent une activité plus faible que celle des souches isolées du j'ben de chèvre où on remarque que la souche J3 présente l'action la plus puissante par rapport au autres.

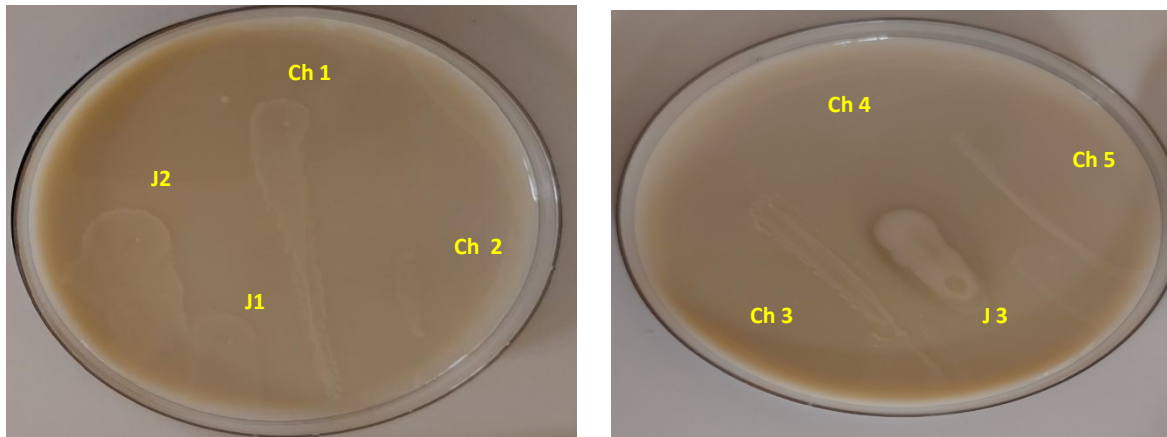


Figure 16: Mise en évidence de l'activité protéolytiques des isolats étudiées.

I.3. Activité antibactérienne des souches lactiques sélectionnées

Les souches isolées de j'ben et de lait cru de chamelle ont été testées pour leur capacité à inhiber les bactéries pathogènes, Gram négatif *Salmonella.sp*, *E.coli*, et Gram positif tels que *B.cereus*, *B.subtilis*, *S.aureus*, *S.épidermidis*, *Micrococcus.sp*.

I.3.1. La méthode de Spot (méthode directe)

Le criblage primaire a indiqué que les huit souches lactiques étudiées, manifestent une activité antagoniste vis-à-vis de la totalité des germes cibles testés en formant des zones d'inhibition autour des points de culture avec une différence de taux d'activité inhibitrice qui varie d'une souche à une autre (Figure 17, 18, 19,20, 21, 22, 23). Ces souches sélectionnées ont inhibé la croissance des bactéries à Gram positif ainsi celles à Gram négatif. Cependant, une activité antagoniste faible presque inexistante a été observée vis-à-vis du *Micrococcus sp*.

Les résultats des tests d'antagonisme des différentes souches sélectionnées vis-à-vis des germes cibles, exprimés en mm, sont présentés dans le **tableau 9** et illustrés dans les **figures 17, 18, 19,20, 21, 22, 23**. La mesure des diamètres des zones d'inhibition a été faite par un pied à coulisse.

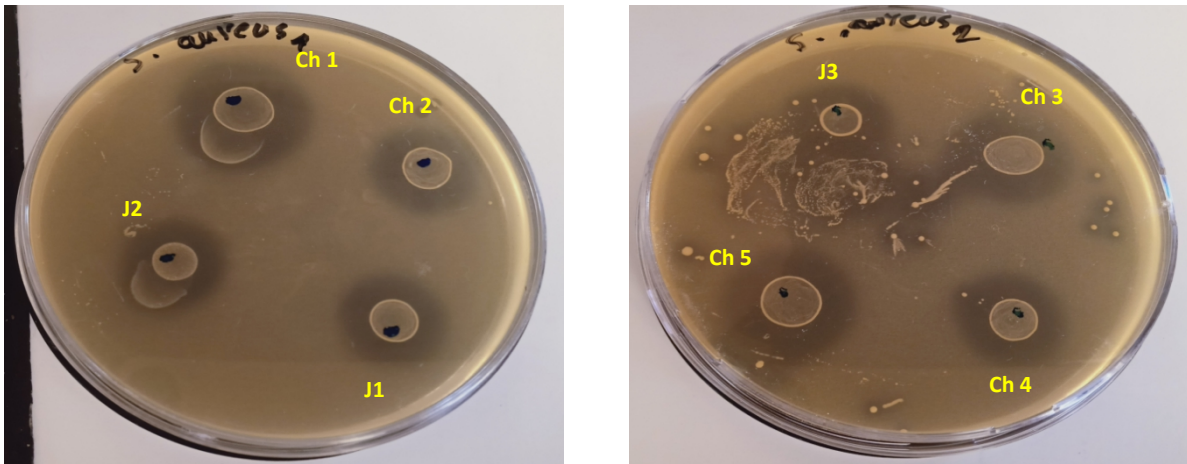


Figure 17: Mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches sélectionnées vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, par la méthode de spot.

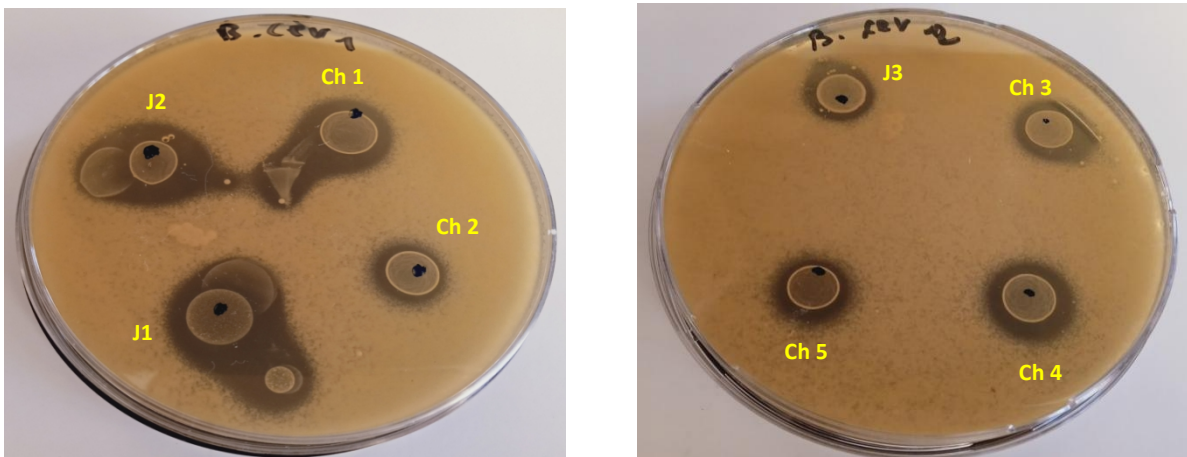


Figure 18 : Mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches sélectionnées vis-à-vis de *Bacillus cereus*, par la méthode de spot.

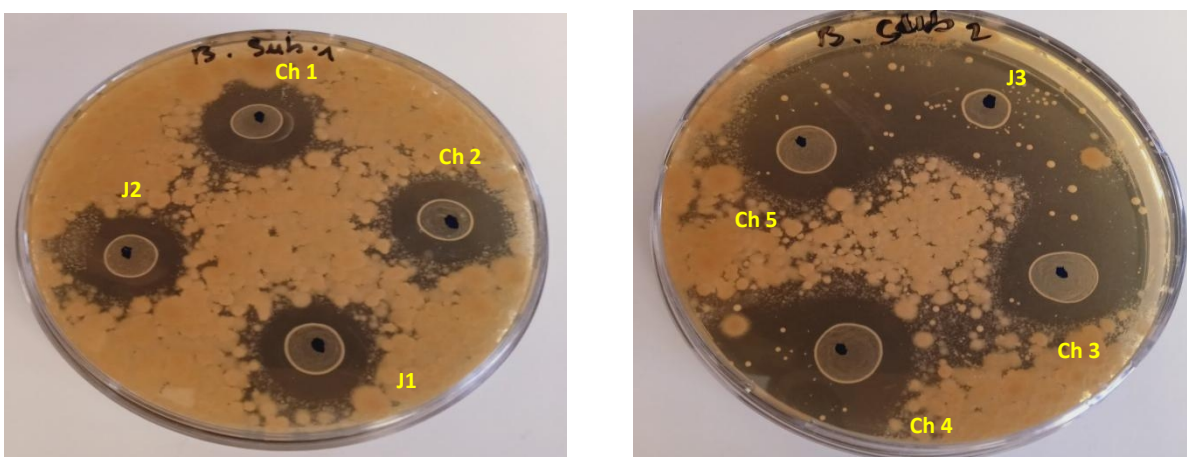


Figure 19: Mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches sélectionnées vis-à-vis de *Bacillus subtilis*, par la méthode de spot.

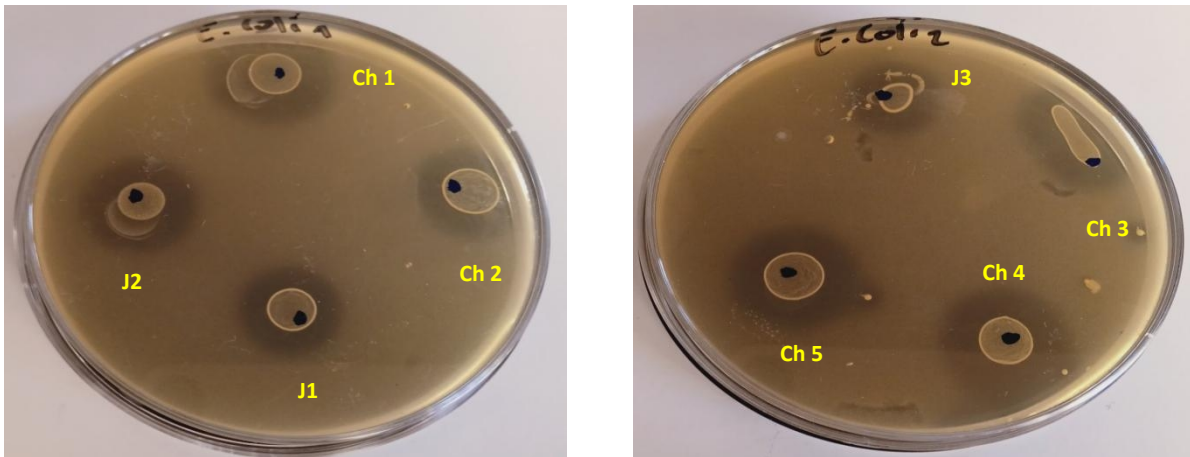


Figure 20: Mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches sélectionnées vis-à-vis de *E.coli*, par la méthode de spot.

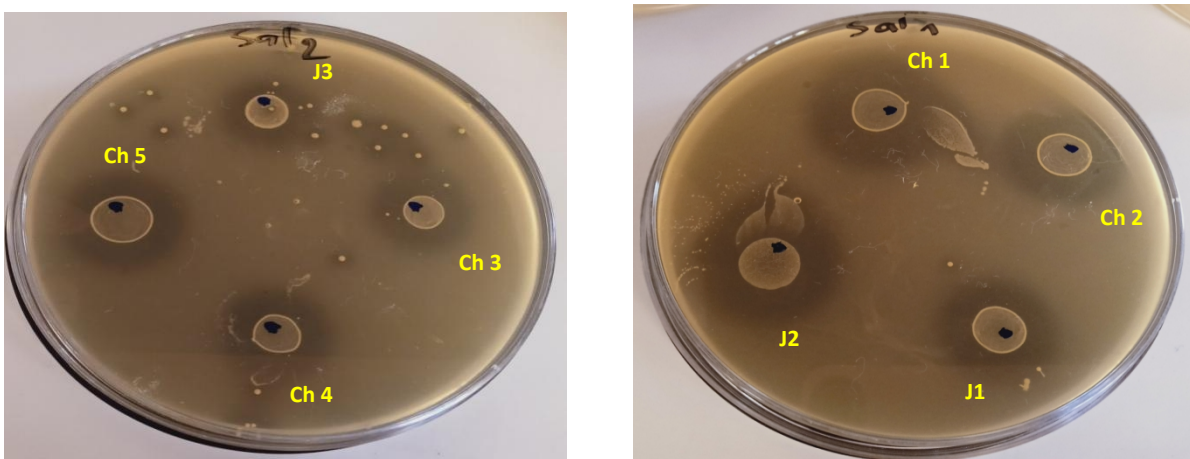


Figure 21: Mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches sélectionnées vis-à-vis de *Salmonella*. sp, par la méthode de spot.

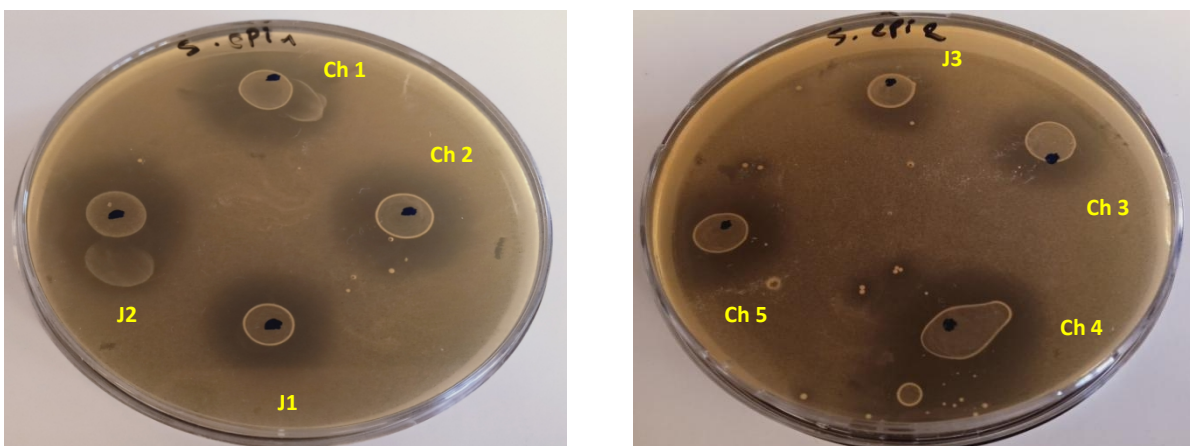


Figure 22: Mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches sélectionnées vis-à-vis de *Staphylococcus epidermidis*, par la méthode de spot.

