

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université SAAD DAHLEB Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département De Biologie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV

Filière Sciences Biologiques

Option : Microbiologie

Thème

**Isolement et caractérisation des bactéries lactiques à
partir du milieu de fermentation des glands**

Présenté par :

Date de soutenance:

Bouleghebar Bouchra

Le 07/07/2025

Akir chainez

Devant le jury:

- Fares R.
- Benhouna I.
- Kadri F.
- Boumeridja S.

MCB/USDB
MCB/USDB
MCA/USDB
INGENIEURE P

Présidente
Examinatrice
Promotrice
Co-promotrice

Remerciements

Avant tout, nous remercions Allah Tout-Puissant qui nous a donné le courage, la volonté et la force nécessaires pour accomplir ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite et de nous avoir guidés à chaque étape.

Nous tenons tout d'abord à exprimer notre profonde reconnaissance à notre encadreur **Mme Kadri F**, Maître de conférences au Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Saad Dahleb Blida. Nous la remercions sincèrement pour son encadrement rigoureux, ses précieux conseils, son soutien constant et sa bienveillance tout au long de ce travail.

Nos remerciements les plus chaleureux vont à notre Co-encadreur, **Mme Boumeridja S**, ingénieure principal de laboratoire en microbiologie à l'ENS Kouba. Sa patience infinie, sa douceur dans l'accompagnement et sa disponibilité constante ont été pour nous une source de réconfort et de motivation. Sa présence attentive et son soutien bienveillant ont profondément marqué notre parcours, rendant cette expérience à la fois enrichissante et humaine.

Nous exprimons également notre gratitude à **Mme Fares R**, Maître de conférences au Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Saad Dahleb Blida, pour l'honneur qu'elle nous a fait d'accepter de présider le jury, d'évaluer et d'examiner ce mémoire avec rigueur et bienveillance.

Nos plus sincères remerciements vont aussi à **Mme Benhouna I**, Maître de conférences à l'Université Saad Dahleb Blida, pour l'honneur qu'elle nous a fait d'accepter d'examiner ce travail. Nous adressons nos remerciements à tous les professeurs du Département des Sciences Biologiques de l'Université Saad Dahleb Blida, pour leur enseignement de qualité et leur soutien tout au long de notre formation. Nos remerciements vont également à toutes les techniciennes des laboratoires pédagogiques de l'ENS, pour leur aide précieuse et leur disponibilité.

Enfin, nous remercions du fond du cœur nos familles : nos parents, toujours présents et encourageants, nos grands-parents, nos frères, sœurs, oncles, tantes, ainsi que tous nos amis, pour leur soutien affectif et moral indéfectible. Leur amour et leur confiance ont été pour nous une source inestimable de force et de sérénité.

À tous ces intervenants, nous adressons nos plus sincères remerciements, notre respect profond.

Dédicaces

Grâce à **Allah**, source de toute lumière et de toute force, qui me guide et m'accompagne chaque jour sur le chemin de la vie

Je dédie ce mémoire à mes parents,

À mon **papa**, pilier de ma vie, dont la sagesse, la patience et les sacrifices silencieux m'ont toujours guidé. Ton courage et ta force m'inspirent chaque jour à donner le meilleur de moi-même.

À ma **maman**, source infinie d'amour, de tendresse et de douceur, qui a toujours cru en moi, même dans les moments les plus difficiles. Ta présence réconfortante est mon refuge et ma lumière.

À **moi-même**, à ces jours et à ces années, aux difficultés que j'ai rencontrées, aux nuits tardives que j'ai passées, à toutes les déceptions que j'ai endurées. Le voyage n'était pas court et le rêve n'était pas proche, donc loué soit Allah qui a facilité les débuts pour moi et m'a permis d'atteindre la fin.

À mes frères, **Abdelhak**, **Iyadoo** mon petit d'amour, **Mouad** que j'aime profondément, pour leur soutien constant, leur complicité et leur encouragement. Vous êtes mes premiers amis et mes plus grands alliés dans cette aventure de la vie.

À ma tante **Selma**, dont la bienveillance et les conseils avisés ont été un véritable soutien moral. Ta générosité et ton affection ont toujours réchauffé mon cœur.

À ma meilleure amie, **Chahinez**, complice de toujours depuis notre enfance, avec qui j'ai partagé rires, efforts et réussites. Ce mémoire que nous avons réalisé ensemble est le fruit de notre solidarité et de notre confiance mutuelle. Je souhaite de tout cœur que notre amitié continue de grandir et de nous accompagner tout au long de notre vie.

À tous mes proches qui m'aiment et me soutiennent, votre présence à mes côtés est un trésor inestimable. Merci pour votre confiance, votre patience et votre encouragement qui m'ont porté jusqu'ici.

Dédicaces

J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail, réalisé grâce à Dieu, source de toute lumière et de toute force.

Je Lui rends grâce pour m'avoir guidée et soutenue à chaque étape de ce chemin, parfois semé d'embûches.

À **mes parents**, dont l'amour inconditionnel, la patience infinie et les sacrifices silencieux ont été mon refuge et ma force. Vous êtes le cœur battant de ce succès, et je vous porte en moi à chaque instant avec une profonde gratitude.

À mes sœurs **Linda** et **Nihed**, ainsi qu'à mon frère **Noufel**, pour leur présence tendre et leur soutien constant, qui ont illuminé mes jours les plus sombres et m'ont donné courage et confiance.

À mon amie **Bouchra**, complice fidèle depuis l'enfance, dont l'amitié sincère et précieuse a été un véritable trésor tout au long de cette aventure.

À tous mes **proches et amis**, pour leurs encouragements chaleureux et leur bienveillance, qui ont nourri mon espoir et renforcé ma détermination.

Enfin, à **moi-même**, qui ai puisé dans mes forces invisibles, dans ma résilience et ma volonté, même lorsque le chemin semblait trop long et trop difficile.

الملخص

في العديد من البلدان، شهد اختيار سلالات بكتيريا حمض اللاكتيك من الأغذية المخمرة تقليدياً تطوراً كبيراً، بناءً على قدراتها الصناعية أو خصائصها البروبيوتكية المحتملة. هدفت دراستنا إلى عزل بكتيريا حمض اللاكتيك من وسط تخمير بلوط البلوط ، وتوصيف بعض قدراتها البروبيوتكية والتقنية M17 و MRS ، وتنقيتها على أوساط آغار (*Quercus ilex* L.) الأخضر كشفت النتائج أن وسط التخمير كان ذو جودة ميكروبيولوجية جيدة رغم غناه ببكتيريا حمض اللاكتيك المعدودة على أوساط (وحدة مستعمرة/مل و 2.2×10^5 وحدة مستعمرة/مل على التوالي 2.4×10^5 M17 و MRS آغار في هذا العمل، تم اختيار 4 سلالات بعد الفحوصات المجهرية والماكروسكوبية واختبارات الكاتالاز وتلوين غرام. تشير الاختبارات الفسيولوجية والكيميائية الحيوية (درجات الحرارة، مقاومة الملوحة، والنمط التخميري) إلى أن السلالتين المعزولتين *Leuconostoc* لأجناس M17 ، بينما تنتمي السلالات المعزولة على وسط *Lactobacillus* تنتمي لجنس MRS على وسط أظهرت هذه السلالات مقاومة للحواجز البيولوجية (الحموضة وربما الأملاح الصفراوية)، وقدرة على *Lactococcus* و *Escherichia coli* و *Bacillus subtilis* مقاومة المضادات الحيوية، بالإضافة إلى نشاطها المضاد للميكروبات ضد ، بمناطق تثبيط تتراوح بين 18 مم و 27 مم قطراً. ومع *Listeria monocytogenes* و *Pseudomonas aeruginosa* ذلك، تفاوتت استجابة هذه العزلات للمضادات الحيوية بين الحساسية والمتوسطة والمقاومة اعتماداً على السلالة والمضاد الحيوي المختبر. علاوةً على ذلك، لم تُظهر هذه العزلات أي نشاط انحلالي للدم توضح هذه الدراسة أن وسط تخمير بلوط البلوط الأخضر آمن ويشكل مصدراً جيداً لبكتيريا حمض اللاكتيك ذات إمكانات بروبيوتكية واعدة.

، فسيولوجيا، نشاط مضاد للميكروبات، M17، MRS، بكتيريا حمض اللاكتيك، *Quercus ilex* L.: الكلمات المفتاحية
إمكانات بروبيوتكية

Résumé

Dans de nombreux pays, la sélection des souches de bactéries lactiques à partir des aliments fermentés traditionnellement, en fonction de leurs aptitudes industrielles ou de leurs éventuelles propriétés probiotiques a connu un développement considérable. Notre étude a eu pour objectif d'isoler des bactéries lactiques à partir du milieu de fermentation des glands de *Quercus ilex* L., de les purifier sur gélose MRS et M17 et de caractériser certaines de leurs aptitudes probiotiques et technologique.