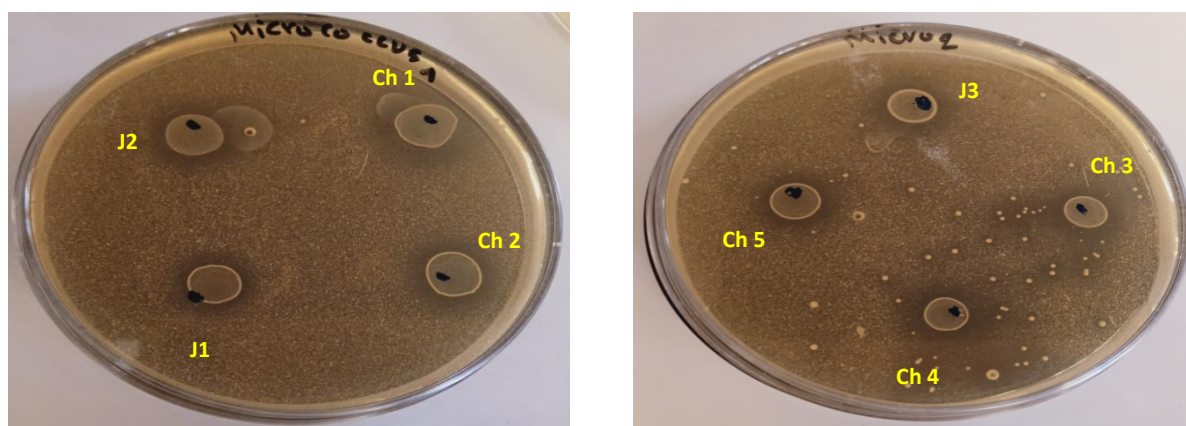


Figure 23: Mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches sélectionnées vis-à-vis de *Micrococcus* .sp, par la méthode de spot.

Tableau 9 : Spectre d'activité antimicrobienne des souches lactiques par la méthode de spot.

Souches cibles	Souches sélectionnées									
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Ch 1			Ch 2			J 1			
	A=28.02	S=9.84	R=2.85	A=26.03	S=9.18	R=2.83	A=22.90	S=8.72	R=2.62	
	A=28.86	S=8.15	R=3.54	A=25.22	S=9.89	R=2.55	A=23.22	S=8.62	R=2.69	
	J 2			J 3			Ch 3			
	A=28.11	S=9.08	R=3.09	A=22.19	S=8.19	R=2.71	A=23.58	S=10.21	R=2.31	
	A=27.24	S=9.12	R=2.99	A=31.26	S=8.81	R=3.55	A=22.19	S=8.29	R=2.68	
	CH 4				Ch 5					
	A=27.46		S=9.87		R=2.78		A=21.05		S=9.14	
A=22.47		S=9.79		R=2.29		A=22.74		S=9.10		R=2.49
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ch 1			Ch 2			J 1			
	A=27.62	S=10.26	R=2.69	A=22.43	S=9.08	R=2.47	A=20.21	S=8.69	R=2.32	
	A=21.06	S=9.50	R=2.22	A=22.09	S=8.54	R=2.59	A=20.29	S=8.71	R=2.33	
	J 2			J 3			Ch 3			
	A=21.72	S=8.12	R=2.67	A=23.48	S=8.19	R=2.87	A=22.59	S=9.32	R=2.42	
	A=21.76	S=7.35	R=2.96	A=22.25	S=7.09	R=3.13	A=24.10	S=10.09	R=2.39	
	Ch 4				Ch 5					
	A=21.73		S=8.85		R=2.45		A=26.21		S=9.91	
A=20.02		S=8.69		R=2.30		A=24.69		S=9.79		R=2.52
<i>E.coli</i>	Ch 1			Ch 2			J 1			
	A=26.77	S=9.17	R=2.92	A=22.28	S=9.84	R=2.26	A=18.29	S=7.46	R=2.45	
	A=27.70	S=9.96	R=2.78	A=23.74	S=9.96	R=2.38	A=18.18	S=8.72	R=2.08	
	J 2			J 3			Ch 3			
	A=22.01	S=8.84	R=2.49	A=19.89	S=6.69	R=2.79	A=29.79	S=15.75	R=1.89	
	A=21.28	S=7.52	R=2.83	A=20.34	S=6.86	R=2.96	A=22.66	S=4.30	R=5.17	
	Ch 4				Ch 5					
	A=24.87		S=9.29		R=2.67		A=22.52		S=10.14	
A=24.44		S=8.26		R=2.95		A=22.38		S=9.69		R=2.31
<i>Bacillus cereus</i>	Ch 1			Ch 2			J 1			
	A=20.05	S=9.31	R=2.15	A=14.39	S=8.03	R=1.79	A=22.01	S=9.64	R=2.28	
	A=21.31	S=9.35	R=2.28	A=16.99	S=8.37	R=2.03	A=20.36	S=9.86	R=2.06	
	J 2			J 3			Ch 3			
	A=21.10	S=9.81	R=2.15	A=15.25	S=8.56	R=1.78	A=16.38	S=8.14	R=2.01	
	A=24.90	S=8.72	R=2.85	A=14.39	S=8.17	R=1.76	A=17.68	S=8.09	R=2.18	
	Ch 4				Ch 5					
	A=17.88		S=8.44		R=2.11		A=14.63		S=7.24	

	A=16.45		S=8.70	R=1.89		A=15.85	S=8.12		R=1.59
<i>Micrococcus.sp</i>	Ch 1			Ch 2			J 1		
	A=21.87	S=10.76	R=2.03	A=16.05	S=9.63	R=1.66	A=13.27	S=7.19	R=1.84
	A=24.14	S=11.62	R=2.08	A=15.59	S=9.02	R=1.73	A=13.04	S=7.60	R=1.71
	J 2			J 3			Ch 3		
	A=17.42	S=9.25	R=1.88	A=17.14	S=8.29	R=2.06	A=12.78	S=7.40	R=1.73
	A=17.59	S=8.53	R=2.06	A=15.80	S=8.31	R=1.90	A=11.21	S=7.69	R=1.46
	Ch 4				Ch 5				
	A=16.00		S=6.37	R=2.51		A=15.89		S=7.58	R=2.09
A=20.32		S=7.71	R=2.63		A=13.53		S=8.72	R=1.55	
<i>Salmonella.sp</i>	Ch 1			Ch 2			J 1		
	A=25.41	S=10.54	R=2.41	A=25.66	S=9.96	R=2.58	A=21.29	S=8.24	R=2.58
	A=30.18	S=9.32	R=3.24	A=24.16	S=9.65	R=2.50	A=17.92	S=8.74	R=2.05
	J 2			J 3			Ch 3		
	A=30.59	S=10.71	R=2.86	A=20.07	S=7.49	R=2.53	A=20.07	S=7.73	R=2.60
	A=27.35	S=10.73	R=2.55	A=18.94	S=7.79	R=2.43	A=13.36	S=6.36	R=2.10
	Ch 5				Ch 4				
	A=17.08		S=7.89	R=2.16		A=21.81		S=9.80	R=2.22
A=20,36		S=7,51	R=2,71		A=24,70		S=9,19	R=2,69	
<i>Bacillus subtilis</i>	Ch 1			Ch 2			J 1		
	A=20.46	S=7.72	R=2.65	A=18.36	S=8.19	R=2.24	A=17.11	S=8.63	R=1.98
	A=20.02	S=9.25	R=2.16	A=18.32	S=8.38	R=2.19	A=17.74	S=8.31	R=2.13
	J 2			J 3			Ch 3		
	A=17.76	S=8.60	R=2.06	A=27.40	S=8.91	R=3.07	A=25.09	S=10.34	R=2.43
	A=20.46	S=8.57	R=2.39	A=35.44	S=8.92	R=3.97	A=31.59	S=11.09	R=2.85
	Ch 4				Ch 5				
	A=22.09		S=10.80	R=2,04		A=25,15		S=10,34	R=2,43
A= 24,41		S=10,34	R=2,36		A=24,79		S=9,22	R=2,69	

- ◆ **A:** Diamètre de l'activité antagoniste.
- ◆ **S:** la zone occupée par la souche lactique.
- ◆ **R:** La zone d'inhibition / $R = \frac{A}{S}$.

I.3.2. La méthode de diffusion en puits

Notre choix porte donc sur une technique largement décrite dans la littérature notamment celle de **Barefoot et Kaenhammer (1983)** qui nous a permis de faire une sélection des souches lactiques antibactériennes.

Les résultats de l'interaction obtenue, révèlent la présence d'un halo clair au tour des puits. Les résultats des tests d'antagonisme des différentes souches sélectionnées vis-à-vis des germes cibles, exprimés en mm sont présentés dans le **tableau 10** et illustrés dans les **figures 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30**.

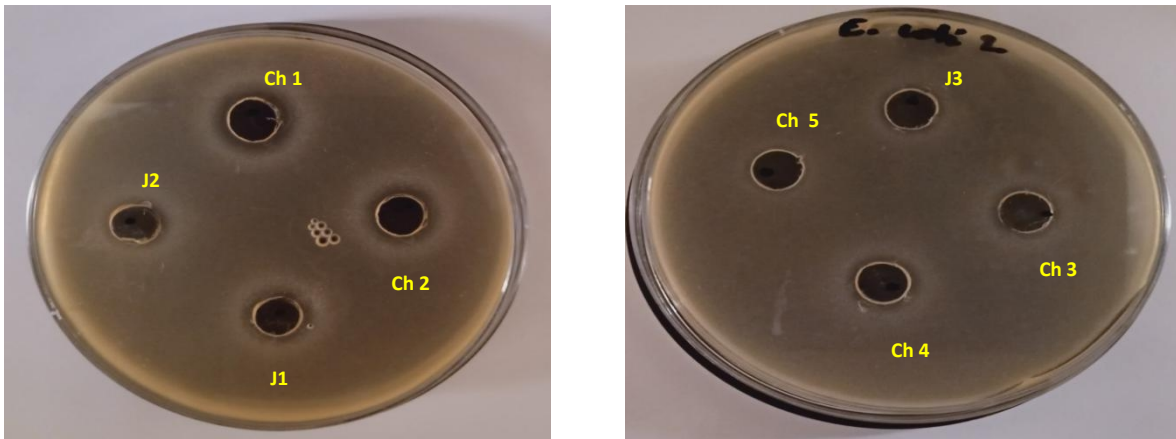


Figure 24: mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches sélectionnées vis-à-vis de la souche *E.coli* par la méthode de puits.

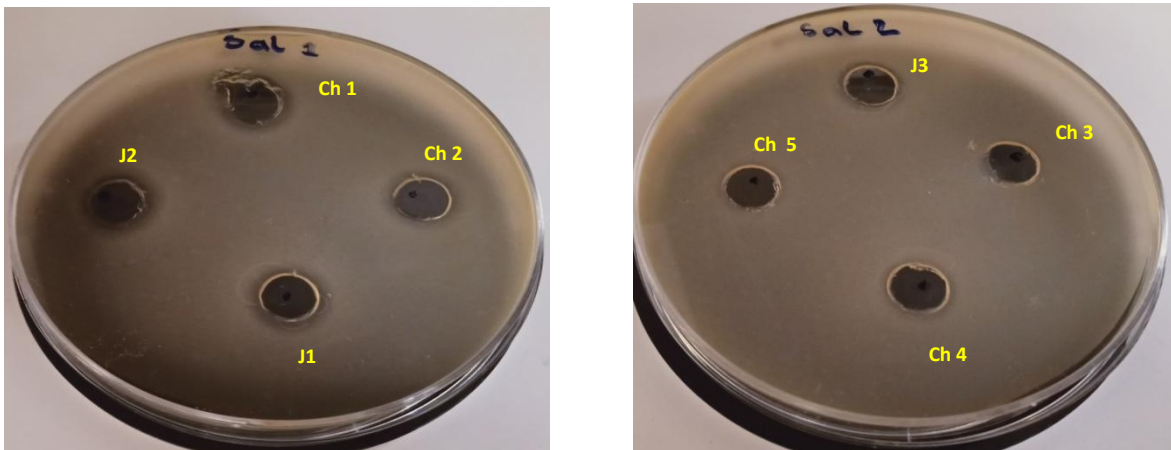


Figure 25: mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches sélectionnées vis-à-vis de la souche *Salmonella.sp* par la méthode de puits.

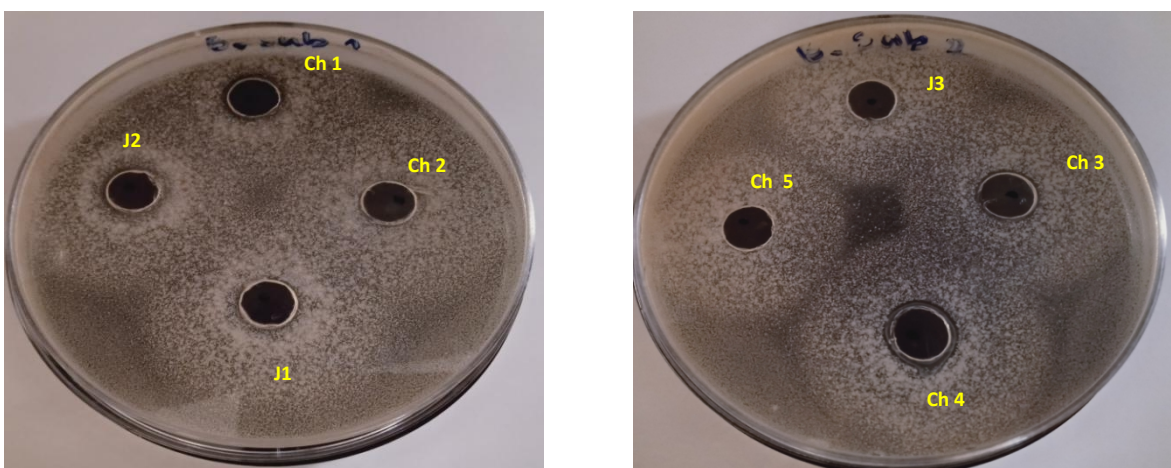


Figure 26: mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches sélectionnées vis-à-vis de la souche *Bacillus subtilis* par la méthode de puits.

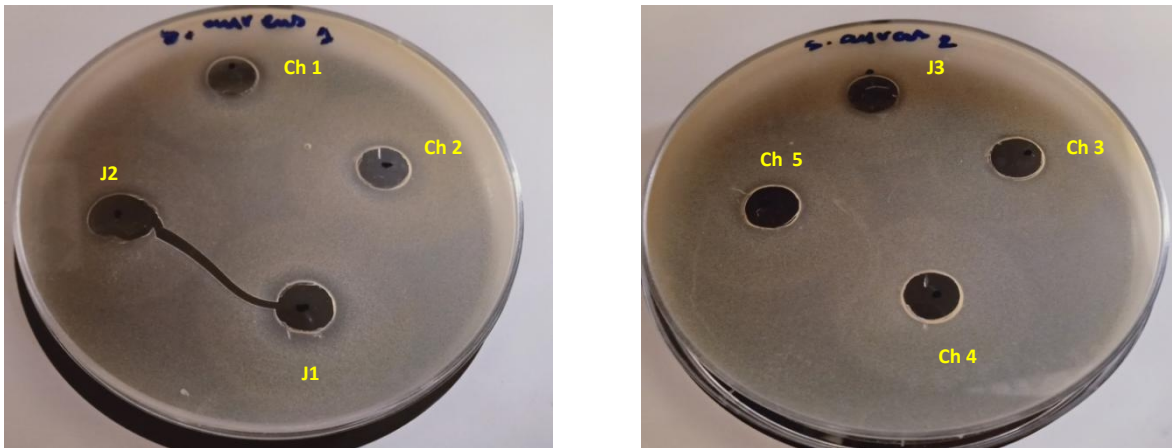


Figure 27: mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches sélectionnées vis-à-vis de la souche *Staphylococcus aureus* par la méthode de puits.

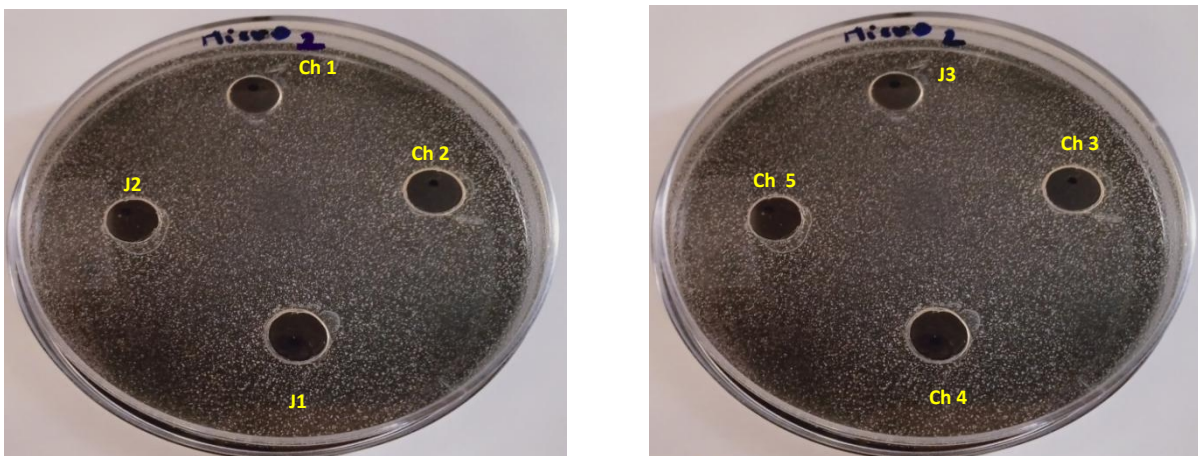


Figure 28: mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches sélectionnées vis-à-vis de la souche *Micrococcus .sp* par la méthode de puits.

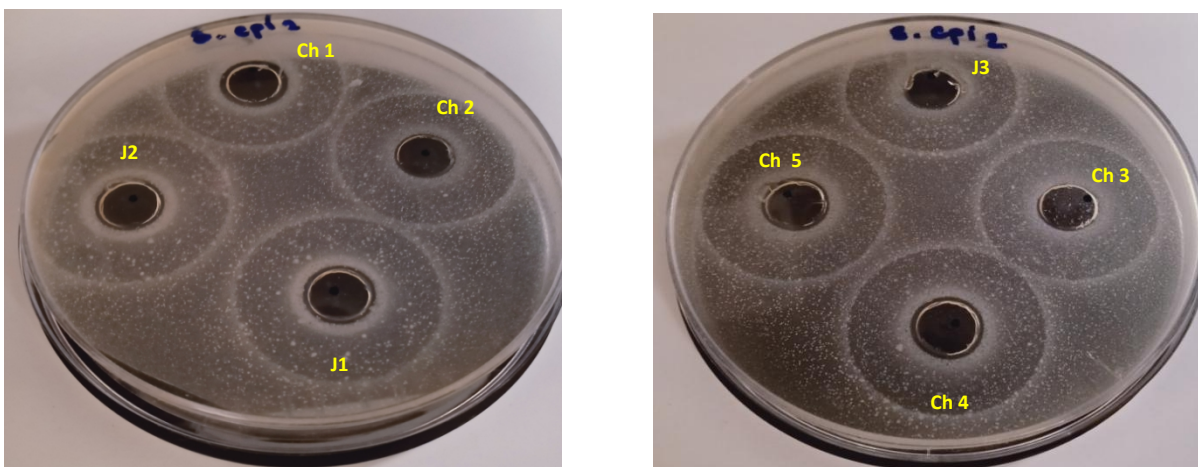


Figure 29: mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches sélectionnées vis-à-vis de la souche *Staphylococcus epidermidis* par la méthode de puits.

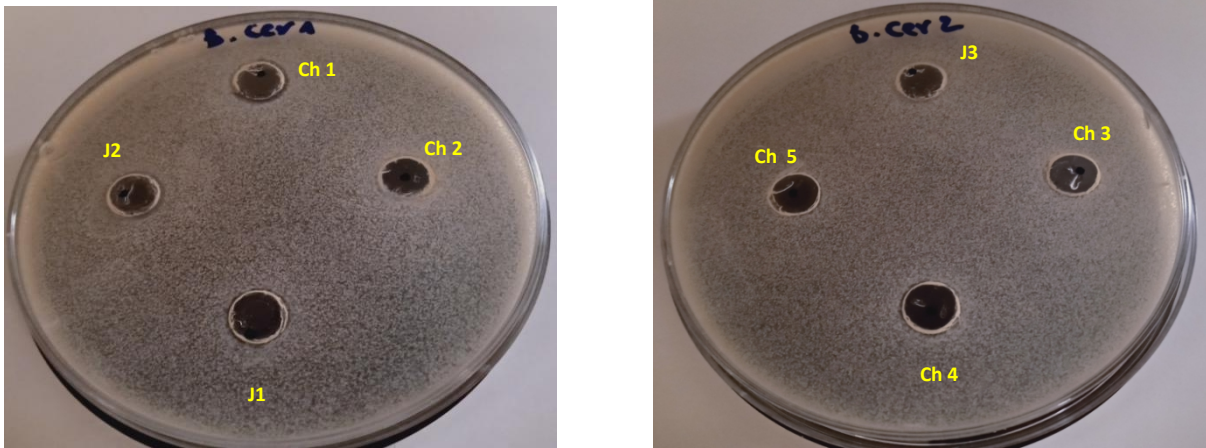


Figure 30: mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches sélectionnées vis-à-vis de la souche *Bacillus cereus* par la méthode de puits.

Tableau 10: Spectre d'activité antimicrobienne des souches sélectionnées par la méthode de diffusion en puits.

Souches cibles	Souches sélectionnées							
	Ch 1		Ch 2		J 1		J 2	
<i>E. coli</i>	Hz=17,21	Zi=8,21	Hz=12,57	Zi=3,57	Hz=14,34	Zi=5,34	Hz=13,21	Zi=4,21
	Vr=18,06	Zi=9,06	Vr=13,45	Zi=4,45	Vr=13,79	Zi=4,79	Vr=12,44	Zi=3,44
	J 3		Ch 3		Ch 4		Ch 5	
	Hz=13,60	Zi=4,60	Hz=14,01	Zi=5,01	Hz=13,89	Zi=4,89	Hz=13,60	Zi=4,60
	Vr=13,11	Zi=4,11	Vr=14,93	Zi=5,93	Vr=13,44	Zi=4,44	Vr=12,59	Zi=3,59
<i>Salmonella.sp</i>	Ch 1		Ch 2		J 1		J 2	
	Hz=14,37	Zi=5,37	Hz=13,09	Zi=4,09	Hz=14,34	Zi=5,34	Hz=12,74	Zi=3,74
	Vr=14,71	Zi=5,71	Vr=13,26	Zi=4,26	Vr=13,62	Zi=4,62	Vr=12,45	Zi=3,45
	J 3		Ch 3		Ch 4		Ch 5	
	Hz=12,07	Zi=3,07	Hz=12,41	Zi=3,41	Hz=12,52	Zi=3,52	Hz=11,99	Zi=2,99
Vr=11,22	Zi=2,22	Vr=12,80	Zi=3,80	Vr=12,51	Zi=3,51	Vr=12,52	Zi=3,52	
<i>Staphylococcus épidermidis</i>	Ch 1		Ch 2		J 1		J 2	
	Hz=13,71	Zi=4,71	Hz=11,43	Zi=2,43	Hz=12,92	Zi=3,92	Hz=11,29	Zi=2,29
	Vr=13,95	Zi=4,95	Vr=10,65	Zi=1,65	Vr=12,30	Zi=3,30	Vr=12,09	Zi=3,09
	J 3		Ch 3		Ch 4		Ch 5	
	Hz=/	Zi=/	Hz=10,80	Zi=1,80	Hz=11	Zi=2	Hz=/	Zi=/
Vr=/	Zi=/	Vr=11,20	Zi=2,20	Vr=11,09	Zi=2,09	Vr=/	Zi=/	
<i>Micrococcus.sp</i>	Ch 1		Ch 2		J 1		J 2	
	Hz=/	Zi=/	Hz=/	Zi=/	Hz=/	Zi=/	Hz=/	Zi=/
	Vr=/	Zi=/	Vr=/	Zi=/	Vr=/	Zi=/	Vr=/	Zi=/
	J 3		Ch 3		Ch 4		Ch 5	
	Hz=/	Zi=/	Hz=/	Zi=/	Hz=/	Zi=/	Hz=/	Zi=/
Vr=/	Zi=/	Vr=/	Zi=/	Vr=/	Zi=/	Vr=/	Zi=/	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ch 1		Ch 2		J 1		J 2	
	Hz=12,16	Zi=3,16	Hz=12,81	Zi=3,81	Hz=13,59	Zi=4,59	Hz=11,99	Zi=2,99
	Vr=12,69	Zi=3,69	Vr=12,79	Zi=3,79	Vr=13,78	Zi=4,78	Vr=13,36	Zi=4,36
	J 3		Ch 3		Ch 4		Ch 5	
	Hz=11,59	Zi=2,59	Hz=/	Zi=/	Hz=/	Zi=/	Hz=11,82	Zi=2,82
Vr=11,92	Zi=2,92	Vr=/	Zi=/	Vr=/	Zi=/	Vr=11,87	Zi=2,87	
<i>Bacillus cereus</i>	Ch 1		Ch 2		J 1		J 2	
	Hz=12,35	Zi=3,35	Hz=10,89	Zi=1,89	Hz=9,47	Zi=0,47	Hz=9,7	Zi=0,7
	Vr=11,40	Zi=2,40	Vr=10,71	Zi=1,71	Vr=9,83	Zi=0,83	Vr=9,40	Zi=0,40
	J 3		Ch 3		Ch 4		Ch 5	
	Hz=11,80	Zi=2,80	Hz=10,50	Zi=1,50	Hz=10,91	Zi=1,91	Hz=10,16	Zi=1,16
Vr=10,41	Zi=1,41	Vr=9,91	Zi=0,91	Vr=10,78	Zi=1,78	Vr=9,91	Zi=0,91	
<i>Bacillus subtilis</i>	Ch 1		Ch 2		J 1		J 2	
	Hz=13,85	Zi=4,85	Hz=12,1	Zi=3,1	Hz=13,81	Zi=4,81	Hz=12,98	Zi=3,98
	Vr=13,91	Zi=4,91	Vr=13,9	Zi=4,9	Vr=12,82	Zi=3,82	Vr=11,05	Zi=2,05
	J 3		Ch 3		Ch 4		Ch 5	
	Hz=11,61	Zi=2,61	Hz=9,39	Zi=0,39	Hz=10,56	Zi=1,56	Hz=12,13	Zi=3,13
Vr=11,99	Zi=2,99	Vr=9,58	Zi=0,58	Vr=10,49	Zi=1,49	Vr=12,19	Zi=3,19	

- ◆ **Vr:** Diamètre verticale de la zone d'inhibition.
- ◆ **Hz :** Diamètre horizontale de la zone d'inhibition.
- ◆ **Zi :** Rapport (en mm) = diamètre d'inhibition (en mm) - diamètre de puits (en mm) .
- ◆ Diamètre de puits = 6mm.
- ◆ / : Aucune zone d'inhibition.

Spectre d'activité

Le tableau représente les résultats des interactions sur milieu solide MH. Ce tableau montre clairement que toutes les huit souches lactiques utilisées ont une activité inhibitrice contre les souches indicatrices à Gram positif et à Gram négatif sauf sur les *Micrococcus.sp* où aucune inhibition n'a été détectée.

Les souches isolées à partir du lait de chamelle (Ch 1, Ch 2, Ch 3, Ch 4 et Ch 5) sont plus actives vis-à-vis des bactéries pathogènes à Gram négatif que celles à Gram positif. D'après les résultats, une meilleure activité est détectée sur les souches indicatrices *E.coli* et *Salmonella.sp*.

Les souches Ch 1 et Ch 2 présentent une activité inhibitrice, plus au moins prononcée, sur toutes les bactéries pathogènes testées avec des diamètres des zones d'inhibition allant respectivement de 11,9 mm jusqu'à 17,6 mm et 11 mm jusqu'à 14,5 mm. Cependant, la souche Ch1 s'est montrée très active sur *E.coli* avec une zone d'inhibition de 17,6 mm. Cette dernière présente aussi une activité remarquable vis-à-vis de la souche *B.subtilus* contrairement aux autres souches isolées du lait de chamelle.

Les souches Ch 3, Ch 4 et Ch 5 développent un spectre d'activité proche vis-à-vis des germes à Gram négatifs et à Gram positifs cibles testées. Les zones d'inhibition se présentent comme suit: de 11 mm à 14,5 mm pour la souche Ch 3, de 11 mm à 13,7 mm pour la souche Ch 4 et de 12 mm jusqu'à 13 mm pour la souche Ch 5. Ces dernières n'ont manifesté aucune activité vis-à-vis du *B.cereus*. Aussi les souches Ch 4 et Ch 5 n'exercent aucune inhibition vis-à-vis de la souche *S.aureus*. Concernant la souche *B.subtilus*, la souche lactique Ch 5 exerce une activité vis-à-vis d'elle contrairement à la souche Ch 4 qui présente une activité très faible dont le diamètre de la zone d'activité est de 10,5 mm et à la souche Ch 3 dont l'activité est nulle.

Les souches isolées du J'ben de chèvre (J1, J2, J3) présentent une activité inhibitrice remarquable dirigée contre les bactéries pathogènes à Gram positif et à Gram négatif avec des diamètres de zones d'inhibition allant de 12 mm jusqu'à 14 mm pour la souche J1, de 11,6 mm à 13 mm pour la souche J2 et enfin pour la souche J3 le diamètre des zones est de 11,1 mm jusqu'à 13,4 mm. Les souches précédentes exercent une activité meilleure vis-à-vis de la souche *E.coli* et *Salmonella.sp* et aucune activité sur la souche *Micrococcus.sp*. La souche J3 ne développe aucune activité vis-à-vis de la souche *S.aureus* par contre les deux autres souches isolées du j'ben la développent.