Les résultats ont révélés que le milieu de fermentation était de bonne qualité microbiologique bien qu'il était riche en bactérie lactiques dénombrées sur les milieux gélosés MRS et M17 ($2,4 \times 10^5$ UFC/mL et 2.2×10^5 UFC/ml respectivement).

Dans ce travail 4 souches ont été sélectionnées après des examens macroscopique, microscopique, test de catalase et la coloration de Gram. Les tests physiologiques et biochimiques (températures, résistance à la salinité et type fermentaire) suggèrent que les deux souches isolées sur le milieu MRS appartiennent au même genre *Lactobacillus* et les celle isolées sur le milieu M17 appartienne au genres *Leuconostoc* et *Lactococcus*. Ces souches ont montré une résistance aux barrières biologiques (acidité et probablement aux sels biliaries), une capacité à résister aux antibiotiques, ainsi que leur activité antimicrobienne contre *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Listeria monocytogenes*, avec des zones d'inhibition qui varient entre 18mm à 27 mm de diamètre. Cependant la réponse de ces isolats aux antibiotiques fluctuant entre sensible, intermédiaire et résistante en fonction des souches et de l'antibiotique testé. Par ailleurs ces isolats n'avaient aucune activité hémolytique.

Cette étude montre que le milieu de fermentation des glands de chêne vert est salubre et constitue une bonne source de bactéries lactiques qui ont des potentialités probiotiques prometteuses.

Mots-clés : *Quercus.ilex. L*, bactéries lactiques, MRS, M17, Physiologie, activité antimicrobienne, potentiel probiotique.

Abstract

In many countries, the selection of lactic acid bacteria strains from traditionally fermented foods, based on their industrial aptitudes or potential probiotic properties, has seen considerable development. Our study aimed to isolate lactic acid bacteria from the fermentation medium of *Quercus ilex* L. acorns, purify them on MRS and M17 agar, and characterize some of their probiotic and technological aptitudes.

The results revealed that the fermentation medium was of good microbiological quality, despite being rich in lactic acid bacteria enumerated on MRS and M17 agar media (2.4×10^5 CFU/mL and 2.2×10^5 CFU/mL, respectively).

In this work, 4 strains were selected after macroscopic and microscopic examinations, catalase tests, and Gram staining. Physiological and biochemical tests (temperature, salinity resistance, and fermentative type) suggest that the two strains isolated on MRS medium belong to the *Lactobacillus* genus, while those isolated on M17 medium belong to the *Leuconostoc* and *Lactococcus* genera. These strains showed resistance to biological barriers (acidity and likely bile salts), antibiotic resistance capacity, and antimicrobial activity against *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Listeria monocytogenes*, with inhibition zones ranging from 18 mm to 27 mm in diameter. However, the isolates' response to antibiotics varied between sensitive, intermediate, and resistant depending on the strain and antibiotic tested. Furthermore, these isolates exhibited no hemolytic activity.

This study demonstrates that the fermentation medium of holm oak acorns is safe and constitutes a good source of lactic acid bacteria with promising probiotic potential.

Keywords: *Quercus ilex* L., lactic acid bacteria, MRS, M17, physiology, antimicrobial activity, probiotic potential.

Liste des abréviations

% : pourcentage

°C : Degré Celsius

µl : microlitre

ATP : adénosine triphosphate

BL : Bacilles lactiques

BSH : Bile Salt hydrolase

CL : Coques lactiques

CO₂ : dioxyde de carbone

EMP : Emden-Meyerhof-Parnas ADP

FA : La fermentation acétique

FAO : Food and Agriculture Organization

FML : La fermentation malolactique

FP : fermentation propionique

g : gramme

GC : pourcentage en guanine et cytosine

GN : gélose nutritive

h : heure

H₂O : eau

H₂O₂ : l'eau oxygénée

Hcl : acide chlorhydrique

I : intermédiaire

LAB : Bactéries lactiques

M17 : milieu de Tarzagli

MH : Mueller Hinton

Min : minute

ml : millilitre

mm : millimètre

Mol : Mole Unité déconcentration

MRS : Milieu de Man Rogosa Sharpe

NaCl : chlorure de sodium

NaOH : Hydroxyde de sodium (soude)