I.3.3. La méthode de disque

Pour ce test, on constate l'absence totale d'activités inhibitrices de tous les surnageants vis-à-vis de toutes les souches cibles.

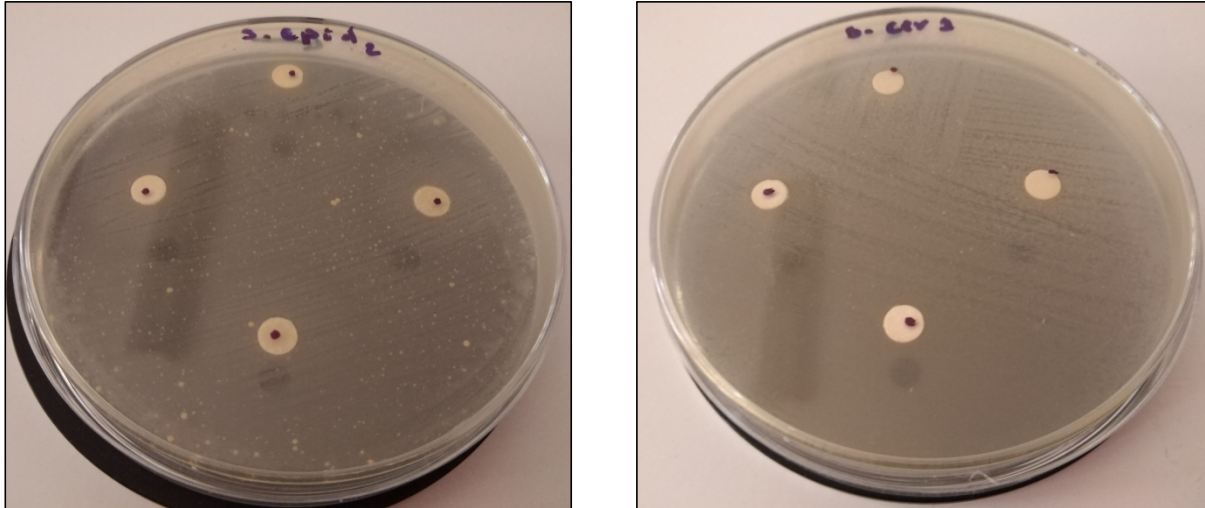


Figure 31: Exemples des résultats obtenues par la méthode de disques.

I.4. Mise en évidence de l'agent inhibiteur

Afin de déterminer le facteur inhibiteur des souches sélectionnées, une méthode de diffusion en puits a été réalisée en éliminant l'influence simultanée des autres facteurs inhibiteurs outre les bactériocines qui peuvent exercer une action inhibitrice spécifique ; tel que l'acidité par l'abaissement de la valeur du pH du à l'accumulation d'acide organique tels que acide lactique, acide acétique et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 .

Les résultats des tests d'antagonisme des différentes souches sélectionnées vis-à-vis des germes *E coli*, *Salmonella.sp*, *S.épidermidis* et *B.subtilis* exprimés en mm sont présentés dans le **tableau 11** et illustrés dans la **figure 32**.

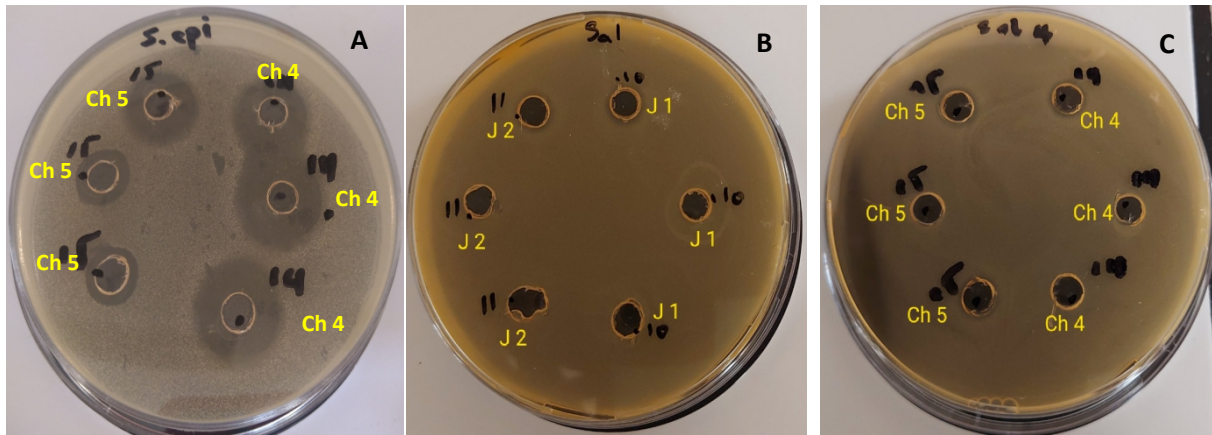


Figure 32: Mise en évidence de l'activité antimicrobienne de certaines souches sélectionnées vis-à-vis des bactéries pathogènes par la méthode de diffusion en puits.

- ◆A: Souche lactique productrice d'une substance protéique.
- ◆B: Souche lactique productrice d'acide.
- ◆C: Souche lactique productrice du peroxyde d'hydrogène.

Tableau 11: Spectre d'activité antimicrobienne des souches sélectionnées vis-à-vis de *E. coli*, *Salmonella.sp*, *S. épidermis* et *B subtilis*.

Souches tests	Puits	Souches cibles			
		<i>E.coli</i>	<i>Salmonella. sp</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>B.subtilis</i>
CH 1	CFS	+	+	-	-
	NCFS 1	-	-	-	-
	NCFS 2	+	-	-	-
CH 2	CFS	++	++	+++	-
	NCFS 1	-	-	++	-
	NCFS 2	++	-	++	-
J 1	CFS	+	+	++	-
	NCFS 1	-	-	++	-
	NCFS 2	-	-	+	-
J 2	CFS	+	+	-	-
	NCFS 1	-	-	-	-
	NCFS 2	-	-	-	-
J 3	CFS	++	++	-	-
	NCFS 1	-	+	-	-
	NCFS 2	-	-	-	-
CH 3	CFS	++	++	+++	-
	NCFS 1	-	-	++	-
	NCFS 2	-	-	++	-
CH 4	CFS	+	+	+++	-
	NCFS 1	-	-	+++	-
	NCFS 2	+	-	+++	-
CH 5	CFS	+	+	+++	-
	NCFS 1	-	-	++	-
	NCFS 2	+	+	++	-

- ◆ CFS (Cell free supernatant) : Surnageant stérile.
- ◆ NCFS 1 (Neutral cell free supernatant). Surnageants stérile et neutralisé traité thermiquement.
- ◆ Pas d'inhibition (-), diamètre ≤ 10 mm (+), $10 \text{ mm} < \text{Diamètre} < 15$ mm (++) , Diamètre ≥ 15 mm (+++).
- ◆ NCFS 2 (Neutral cell free supernatant) : Surnageants stérile et neutralisé.

Spectre d'activité

Le procédé de neutralisation des surnageants (NCFS) des souches lactiques sélectionnées a annulé totalement l'activité antimicrobienne vis-à-vis de la plupart des germes cibles, ce qui signifie que le pouvoir inhibiteur est dû à la production des acides organiques et reste stable pour d'autres ce qui signifie que la substance inhibitrice est autre que les acides organiques. Le **tableau 12** représente le pH du surnageant lactique avant la neutralisation et après ce procédé.

Tableau 12 : Le pH du surnageant des isolats avant et après la neutralisation.

Surnageant des souches lactiques isolées	pH initial	pH après neutralisation
CH 1	4.6	6.56
CH 2	4.13	6.50
J 1	4.15	6.5
J 2	4.87	6.5
J 3	4.15	6.60
CH 3	4.81	6.48
CH 4	4.79	6.48
CH 5	4.59	6.50

Le traitement thermique du surnageant stérile et neutralisé a pour but d'éliminer l'activité de H_2O_2 et d'écarter l'influence des protéases. Ce traitement a permis de distinguer une inhibition due à l' H_2O_2 .

Ce test a permis de détecter l'influence de certaines souches lactiques (Les souches isolées du lait de chamelle) sur la souche pathogène *S.épidermidis* dont l'agent inhibiteur est la bactériocine.

Le tableau ci-dessous présente une estimation de la nature de la substance inhibitrice à partir des résultats obtenus dans ce test.

Tableau 13 : Estimation de la substance inhibitrice des souches indicatrices.

Souches tests \ Souches lactiques	<i>E.coli</i>	<i>Salmonella. sp</i>	<i>S.épidermidis</i>	<i>B.subtilis</i>
CH 1	H ₂ O ₂	Acide	–	–
CH 2	H ₂ O ₂	Acide	bactériocine	–
J 1	acide	Acide	–	–
J 2	acide	Acide	–	–
J 3	acide	Acide	–	–
CH 3	acide	acide	bactériocine	–
CH 4	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂	bactériocine	–
CH 5	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂	bactériocine	–

I.5. Activité antifongique des souches lactiques

La production des substances antifongiques envers *Penicillium.sp* et *Cladosporium.sp* a été recherchée par deux types d'expérimentation. En premier lieu, les propriétés inhibitrices des isolats ont été évalués par une méthode de stries (double couche) de **Magnusson et al., (2003)**, ensuite par la méthode des puits.

I.5.1. Méthode des stries (Double couche)

L'apparition des zones claire autour des stries nous a permis de faire une première sélection des souches lactiques antifongiques décrite précédemment. Les résultats sont présentés dans le Tableau 13 et les figures 33, 34.

Tableau 14: Activité antifongique des souches lactique vis-à-vis de *Cladosporium sp* et *Penicillium sp* par la méthode de stries.

Souches lactiques	Souches fongiques	
	<i>Penicilium sp</i>	<i>Clodosporium sp</i>
CH 1	-	-
CH 2	+++	+
J 1	+++	+++
J 2	-	-
J 3	-	-
CH 3	+++	++
CH 4	+++	+++
CH 5	+++	+++

-: aucune croissance fongique; +: pas de croissance fongique sur 0.1 à 3% de la surface de la boîte par la souche lactique; ++: pas de croissance fongique sur 3 à 8% de la surface de la boîte par la souche lactique; +++: pas de croissance fongique sur 8% de la surface de la boîte par la souche lactique.

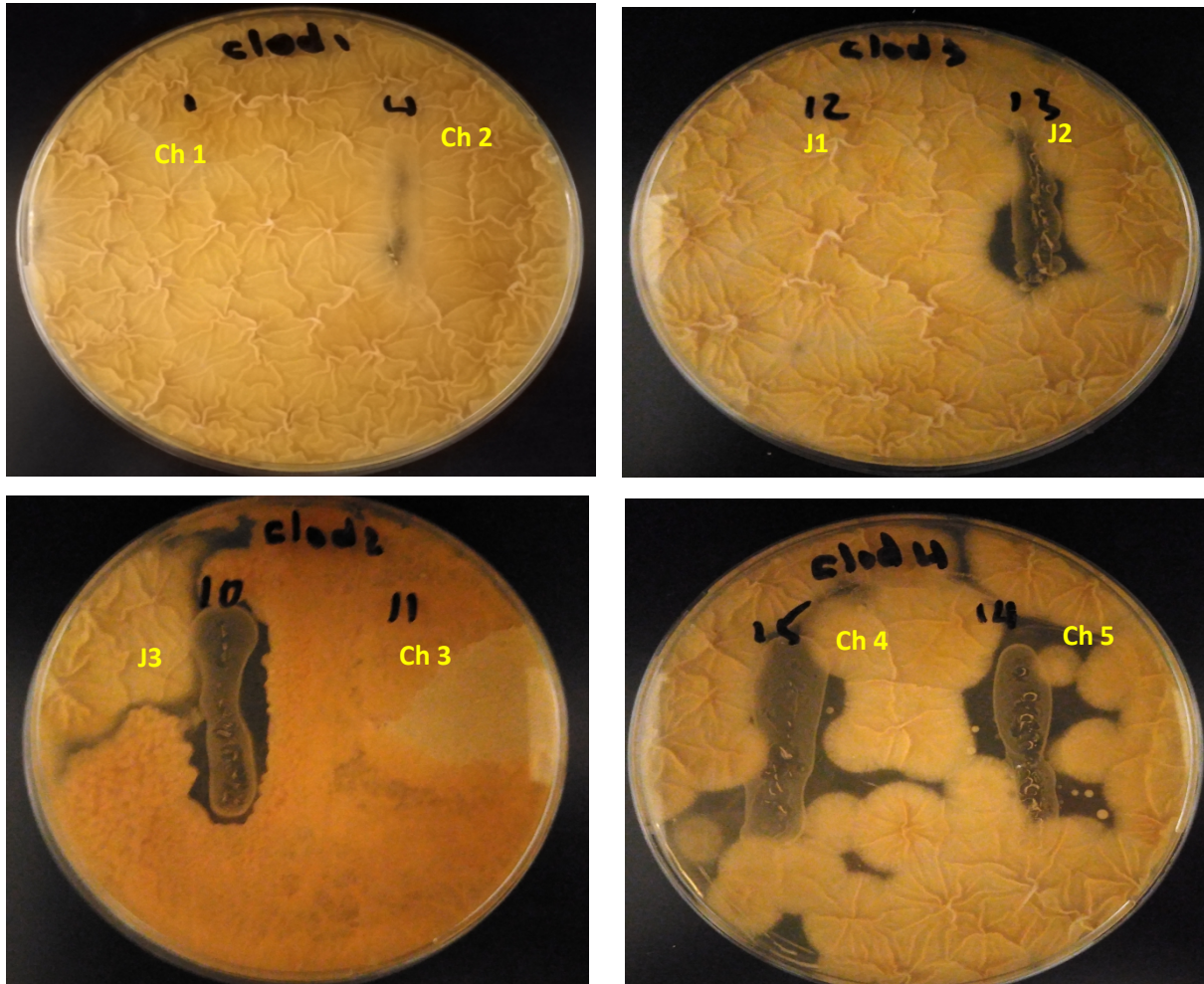


Figure 33: Mise en évidence de l'activité antifongique des souches sélectionnées vis-à-vis de *Cladosporium* sp.

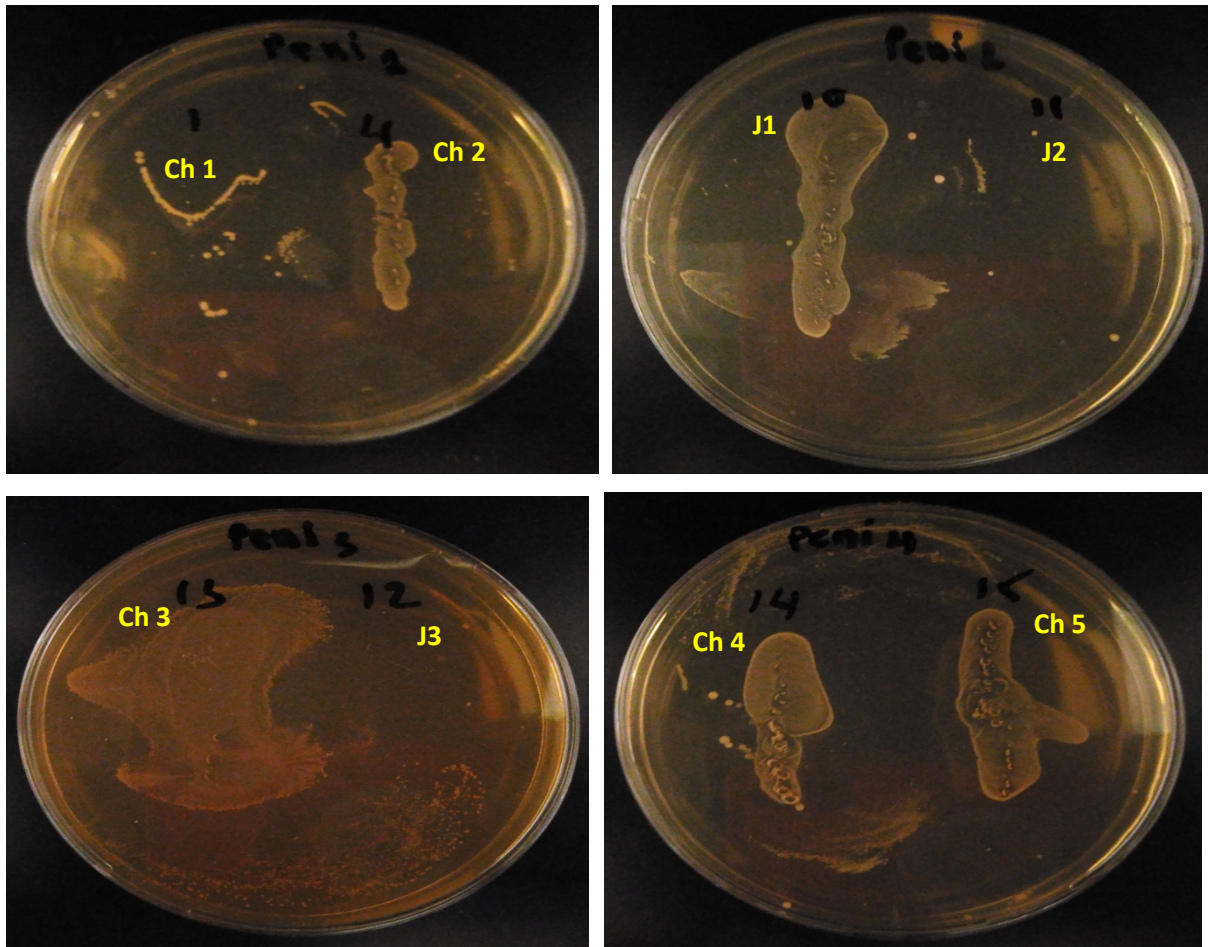


Figure 34: Mise en évidence de l'activité antifongique des souches sélectionnées vis-à-vis de *Penicillium* sp.

I.5.1. Méthode des puits

La mise en évidence de l'activité antifongique par cette méthode a permis de détecter une absence d'activité inhibitrice vis-à-vis de la souche *Cladosporium* sp, par contre il y a une apparition des halos autour des puits contenant le surnageant des souches lactiques sélectionnées, avec des diamètres différents, vis-à-vis de *Penicillium* sp. La figure 35 et 36 représente les résultats obtenus pour ce test.

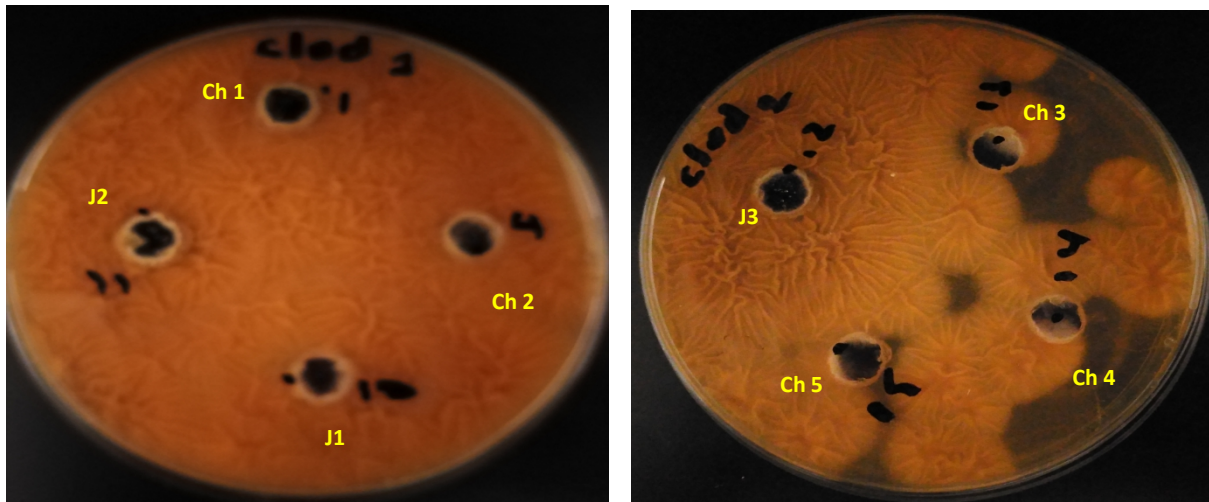


Figure 35: Mise en évidence de l'activité antifongique des isolats vis-à-vis de *Cladosporium* sp par la méthode des puits.

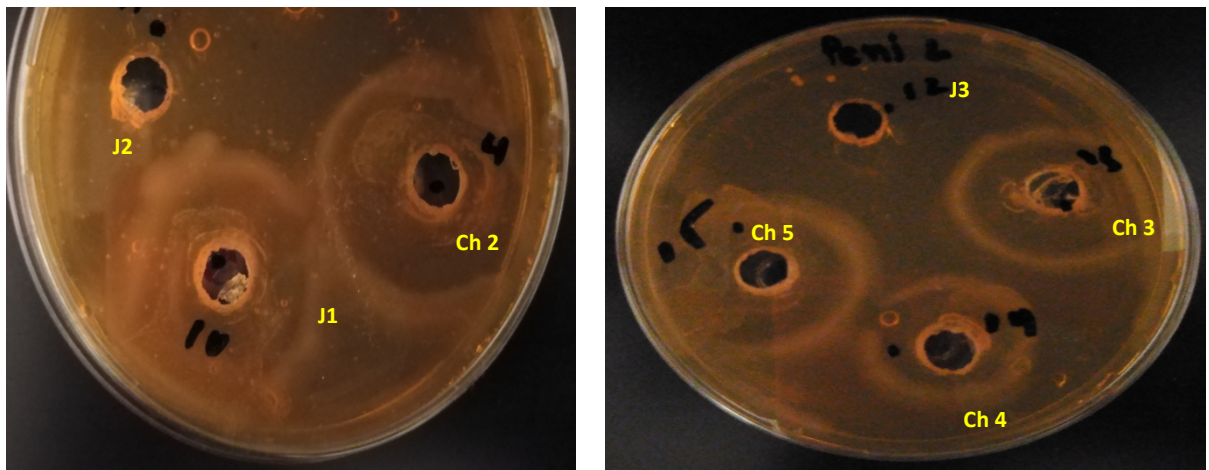


Figure 36: Mise en évidence de l'activité antifongique des isolats vis-à-vis de *Penicillium* sp par la méthode des puits.

II. Discussion

L'activité antagoniste de 8 souches de bactéries lactiques isolées a été mise en évidence par l'inhibition de la croissance bactérienne des souches cibles testées selon la technique de diffusion en puits, la méthode des spots et enfin la méthode des disques. L'activité protéolytique aussi a été recherchée sur gélose MRS au lait.

La protéolyse est l'événement biochimique le plus important pendant la transformation des produits laitiers, avec un impact majeur sur la saveur et la texture.

L'activité de protéolyse des souches lactiques isolées est un facteur qui permet le choix des souches pour l'industrie agroalimentaire. Les espèces protéolytiques sont classées en deux grandes groupes les germes protéolytiques qui se développent rapidement sur milieu lait et permettent le déclenchement rapide de la fermentation. Les espèces lactiques non protéolytiques sont nécessaires dans la maturation des fromages grâce à leurs enzymes protéolytiques intracellulaires. Selon **Vuillemard et al.,(1986)**, la souche est nommée protéolytique si elle a une zone de lyse de diamètre compris entre 15 et 21 mm. Comparativement à ces données, nos souches ont révélé que les diamètres de la zone protéolytique est proche de ces valeurs.

Les résultats obtenus ont montré que la majorité des isolats étudiées présentent une croissance avec une activité protéolytique traduite par l'apparition d'un halo clair autour des l'inoculum. Nos résultats corroborent avec ceux obtenus par **Idoui et Karam (2008)**, qui ont trouvé que les bactéries lactiques, isolées à partir du beurre de vache traditionnel de la région de Jijel, présentent un caractère protéolytique, et ceux obtenus par **Hadef (2012)**.

Toutefois, l'activité protéolytique des bactéries lactiques laitières est très importante pour la croissance bactérienne dans le lait et participe au développement des propriétés organoleptiques (Texture, arôme, odeur..) de différents produits laitiers. La production de produits laitiers de haute qualité dépend de systèmes protéolytiques de bactéries de départ, car les peptidases et les acides aminés formés ont un impact direct sur la saveur ou servent de précurseurs de saveur dans ces produits (**Axelsson et al., 2004, Fguiri et al., 2015**).

En outre, il est important de garder à l'esprit que les souches très protéolytiques ne sont pas toujours les plus appropriées pour servir comme ferments lactiques.

Une protéolyse excessive peut entraîner la production incontrôlée de peptides amers et autres composés indésirables (**Buffa et al., 2005**).

Une des caractéristiques la plus importante des bactéries lactiques et leur activité antagoniste, en inhibant la croissance des germes pathogènes, par la production de facteurs

inhibiteurs ; que se soient : des acides organiques (l'acide lactique , l'acide acétique..), des dérivés du métabolisme H_2O_2 et des substances naturelles de nature peptidique dénommées bactériocines qui présentent une activité bactéricide ou bactériostatique dont leur spectre d'activité peut être plus ou moins large , quelques fois limité aux espèces proche phylogénitiquement des bactéries productrices. (Allouche *et al.*, 2010). En effet, l'acide lactique produit par les bactéries lactiques pendant leur croissance , modifie le pH du milieu et peut agir sur la croissance des bactéries pathogènes, l'activité antibactérienne de l'acide lactique s'explique par la capacité à pénétrer sous sa forme non dissociée à travers la membrane cytoplasmique perturbant ainsi le maintien du potentiel de la membrane et inhibant les systèmes membranaires de transport actif (Servin., 2004 et Tejero –sarinena., 2012).

Guetarni, (2018) a rapporté que les bactéries lactiques isolées de différents milieux (lait de vache cru, selles des enfants, lait de brebis et de chèvre) ont démontré un effet inhibiteur des souches pathogène responsables des maladies diarrhéiques tels que *Escherichia coli* et *Salmonella typhi*. Ces recherches sont semblable à notre étude dont on remarqué après la mise en évidence de l'activité antagoniste par la méthode de diffusion en puits, que notre souche lactiques exercent une meilleur activité sur les bactéries à Gram négatif.

D'après Adams et Moss (2008), la production d'acide lactique et de l'acide acétique et la diminution consécutive du pH sont de loin les plus importants facteurs d'inhibition. Dans une étude menée par Jinet *et al.*, (1996), il est suggéré que l'inhibition de *Lactobacillus* à l'égard des souches pathogènes de *Salmonella* et *E. coli* est due à la production d'acides organiques par *Lactobacillus*. Gudkow (1987) et Taylor (2005) ont montré qu' *E. coli* est inhibée par l'acide lactique à pH de 5,1. Une étude d'Antonio *et al.*, (1999) a montré que la production d'acide lactique, d' H_2O_2 , de bactériocines et d'autres substances antimicrobiennes par les lactobacilles contribuent, avec le maintien d'un pH acide inférieur à 4,5, à produire un effet barrière réduisant fortement les risques d'infection.

La recherche de l'activité antimicrobienne dans des conditions qui éliminent l'effet de l'acide lactique et du peroxyde d'hydrogène et en utilisant la méthode de diffusion en puits nous a permet de révéler que les souches lactiques isolées produisent des facteurs antibactériens autres qu'un acide organique dirigé contre *E.coli*, *Salmonella sp*, *S. epidermidis* et *B. subtilis*. Concernant l'activité des substances antimicrobiennes produites par nos souches et dirigées contre les Gram négatifs, il est à rappeler que la plupart des bactériocines des bactéries lactiques inhibent la croissance des bactéries à Gram positifs apparentées à la souche productrice (Klaenhammer. 1993). L'inhibition des bactéries à Gram négatif n'a pas été clairement établie bien que quelques exemples aient été rapportés à ce sujet, comme les

bactériocines de lactobacilles (**Shahani et al., 1976**). La paroi cellulaire semble jouer un rôle protecteur contre l'agent inhibiteur car des bactéries à Gram négatif sont devenues sensibles à une bactériocine produite par *Lactobacillus plantarum* après leur transformation en sphéroplastés (**Gang et al., 2010**).

Concernant la variabilité de l'effet antimicrobien des souches isolées, **Schillinger et Lucke (1989)**, ont remarqué une différence dans l'effet antibactérien selon la méthode utilisée. Effectivement *Lactobacillus sake* a montré un résultat positif par le test des spots, mais qui a disparu lors de l'utilisation des surnageants par la méthode de disques. Ces résultats sont semblables à nos observations.

Selon **lewis et al., (1991)**, la disparition des zones d'inhibition par la méthode de spot peut être à l'origine de plusieurs facteurs, notamment l'agrégation des molécules de bactériocines entre elles, l'hydrolyse des bactériocines par des protéases non spécifique et une faible concentration en bactériocines dans le surnageant sous l'effet de la dilution.

Les résultats de l'activité antifongique ont démontré que les souches lactiques Ch2, J1, Ch3, Ch4, Ch5 sont capables de produire des substances inhibitrices dirigées contre les *Penicillium* sp et *Cladosporium* sp.

Selon **Delavenne, (2012)**, les activités antifongiques retrouvées chez les bactéries lactiques sont souvent des souches dépendantes. Néanmoins, certains genres et espèces semblent plus actifs que d'autres. Le genre *Lactobacillus* est le plus retrouvé dans les travaux sur la recherche d'activités antifongiques des bactéries lactiques

L'activité antifongique des bactéries lactiques n'est pas encore totalement élucidée, les molécules impliquées et mécanisme d'action non plus. Il s'agit de métabolites primaires et secondaires issus de la fermentation et des différentes voies de dégradation utilisées par les bactéries lactiques. Cependant selon **Crowley et al., (2013)**, les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites antifongiques tels que les acides organiques, le diacétyle, les antimycotiques bioactifs, peptides, acides gras, acides carboxyliques, bactériocines, peroxyde d'hydrogène, lactones, alcools, CO₂ et la reutérine qui ont la capacité d'inhiber la croissance fongique. Elles peuvent aussi dégrader les mycotoxines telles que ; les ochratoxines, les aflatoxines et les toxines de *Fusarium* (**Sadiq et al., 2019**).

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Les bactéries lactiques se comportent comme des excellents ambassadeurs d'un monde microbien souvent calomnie. Elles jouent un rôle important dans l'entretien et l'amélioration de la santé de l'homme.

Depuis des millénaires, l'homme s'est toujours servi de ces bactéries pour la fermentations des aliments, c'est pourquoi l'industrie agroalimentaire a focalisé toute son attention sur l'étude des vertus de ces bactéries, et sur la façon de les introduire plus ingénieusement dans l'alimentation afin d'en finir avec les conservateurs chimiques et artificiels qui sont fréquemment utilisés dans ce domaine. L'un des objectifs de l'utilisation de ces bactéries est de prolonger les dates limites de la bioconservation des aliments sans que ces derniers ne perdent leur valeur nutritive et leurs qualités organoleptiques.

Dans le présent travail, des bactéries lactiques ont été isolées et purifiées. Sur la base de la coloration de Gram et le test de catalase, 8 isolats ont été sélectionnés pour le criblage de leur activité protéolytique et aussi pour leur activité antimicrobienne vis-à-vis des souches pathogènes à Gram positif et à Gram négatif.

L'évaluation de l'activité inhibitrice des bactéries lactiques par la méthode de diffusion en puits et par celle des spots a montré que les 8 isolats exercent une activité inhibitrice dirigée contre des souches indicatrices Gram positifs et Gram négatifs testées, sauf sur *Micrococcus.sp* où aucune inhibition n'a été détectée et que cette activité varie selon la souche teste.

Les résultats ont montré que les souches isolées du J'ben de chèvre présentent une activité inhibitrice remarquable dirigée contre les bactéries pathogènes à Gram positif et à Gram négatif, par rapport aux souches isolées à partir du lait de chamelle qui sont plus actives vis-à-vis des bactéries pathogènes à gram négatif que celles à gram positif.

Nos résultats révèlent que les souches *Salmonella.sp* et *E.coli* sont les plus affectées par les activités antimicrobiennes exercées par les souches sélectionnées.

En se basant sur l'optimisation de certains paramètres comme l'influence de certains facteurs dominants telle la présence de l'acide lactique et de peroxyde

d'hydrogène, cela a permis de distinguer que les souches lactiques sélectionnées exercent un spectre d'activité antagoniste diversifiée.

Les résultats de l'activité antifongique ont indiquées que les souches lactiques Ch2, J1, Ch3, Ch4, Ch5 sont capables de produire des substances inhibitrices dirigées contre les *Penicillium* sp et *Cladosporium* sp.

En outre, l'étude de l'activité protéolytique exercée par les souches lactiques a montré que les souches lactiques retenues sont toutes protéolytiques avec des intensités différentes d'une souche à une autre, sauf la souche Ch 4 dont l'activité était presque nulle.

Ce travail peut être suivi par les perspectives suivantes :

- ◆ L'identification moléculaire des huit souches isolées.
- ◆ L'étude de l'activité antimicrobienne des isolats identifiés contre un panel plus large de bactéries cibles.
- ◆ La détermination des propriétés physico-chimiques des molécules produites (thermo- stabilité, sensibilité aux enzymes protéolytiques, glycolytique et lipolytiques, activité à différents pH, sensibilité aux détergents).
- ◆ L'étude de la relation entre le spectre d'activité antimicrobienne et la convergence génétique.
- ◆ L'exploitation des activités antimicrobiennes dans différentes matrices alimentaires en vue de lutter contre les pathogènes.

Références
Bibliographiques

Références Bibliographiques

-A-

-Achezegag, FZ., Zerarka, F., Merided F. (2008). Analyse microbiologique des produits laitiers (Le yaourt) .Mémoire en vue de l'obtention du diplôme d'études supérieures en biologie.Université d'Ouargla, 48 p.

-Adams M.R. and Moss MO. (2008). Chapter 7 - Bacterial agents of foodborne illness. Dans: Adams, M.R., O Moss, M. (Eds.), Food Microbiology. *RSC Publishing, Cambridge, UK.*, pp. 182-269.

-Adams, MR., Moss, MO. (2008). Chapter 7 - Bacterial agents of foodborne illness. Dans: Adams, M.R., O Moss, M. (Eds.), Food Microbiology. *RSC Publishing, Cambridge, UK.*, pp. 182-269.

-Aissaoui, D., Zidoune, MN. (2006). Le fromage traditionnel algérien « BOUHEZZA ».Séminaire d'animation régional. Technologie douce et procédé de séparation au service de la qualité et de l'innocuité des aliments. INSAT. Tunis, Tunisie/27-28-29 Novembre 2006.

-Akinobu K, Emiko M, Kazuya M. (2016). Characterization of flagellins isolated from a highly motile strain of *Lactobacillus agilis*. BMC microbiology. (En ligne). Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4802830/>« Consulté le 01/02/2020 ».

-Alaoui IM., Guilal J., Hamama, A., Saidi, B., Zahar, M. (2016). Identification de bactéries lactiques du lait cru de chamelle du sud du Maroc. *The international Journal of multi-disciplinary sciences.* 1 : 81-92.

-Allouche, FN., Hellal, A., Laraba A. (2010). Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. *Nature et Technologie,* 3: 13-20.

-Amiot, J., Fournier, S., Lebeuf, Y., Paquin, P., & Simpson, R., (2002). Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait. *Science et technologie du lait: Transformation du lait.* Presses international Polytechnique, Montréal. Pp: 1-73.

- Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E., Chevallier, I. (2006a). Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. 1-Screening and characterization of the antibacterial compound. *Food Control* 17, 454–446.
- Ammour M. S. (2004). écosystème microbien d'un atelier fermier de salaison Identification et propriétés des bactéries lactiques. Thèse doctorat Agrocampus Rennes.
- Antonii M.A.D., Hawes S. E. and Hillier S.L. (1999). The identification of vaginal *Lactobacillus* species and the demographic and microbiologic characteristics of women.
- Antonio, M. A., Hawes, S. E., & Hillier, S. L. (1999). The identification of vaginal *Lactobacillus* species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species. *Journal of Infectious Diseases*, 180(6), 1950-1956.
- Aslam and Qazi. J I. (2010). Isolation of acidophilic lactic acid bacteria antagonistic to microbial contaminants. *Pakistan. J. Zool.* 42(5): 567-573.
- Atanassova, M., Choiset, Y., Dalgalarondo, M., Chobert, J.M., Dousset, X., Ivanova, I. and Haertle, T. (2003). Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain M3. *International Journal of Food Microbiology* 87, 63–73.
- Atrih, A., Foster, S. (2001). Analysis of the role of bacterial endospore cortex structure in resistance properties and demonstration of its conservation amongst species. *Journal of Applied Microbiology*, 91(2): 364-372. doi: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01394.x>
- Axelsson L.T. (2004). Lactic Acid Bacteria: Classification and physiology. In lactic Acid Bacteria – Microbiology and functional aspects. Edited by S. Salminen, A.v. wright et A. Ouwehand. Marcel Dekker, Inc. 1-66. 12.

-B-

- Badis, A., Guetarni, D., Kihal, M., Boudjema, M. (2003).** Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *In Food and microbiology*, 21 (5): 579-588.
- Badis, A., Guetarni, D., Moussa-Boudjema, B., Henni, D.E., Tornadijo, M.E., Kihal, M. (2004).** Identification of cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and evaluation of their technological properties. *Food Microbiology*, 21: 343–349.
- Badis, A., Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M., Ouzrout, R. (2005).** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales « Arabia et Kabyle ». *Sciences & Technologie* N°23.Pp :30-37.
- Barefoot, S.F., Klaenhammer, T.R. (1983).** Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol*, 45(6) :1808-1815.
- Béal C, Marin M, Fontaine E, Fonseca F et Obert J.P, (2008).** Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. In : Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments (Corrieu G. Et Luquet F.M.). Tec et Doc, Lavoisier. Paris. 661-765.
- Bekhouché F. (2006).** Bactéries lactiques du lait cru de vache et Microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes : 1. Isolement et Identification biochimique. 2. Evaluation et Optimisation de la production d'enzyme polygalacturonase. Thèse de doctorat d'état en microbiologie et enzymologie option : génie alimentaire. Université De Mentouri Constantine Institut De La Nutrition De L'alimentation Et Des Technologies.
- Belkheir, K. (2017).** Caractérisation technologique de nouvelles souches de bactéries lactique isolées du lait de chamelle d'Algérie Réalisation de ferments lactiques. Génie microbiologique, Oran 1 Ahmed Ben Bella. Doctorat: 198.
- Bencharif, A. (2001).** Stratégies des acteurs de la filière lait en Algérie: états des lieux et problématiques. Options Méditerranéennes Série B. *Etudes et Recherches*, 32: 25- 45.

- Bendimerad, N. (2013).** Caractérisation phénotypique technologique et moléculaire d'isolats de bactéries lactiques de laits crus recueillis dans les régions de l'Ouest Algérien. Essai de fabrication de fromage frais type «Jben».Thèse de Doctorat, Université de Tlemcen. Algérie. P: 5.
- Benkerroum, N., Tamime, AY. (2004).** Technology transfer of some Moroccan traditional dairy products (lben, jben, smen) to small industrial scale. *Food Microbiol*, 21: 399–314.
- Bennama, R. (2012).** *Streptococcus thermophilus* : isolement et recherche systématique de souches indigènes productrices d'exopolysaccharides, Oran. Doctorat: 153.
- Bergamaschi, M., Cipolat-Gotet, C., Stocco, G., Valorz, C., Bazzoli, I., Sturaro, E., Ramanzin, M., Bittante. G. (2016).** Cheese making in Highland Pastures: Milk Technological Properties, Cream, Cheese and Ricotta Yields, Milk Nutrients Recovery, and Products Composition. *Journal of Dairy Science*, 99 (12): 9631–46.
- Bergsson, G., Arnfinnsson, J., Steingrímsson, O., Thormar, H. (2001).** In vitro killing of *Candida albicans* by fatty acids and monoglycerides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45: 3209–3212.
- Bergey's manual. (2009).** Systematic of bacteriology. Second Edition. Volume three the firmicutes. Edition springer.
- Boulouf, A. (2016).** Technologie Alimentaire, Etude du pouvoir technologique de quelques bactéries lactiques du fromage traditionnel « Bouhezza ». Technologie alimentaire, frères mentouri Constantine. Thèse de Magister: 135p.
- BOUZAI, M., CHATOUI, R., LATRACHE, H., & HASIB, A. (2016).** Activité antimicrobienne des souches de bactéries lactiques isolées de viande hachée de dromadaire et du lait cru de vache (Maroc). *Microbiol. Ind. San et Environn*, 10(1), 1- 12.
- Bradley, AJ. (2002).** Bovine mastitis: an evolving disease. *The Veterinary Journal*, 164(2): 116-128. doi: <http://dx.doi.org/10.1053/tvj.2002.0724>
- Buffa M J., MoraisA., Jimenez-Belenguer E., Hernandez -GimenezZ B., Guami S. (2005).** “Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from rawewes’ milk for cheese making”. *Milchw issenschaft*, vol. 61, p.404–407.

-Buffa M J., MoraisA., Jimenez-Belenguer E., Hernandez -GimenezZ B., Guami S. (2005). Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from rawes'milk for cheese making". *Milchw issenschaft*, vol. 61, p.404–407.colonized by these species. *J Infect Dis*; 180: 1950-6.

-C-

-CHENTOUF, H. (2015). *Effet des substances antimicrobiennes produites par leuconostoc mesenteroides isolées à partie du lait de chamelle Algérien sur Listeria spp. dans les produits alimentaires.* Thèse doctorat microbiologie non publiée, Université d'Oran, Oran.

-Claps, S., Morone, G. (2011). Produits laitiers et fromagers traditionnels de l'Algérie. In Développement de la Filière laitière et Fromagère en Algérie, Cor Filac:57-77.

-Cleusix, V., Lacroix, C., Vollenweider, S., Duboux, M. and Le Blay, G. (2007). Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* against intestinal bacteria. *BMC Microbiologiy* 7, 101.

-Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F. and Chikindas, M.L. (2001). Bacteriocins: safe,natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology* 71,1-20. I.

-Costard, S., Espejo, L., Groenendaal, H., & Zagmutt, F. J. (2017). Outbreak-related disease burden associated with consumption of unpasteurized cow's milk and cheese, United States, 2009–2014. *Emerging infectious diseases*, 23(6), 957.

-Cotter, PD., Hill, C. (2003). Surviving the acid test: response of Gram-Positive bacteria to low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(3): 429-453.

-Cotter, PD., Hill, C., Ross, RP. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10): 777-788. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1273>.

-Cotter , P., Ross, P., Hill., C. (2013). Bacteriocin - a viable alternative to antibiotics ? *Nature Reviews Microbiology*, 11: 95-105.

Crowley S., Bottacini F., Mahony J., van Sinderen D. (2013). Complete Genome Sequence of *Lactobacillus plantarum* Strain 16, a Broad-Spectrum Antifungal-Producing Lactic Acid Bacterium.

-D-

-Dalié, DKD., Deschamps, AM., Richard-Forget, F. (2010). Lactic acid bacteria-Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control*, 21:370–380.

-Das, A., Sasidharan, S., Achuthan, T., & Sindhuja, M. E. (2014). Isolation, Characterization and Estimation of Antimicrobial Activity of Novel Bacteriocin from *Lactobacillus plantarum*. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 3(5), 227-232.

-Das, A., Sasidharan, S., Achuthan, T., & Sindhuja, M. E. (2014). Isolation, Characterization and Estimation of Antimicrobial Activity of Novel Bacteriocin from *Lactobacillus plantarum*. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 3(5), 227-232.

-Delavenne., E (2012). Propriétés antifongiques de bactéries lactiques isolées de laits crus. Thèse de doctorat université de Bretagne occidentale Brest, 212 p.

-De Roissart H.B. (1986). Les bactéries lactiques. Dans : le lait et les produits laitiers. Luquet F. M., 3, Ed. Techniques et Documentations Lavoisier. Paris, pp: 343-407.

-De Vuyst, L. and Leroy, F. (2007). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 13, 194-199.

-Dib, W. (2015). Caractéristique et rôle probiotique des bactéries lactiques isolées à partir du lait de chèvre : effet immunomodulateur chez la souris Balb/c, université d’Oran. Thèse de doctorat: 188p.

-Dicks, LMT., Heunis, TDJ., van Staden, DA., Brand, A., Noll, KS., Chikindas, ML. (2011). Medical and personal care applications of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. In Wood, lactic acid bacteria, biodiversity and taxonomie. (En ligne). wily- Back well,, p 543-553.Disponible sur : <https://doi.org/10.1002/9781118655252.ch30>. « Consulté le 10/02/2020».

- Dillon, J.C. 2008.** Place du lait dans l'alimentation humaine en région chaude. Edition A. P.G (Agro Paris Tech).
- Doores S. (2014).** The genus *Sporo lactobacillus*. in : Wilhelm H, Holzapfel Brian J.B.
- Dorti, C. (2008).** Isolement des bactéries lactiques produisant de la sakacin G et utilisation sur des matrices alimentaires. Thèse de doctorat en Sciences agronomiques non publiée, Université de Gembloux, Belgique.
- Dortu, C.,Thonart, P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêt pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 13: 143-154.
- Doumandji, A., Hellal, A., Saidi, N.(2010).** Purification de la bactériocine à partir de *Lactobacillus acidophiles* 11, *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn*, 4: 25-47
- Dridier, D.,Rebuffat,S. (Ed.),** Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From genes to applications. New York: Springer, p391-421. doi: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-7692-5_19.

-E-

- El-Ghaish, S., Ahmadova, A., Hadji-Sfaxi, I., El-Mecherfi, K.E., Bazukyan, I., Choiset, I., Rabesona,H., Sitohy, M., Popov, Y. G., Kuliev, A. A., Mozzi, F., Chobert, J. M., Haertlé, T. (2011).** Potential use of lactic bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods. *Trends in Food Sci. Technol*, 22: 509-516.

-F-

- Fguiri, I., Ziadi, M., Atigui, M., Arroum, S. et Khorchani, T. (2015).** Biochemical and molecular identification of lactic acid bacteria isolated from camel milk in Tunisia. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 716- 720.

-Fguiri, I., Ziadi, M., Atigui, M., Arroum, S. et Khorchani, T. (2015). Biochemical and molecular identification of lactic acid bacteria isolated from camel milk in Tunisia. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 716- 720.

-Fleming, HP., Etohells, J. L., Costilow, RN.(1975). Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber Brines. *Appl Microbiol*, 30(6): 1040-1042.

-Florou-Paneri, P., Christaki, E., & Bonos, E. (2013). Lactic acid bacteria as source of functional ingredients. In *Lactic acid bacteria-R & D for food, health and live stock purposes*. Intech Open.

-G-

-Gálvez A, Abriouel H, Omar NB., Lucas R. (2011). Food applications and regulation. In Drider D et Rebuffat S (Ed.), *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From genes to applications*. New York: Springer, p353-390. doi: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-7692-5_18

-Gálvez, A., Abriouel, H., Lopez, R.L., Ben Omar, N. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopréservation. *Int J Food Microbiol*. 30 : 120(1-2):51-70.

-Ganesan, B., Seefeldt, K., Koka, R.C., Dias, B. and Weimer, B.C. (2004). Monocarboxylic acid production by lactococci and lactobacilli. *International Dairy Journal*, 14: 237–246.

-Gevers, D. (2002). Tetracycline resistance in lactic acid bacteria isolated from fermented dry sausages. Thèse Doc. Univ. Gent. Fac. Sci. Gent. Belgium.

-Gong H.S., Meng X.C. and Wang H. (2010). Plantaricin MG active against Gram-negative bacteria produced by *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391 isolated from “Jiaoke”, a traditional fermented cream from China, *Food Control*, 21, 89–96

-Gudkow A.V. (1987). Starters as mean controlling contaminating organisms. *Milk- the vital force*. pp. 83-93.

-Guertarni H, (2018). Les probiotiques et leur métabolites : une alternative de traitement des pathologies gastro intestinales. SAGREN. (En ligne).vol 02 (2), p 11-22. Disponible sur : http://www.univkm.dz/LABORATOIRES/PRAVDURN/images/Revue_SAGREN/Vol-02-NO- 02-juillet-2018/6-Article_2.pdf. « Consulté le 01/06/2020 ».

-Guetouache M., Guessas B. & Medjkal S. (2015). Technological and Biochemical characterization of Lactic Acid Bacteria isolated from Algerian Traditional Dairy Products. *World Applied Sciences Journal* 33 (2): 234-241.

-Guettouache, M., Guessas, B. (2015). Characterization and identification of lactic acid bacteria isolated from traditional cheese (Klila) prepared from cow's milk. *African Journal of Microbiology Research*. 9 (2): 71-77.

-Guiraud J.P., 2003. Microbiologie Alimentaire. *Tec &Doc, Dunod*. Paris. 90-292.

-Guiraud, J.P., et Rosec, J.P., (2004). Pratique des normes en microbiologie alimentaire Ed : AFNOR. Pp 237-251.

-Guizani, N., Kasapis, S., Al Ruzeiki, M. (2001). Microbial, chemical and rheological properties of laban (cultured milk). *International Journal of Food Science and Technology*, 36: 199-205.



-HadeF, S. (2012). Evaluation des aptitudes technologiques et probiotiques des bactéries lactiques locale. Mémoire en vue de l'Obtention du Diplôme de Magister, option : Microbiologie Appliquée, Université Kasdi Merbah-Ouargla, pt 87.

-Hammes, WP., Hertel, C. (2006).The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. *The Prokaryotes*, Springer: 320-403.

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

-Handford, CE., Katrina, C., Christopher, TE. (2016). Impacts of Milk Fraud on Food Safety and Nutrition with Special Emphasis on Developing Countries. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15 (1): 130-42.

-Hassaine, O. (2013). Caractéristiques d'intérêts technologiques de souches de bactéries lactiques isolées de lait camelin du sud Algérie. Thèse de doctorat. Université d'Oran, 180p.

-Hassan A.N. et Frank J.F. (2001). Starter Cultures and their use. In: *Applied Dairy Microbiology* (Marth E.H. et Steele J.L.) 2e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 151-205.

-Hebboul, FZ., Mazouzi, H., Soltani, S. (2005). Etude comparative de la qualité alimentaire entre trois types de lait frais : bovin, caprin, camelin. Mémoire d'ingénieur, Département de Biologie, Université de Laghouat. 71 p.

-Ho T.N.T., Tuan N., Deschamps A. et Caubet R. (2007). Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product of Vietnam. *Int. Workshop Food Safety Processing Technol.* 134-142.

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

-Holzapfel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J. and Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73(suppl): 365S–73S.

-Horvath, P., Coute-Monvoisin, A.C., Romero, D.A., Boyaval, P., Fremaux, C., Barrangou, R. (2009). Comparative analysis of CRISPR loci in lactic acid bacteria genomes. *Int J Food Microbiol.* 131(1):62-70.

https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bifidobacterium_longum.

https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Enterococcus_faecalis.

https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Streptococcus_thermophilus.

-J-

-Idoui, T., Karam, NE. (2008). Lactic acid bacteria from Jijel's butter: isolation, identification and major technological traits. *Aceites*, 59:361-367.

-Iqbal, H., Muhammad, I., Muhammad, NA., Abdul Wahab, MQ., and Saifullah M. (2016). Pathogenic Bacteria and Heavy Metals Toxicity Assessments in Evaluating Unpasteurized Raw Milk Quality through Biochemical Tests Collected from Dairy Cows. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 6 (11): 868–72.

-J-

-Janssen, M., Geeraerd, A.H., Cappuyns, A., Garcia-Gonzalez, L., Schockaert, G., Houteghem, N.V., Vereecken, K.M., Debevere, J., Devlieghere, F., Impe, J. (2007) Individual and combined effects of pH and lactic acid concentration on *L. innocua* inactivation: Development of a predictive model and assessment of Experimental Variability. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(5): 1601-1611.

-Jinet A., Champagne C.P., Girars F. and Morin N. (1996). Bacteriophage development in an immobilized lactic acid bacteria system. *Biotechnol. Lett.* 10: 463.

-Jinet, A., Champagne, CP., Girars, F., Morin, N. (1996). Bacteriophage development in an immobilized lactic acid bacteria system. *Biotechnol. Lett.* 10: 463-471.

-K-

-Kenneth T, (2011). Lactic Acid Bacteria. Online textbook of bacteriologie. (En ligne). Disponible sur: http://textbookofbacteriology.net/lactics_1.html. « Consulté le 22/12/2019 ».

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

-Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 12(1-3), 39-85.

-Klaenhammer, TR., Barrangou, R., Buck, BL., Azcarate-Peril, M.A., Altermann, E. (2005). Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health, *FEMS Microbiol Rev.* 29 (3):393-409.

-Knoetze, H., Todorov, SD., Dicks, LMT (2008). A class IIa peptide from *Enterococcus mundtii* inhibits bacteria associated with otitis media. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31(3): 228- 234. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.10.010>.

-Koussou, M., Duteurtre, G., Mopota, L. (2007). Consommation de l'an les bars laitiers de la ville de N'Djamena au Tchad. *Elev Med. Vet. Pays Trop.* 60: 39-4 ait d4.

-L-

-Lamontagne, MP., Champagne, J., Reitz, A., Sylvain, M., Nancy, G., Maryse, L., Julie, J., Ismail, F. (2002). Microbiologie de lait *In*. Science et technologie de lait; transformation du lait. *Ecole polytechnique de Montréal*, pp: 75-128.

-Lapointe-Vignola, C. (2002). Science et technologie du lait: transformation du lait. Presses inter Polytechnique.

-Lavermicocca, P, Valerio, F, Evidente, A, Lazzaroni, S, Corsetti, A., Gobbetti, M. (2000). Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9): 4084-4090.

-LAZREG, L. (2017). Bactériocines d'entérocoques isolés de lait cru et beurre de l'ouest algérien, Oran. Thèse doctorat: 193.

-Leroy F et De Vuyst L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Treat. Food Sci. Technol.* 15, 67-78.

-Liu, SQ. (2003). Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *Inter. J. of Food Microbiol*, 83: 115– 131.

-Loss, G., Depner M., Ulfman, LH., Joostvan Neerven, RJ., Hose, AJ., Genuneit, J., Karvonen, AM., Hyvärinen, A. (2015). Consumption of Unprocessed Cow's Milk Protects Infants from Common Respiratory Infections." *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 135 (1): 56–62.

-Lucey, JA. (2015). Raw Milk Consumption Risks and Benefits. *Nutrition Today*, 50(4):163-168.

-M-

-Magnusson J, Ström K, Roos S, Sjogren J, Schnürer J. (2003). Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 219, 129-135.

- Magnusson, J. (2003). Antifungal activity of lactic acid bacteria. Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Microbiology, Uppsala. Sweden.
- Magnusson, J. and Schnürer, J. (2001). *Lactobacillus coryniformis subsp. coryniformis strain Si3* produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 1-5.
- Mahi, M. (2010). Étude technologique des bactéries lactique isolées à partir du lait de Brebis Oran. Magister: 107.
- Mami, A., Henni, J. E., Kihal, M. (2008). Antimicrobial activity of *Lactobacillus* species isolated from Algerian raw goat's milk against *Staphylococcus aureus*. *World J. Dairy & Sci* .3: 39-49.
- Marcel, M. (2007). Larousse agricole Edition Larousse. Paris. France. pp. 115-405.
- Martín, R., Olivares, M., Marin, M., Xaus, J., Fernández, L. and Rodriguez, J. (2005). Characterization of a reuterin-producing *Lactobacillus coryniformis* strain isolated from a goat's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology* 104, 267–277.
- Mäyrä-Mäkinen A et Bigret M. (2004). Industrial use and production of lactic acid bacteria. In: *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects* (Salminen S, Wright A.V et Ouwehand A). 3e Ed. Marcel Dekker. New York. 73-102.
- Mechai, A., Debabza, M., Kirane, D. (2014). Screening of technological and probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Algerian traditional fermented milk products. *International Food Research Journal*, 21(6).
- Medouni, Y., Boulahchiche, N., et Brahimi, R. (2005). Rôle de la femme rurale dans le système de production agropastorale. Cas de la fraction Ouled Baida de la zone d'El Guedid Région de Djelfa (steppe centrale). Option : Méditerranéennes, Série A , n°70.
- Menad, N. (2017). *Effet antagoniste des bactéries lactiques isolées à partir du lait de vache vis-à-vis de Salmonella sp.* Thèse doctorat Microbiologie non publiée, Université de Mostaganem, Mostaganem.

Références bibliographiques

-Menad, R., Smaï, S., Bonnet, X., Gernigon-Spychalowicz, T., Moudilou, E., Khammar, F., & Exbrayat, J. M. (2017). Seasonal variations of aromatase and estrogen receptors expression in the testis of free-ranging sand rats. *Acta histochemica*, 119(4), 382-391.

-Mkrtchyan, H., Gibbons, S., Heidelberger, S., Zloh, M., Limaki, H.K. (2010). Purification, characterization and identification of acidocin LCHV, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus acidophilus* n.v. Er 317/402 strain narine. *Int.J. Antimicrobial Agents*, 35: 255-260.

-Monnet V, Latrille E, Béal C et Corrieu G. (2008). Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. In: Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. & Luquet F.M.). Technology and Document, Lavoisier. Paris: 512-592.

-Morisset, D., Berjeaud, J.M., Frère, J et Héchard, Y. (2005). Bactériocines de bactéries lactiques .In Bactéries lactique et probiotiques. Luquet FM., Corrieu G, Edi Tec et Doc, La voisier. 352 p.

-N-

-Nouani, A., Dako, E., Morsli, A., Belhamiche, N., Belbraouet, S., Bellal, M., Dadie, A. (2009). Characterization of purified coagulant extract from artichoke flower (*Cynara scolymus*) and from the fig tree latex (*ficus carica*) in light of their use in the manufacture of traditional cheese in Algeria. *Journal of food technology*, (7) ; 20-29

-O-

-Orla-Jensen, S. (1919). *The lactic acid bacteria* (Vol. 3, No. 2). Høst.

-O’Sullivan, M., Downey, L. (2017). “Historical food products. *Archaeology Ireland*, 30 (2): 36–39.

-Ouadghiri, M., Amar, M., Vancanaeyt, M., Swings, J. (2005). Biodiversity of lactic acid bacteria in Moroccan soft white cheese (Jben). *FEMS Microbiology Letters*, 251 (2):267-71.

-P-

- Park, Y. W., Haenlein, G. F., & Wendorff, W. L. (Eds.). (2006).** Handbook of milk of non-bovine mammals. Ames, IA: Blackwell.
- Perry, JJ., Staley, JT., Lory, S. (2004).** Bactéries Gram-Positives: Firmicutes et Actinobacteria. *In: Microbiologie.* Dunodéd., Paris. France. pp. 471-50.
- Pfeiler, E.A., Klaenhammer, T.R. (2007).** The genomics of lactic acid bacteria. *Trends Microbiol.* 15(12):546-53.
- Pot, B. (2008).** The taxonomy of lactic acid bacteria. In: Corrieu G., and Luquet F.M. (Eds). Bactéries lactiques. De la génétique aux ferments. Lavoisier. Paris, France. 1-152.
- Prescott, LM., Harley, J., Klein, DA., Bacq-Calberg, CM. (2003).** Microbiologie, 2e édition. De Boeck. 1137 pages.
- Privat K., Thonart P. (2011).** Action des cultures protectrices : cas des germes lactiques sur la flore alimentaire indésirable. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 15(2), 339-348.

-R-

- Ringø E., Van Doan, H., Lee, SH., Soltani, M., Hoseinifar ,SH., Harikrishnan, R., Song, SK. (2020).** Probiotics, lactic acid bacteria and bacilli: interesting supplementation for aquaculture . *Journal of applied Microbiology*, 129: 116-136.
- Robertson, A., Tirado, C., Lobstein, T., Knai, C., Jensen, J., Ferro-Luzzi, A., & James, W. (2004).** Food and Health in Europe: A New Basis for Action (European Series No 96).
- Ross, R. P., Morgan S., Hill C. (2002).** Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology* 79, 3-16.
- Ross, RP., Morgan, S., Hill, C.(2002).** Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, 79(1): 3-16. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00174-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00174-5).

-S-

- Sadiq, F.A., Yan, B., Tian, F., Zhao, J., Zhang, H. et Chen, W. (2019). Lactic Acid Bacteria as Antifungal and Anti-Mycotoxigenic Agents *Institute of Food Technologists*, p1541-4337.
- Salveti, E., Torriani, S., Felis, G.E. (2012). The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 4(4): 217-226.
- Samedi, L., Albert, L.C. (2019). Evaluation of Technological and Probiotic Abilities of Local Lactic Acid Bacteria. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 7(1): 9-19.
- Sass, P., Jansen, A., Szekat, C., Sass, V., Sahl, H.G., Bierbaum, G. (2008). The lantibiotic mersacidin is a strong inducer of the cell wall stress response of *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiology*, 8(1): 186. doi: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-8-186>.
- 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. *Afrique science*, 5: 293-304.
- Schillinger, U., Lücke, F.K. (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and environmental microbiology*, 55(8): 1901-1906.
- Schnürer, J., Magnusson, J. (2005). Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science & Technology*, 16: 70-78.
- Serhan M, Cailliez-Grimal C, Borges F, Revol-Junelles A.M, Hosri C et Fanni J. (2009). Bacterial diversity of Darfiyeh, a Lebanese artisanal raw goat's milk cheese. *Food Microbiol.* 26, 645-652.
- Servin, A.L. (2004). Antagonistic activities of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* against microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 28: 405-440.
- Shahani, K.M., Vakil, J.R., Kilara, A. (1976). Natural antibiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* and *L. bulgaricus*. II. Isolation of acidophilin from *L. acidophilus*. *Cultured Dairy. Prod J.* 12 :8-11.

- Siboukeur, O. (2008).** *Etude du lait camelin collecté localement: caractéristiques physicochimiques et microbiologiques; aptitudes à la coagulation.* Thèse de doctorat, Institut national agronomique El-Harrach, Alger (Algérie); 135 p
- Stahl, CH., Callaway., TR, Lincoln., LM., Lonergan, SM., Genovese, KJ. (2004).** Inhibitory activities of colicins against *Escherichia coli* strains responsible for post weaning diarrhea and edema disease in swine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(8): 3119-3121.
- Ström, K. (2005).** Fungal inhibitory lactic acid bacteria. Doctoral thesis, Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences, Department of Microbiology, Uppsala. Sweden.
- Šušković, J., Kos, B., Beganović, J., LebošPavunc, A., Habjanič, K., Matošić, S. (2010).** Antimicrobial Activity—the Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria. *Food Technology and Biotechnology*. 48(3): 296-307
- Sutyak, KE., Wirawan, RE., Aroutcheva, AA., Chikindas, ML. (2008).** Isolation of the *Bacillus subtilis* antimicrobial peptide subtilisin from the dairy product-derived *Bacillus amyloliquefaciens*. *Journal of Applied Microbiology*, 104(4): 1067-1074. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03626.x>
- T-
- Tagg, J. (2004).** Prevention of streptococcal pharyngitis by anti-*Streptococcus pyogenes* bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Streptococcus salivarius*. *Indian Journal of Medical Research*, 119: 13-16.
- Tamime, A.Y., 2002.** Microbiology of starter cultures. In: Dairy microbiology handbook (Robinson R.K.). 3^eEd., John Wiley and Sons, Inc., New York. 261-366.
- Taylor M.J., Bandi C. and Hoerauf A. (2005).** Wolbachia bacterial endosymbionts of filarial nematodes. *Adv in Parasitol.* 60: 245-284.
- Taylor, MJ., Bandi, C., Hoerauf, A. (2005).** Wolbachia bacterial endosymbionts of filarial nematodes. *Adv in Parasitol.* 60: 245-284.
- Tchamba, C. N. (2007).** Caractérisation de la flore lactique des laits fermentés artisanaux au Sénégal : cas de la zone des Niayes Cheikh anta Diop de Dakar. Thèse doctorat: 109.

-Tejero-Sariñena, S., Barlow, J., Costabile, A., Gibson, GR., Rowland, I. (2012). In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: Evidence for the effects of organic acids. *Anaerobe*, 18: 530e538.

-Thakur, S. S, Roy .P.K., Ghoshal. (2009). Reactive power dispatch nature & biologically inspired compaing: 10-1109.

-Todorov, S.D., Dicks, L.M.T. (2009). Bacteriocin production by *Pediococcus pentosaceus* isolated from marula (*Scerocaryabirrea*). *International Journal of Food Microbiology*, 132: 117–126.

-Topisirovic, L., Kojic, M., Fira, D., Golic, N., Strahinic, I. and Lozo, J. (2006). Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology* 112, 230-235.

-U-

-Uehara, S., Monden, K., Nomoto, K., Seno, Y., Kariyama, R., Kumon, H. (2006). A pilot study evaluating the safety and effectiveness of *Lactobacillus* vaginal suppositories in patients with recurrent urinary tract infection. *Int. J. Antimicrobial Agents*, 28: 30-34.

-V-

-VanTieghem, P. 1878. Sur la gomme du sucrerie (*Leuconostoc mesenteroides*) Ann. Sci. Nat. Bot. 7:180-203.

-Vasiljevic, T., Shah, N.P. (2008). Probiotics from Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal* 18, 714– 728.

-Vizoso, Pinto., M.G., Franz, CAP, Schillinger, U., Holzapfel, WH. (2006). *Lactobacillus spp.* with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *International journal of food microbiology*, 109(3): 205-14.

-Vollenweider, S., Lacroix, C. (2004). 3-Hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64: 16- 27.

-Vuillemand, J., Amiot, J. et Gauthier, S. (1986). Evaluation de l'activité protéolytique de bactéries lactiques par une méthode de diffusion sur plaque. *Microbiologie, Aliments and Nutrition*, 3 :327-332.

-W-

-Woraprayote, W., Malilka, Y., Sorapukdee, S., Swetwivathana. A., Benjakl, S., and Visessanguan, W (2016). Bacteriocines from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat product. *Meat Sci*, 120:118-132.

-Wouters, J., Ayad, E.H.E., Hugenholtz, J. and Smit, G. (2002). Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal*, 12: 91-109.

-Y-

-Yang, Z. (2000). Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: structures and properties. Academic Dissertation, University of Helsinki, Department of Food technology, Helsinki, Finland.

-Yateem, A., Balba, M. T., Al-Surrayai, T., Al-Mutairi, B., Al-Daher, R. (2008). «Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potential from camel milk ». *Int. J. Dairy Sci.* , 3: 194-199.

-Z-

-Zaidi, O. (2002). Caractérisation du fromage traditionnel bouhezza; caractérisation physicochimique et microbiologique. Mémoire d'ingénieur INATAA. Constantine, Algérie. 51 p.

-Zarour, K. Z. B., Hadadji, M., Moussa-boudjemaa, B., Henni, J., Kihal, M. (2013). Caractérisation microbiologique et technologique des espèces de *Leuconostoc mesenteroides* isolées du lait cru de chèvre et de chamelle. *Nature & Technologie*, 39- 47.

Annexes

Annexe 01

Formule des milieux de culture

1. Milieu MRS (Man, Rogosa, Sharpe) / Conda /pronadisa- Espagne :

Composition	Quantité en g/L	Préparation
Extrait de viande	10	-Verser 70,3g de MRS agar ou 55,3g de MRS bouillon dans un bécher.
Extrait de levure	5	
Peptone	10	-Additionné l'eau distillé Pour obtenir un volume total de 1L.
Acétate de sodium	5	
Citrate d'ammonium	2	-Agitation jusqu'à dissolution complète et l'ébullition.
Glucose	20	
Sulfate de manganèse	0,20	-Répartir en flacons.
Sulfate de magnésium	0.05	-Autoclavage : 121°C pendant 12min.
Phosphate dipotassique	2	
Agar-agar (uniquement gélose)	15	
Tween 80	1,08	

pH du milieu prêt -à- l'emploi à 25°C : 6,4 ± 0,2.

2. Gélose M17 /Biokar diagnostics-France:

Composition	Quantité en g/L	Préparation
Extrait de levure	2.5	-Verser 57.2g du milieu déshydraté dans un bécher.
Extrait de viande	5	-Additionné un litre d'eau distillé.
Tryptone	2.5	-Agiter lentement jusqu'à dissolution complète, en chauffant.
Peptone papainique	5	
Peptone pepsique de viande	2.5	-Répartir en flacons.
Acide ascorbique	0.5	- Stérilisé à l'autoclave : 115°C pendant 20min.
Lactose	5	
Glycérophosphate de sodium	19	
Mg SO4	0.25	
Agar-agar	15	

pH du milieu prêt-à- l'emploi à 25°C : 7,1 ± 0,2.

3. Mueller Hinton /HIMEDIA :

Composition	Quantité en g/L	Préparation
Infusion de viande de boeuf	300	-Dans un bécher peser 38 g du milieu déshydraté.
Amidon	1.5	-Ajouter un litre d'eau distillée.
Hydrolysate de caséine	17.5	-Agitation en chauffant jusqu'à dissolution complète et l'ébullition.
Agar	15	-Répartir dans des flacons ou des tubes
		-Stériliser à l'autoclave :121°C pendant 15min.

pH du milieu prêt-à- l'emploi à 25°C : 7,3 ± 0,1.

4. Sabouraud/ Biokar diagnostics-France :

Compositon	Quantité en g/L	Préparation
Digestat pancréatique de caséine.	5	-Mettre en solution 65g de milieu déshydraté dans un litre d'eau distillé
Peptone pepsique de tissu animal	5	-Agitation en chauffant, jusqu'à ébullition et dissolution complète.
Glucose	40	-Répartir dans des flacons.
Agar	15	-Stériliser à l'autoclave : 121°C pendant 15min.

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : $5,6 \pm 0,2$.

5. Gélose nutritive standard Plate Count Agar (P.C.A)/ Conda/ pronadisa-Espagne

Composition	Quantité en g/L	Préparation
Hydrolysate tryptique de caséine	5.0	-Mettre en solution 23.5g du milieu déshydraté dans un litre d'eau distillé.
Extrait de levure	2.5	-Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète.
Glucose	1.0	-Répartir dans des flacons.
Agar	15	Autoclavage : 121°C pendant 15min.

pH: 7.0 ± 0.2 dans 25°C.

6. Bouillon nutritive /Biokar diagnostics-France :

Composition	Quantité en g/L	Préparation
Peptone	10	-Mettre en solution 20 g du milieu déshydraté avec un litre d'eau distillé.
Extrait de viande	5	
Chlorure de sodium	5	-Agiter lentement jusqu'à dissolution complète
		- Répartir dans des tubes ou des flacons
		-Autoclavage : 121°C pendant 15min.

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : $7,0 \pm 0,2$.

7. Extrait de malt/ Conda/ pronadisa- Espagne:

Composition	Quantité en g/L	Préparation
Extrait de malt	15	-Mettre en solution 48.28g du milieu déshydraté avec un litre d'eau distillé.
D-maltose	12.75	
Dextrine	2.75	-Agiter lentement jusqu'à dissolution complète
Phosphate dipotassique	1	- Répartir dans des tubes ou des flacons
Peptone	0.75	-Autoclavage :121°C pendant 15min.
Agar	15	
Chlorure d'ammonium	1	

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : $4,8 \pm 0,2$.

8. Gélose MRS au lait écrémé :

Préparation:

Pour obtenir un volume total de 250ml de milieu MRS au lait écrémé:

- Mettre en solution 100 ml du milieu déshydraté semi concentration, 2g d'agar-agar dans 100 ml d'eau distillé.
- Agiter jusqu'à dissolution complète.
- Stériliser à l'autoclave pendant 12 min à 121°C.
- Rajouter 150 ml de lait stérilisé à l'autoclave pendant 10 min.

Annexe 02

Coloration de Gram

La coloration de Gram a été effectuée selon le protocole décrit par **Prescott et al., 2003**.

1. Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre.
2. Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec la goutte d'eau, strier et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène.
3. Couvrir le frottis par du cristal violet pendant 60 secondes.
4. Laver l'excès du colorant avec de l'eau distillée.
5. Couvrir de lugol pendant 30 secondes.
6. Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes.
7. Rincer immédiatement le frottis avec le mélange alcool - acétone en inclinant la lame et par goutte à goutte jusqu'à disparition complète de la coloration violette.
8. Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes.
9. Couvrir avec de la fuschine pendant 15 secondes.
10. Laver à l'eau distillée pendant 10 secondes.
11. Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope à un fort grossissement.

Les cellules Gram⁺ absorbent la couleur du cristal violet et demeurent bleues violettes en apparence, contrairement aux cellules Gram⁻ qui apparaissent distinctement rosâtres.

Annexe 03

La composition des colorants de Gram

1. Violet de gentiane au cristal :

Violet de gentiane	10g
Phénol	20g
Ethanol à 0.95	10 ml
Eau distillée	1 ml

2. Lugol :

Iode	5g
IO dure de potassium	10g
Eau distillée.....	1g
Flacon brun	

3. Fuchsine de Ziehl :

Fuchsine bosique	10g
Phénol	50g
Ethanol à 0.5	10 ml
Eau distillée	1 ml

Annexe 04

Composition des solutions de titrage

Solution de NaOH 0.1N:

Eau distillé 1L

NaOH 20g