O₂ : oxygène

OMS : organisation mondiale de la santé

PLP : Protéines de liaison aux pénicilline

pH : potentiel Hydrogène

Pi : pyruvate

R : résistante

S : sensible

BL : souche

T° : Température

UFC/ml : Unité formant colonie par millilitre

Vf : viande- foie

VP : Vogues-Proskauer

Liste des figures

Figure 1 : schéma représentatif de la relation entre la fermentation alcoolique et acétique.	7
Figure 2 : Arbre phylogénétique des bactéries lactiques.....	10
Figure 3 : les bienfaits des probiotiques sur la santé.....	13
Figure 4 : schéma modifié représentatif des principaux critères pour la sélection des probiotiques.....	13
Figure 5 : Protocole d'isolement et purification des bactéries lactiques.....	17
Figure 6 : observation macroscopique des colonies des souches cultivées sur gélose MRS.	26
Figure 7 : Aspect macroscopique des bactéries lactiques obtenues après 48h d'incubation (A): à 37° ; (B) : à 45° ;(C) :à 4°	29
Figure 8 : observation macroscopique des bactéries lactiques en milieu de Sherman a 1% et 3% après 48h d'incubation	31
Figure 9 : Aspect macroscopique des bactéries lactiques obtenues après 48 h d'incubation(A) Ph :4.8 ; (B) pH=9.6.....	32
Figure 10 : observation macroscopique des bulles d'air dans la cloche.	32
Figure 11 : Observation macroscopique de la production d'acétoïne	33
Figure 12 : Aspect macroscopique des bactéries lactiques à ph 3	34
Figure 13 : Observation macroscopique de l'hydrolyse des sels biliaires.....	35
Figure 14 : observation macroscopique des bactéries lactiques sur gélose au sang	35
Figure 15 : observation macroscopique des zones d'inhibitions.....	37
Figure 16 : observation macroscopique des zones d'inhibitions des bactéries lactiques.....	39

Liste des tableaux

Tableau 1 : Exemples d'aliments fermentés	5
Tableau 2 : les caractéristiques différentielles des principales bactéries lactiques.....	10
Tableau 3 : les principales espèces de bactéries lactiques à activité probiotique.	12
Tableau 4 : Souches de bactéries pathogènes choisies et ré-identifiées pour les test d'antagonisme.	15
Tableau 5 : germes recherchés dans le contrôle de la qualité microbiologique du liquide de fermentation	16
Tableau 6 : Liste des antibiotiques utilisés dans l'étude de la sensibilité des BL	22
Tableau 7 : Caractérisation de la qualité microbiologique du liquide de fermentation.....	24
Tableau 8: Caractères culturaux et microscopiques des flores isolées sur les différents milieux de l'analyse de la qualité microbiologique du liquide de fermentation.	24
Tableau 9 : Les résultats de dénombrement des bactéries lactiques isolées sur les milieux gélosés MRS et M17 à partir du milieu de fermentation des glands de chêne vert	25
Tableau 10 : Caractéristiques microscopiques des souches obtenues après l'isolement.....	26
Tableau 11 : Observation microscopiques des souches purifiés.....	27
Tableau 12 : Croissance des bactéries lactiques à différentes températures.....	29
Tableau 13 : Résultats du test de culture sur milieu hypersalé.	30
Tableau 14 : les résultats de test de lait de Sherman.....	30
Tableau 15 : Résultat du test de croissance à différents pH.....	31
Tableau 16 : Les résultats de l'antibiogramme.....	37
Tableau 17 : Résultats de l'activité antimicrobienne diamètres des zones d'inhibition en mm. ..	38
Tableau 18 : Récapitulatif de la caractérisation des souches sélectionnées.....	40

Table des matières

Remerciements

Dédicaces

المخلص

Résumé

Abstract

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction..... 2

Chapitre 01: Synthèse bibliographique

I.	Généralités sur le Chêne	3
1.	Définition de chêne	3
2.	Répartition géographique du chêne	3
3.	Présentation générale de chêne : Genre <i>Quercus.sp</i>	3
3.1	Taxonomie	3
3.2	Description générale	3
3.2.1	Les glands de quercus sp.....	4
3.2.1.1	Definition.....	4
3.2.1.2	Toxicité.....	4
II.	Généralités sur la fermentation	5
1.	Définition	5
2.	Les aliments fermentés	5
3.	Différents types de fermentations	5
3.1	Fermentation alcoolique	5
3.2	Fermentation Malolactique	6
	le vin	6
3.3	Fermentation acétique	6
	la vinaigre.....	7
3.4	Fermentation propionique	7

3.5 Fermentation butyrique	7
fromagr.....	7
3.6 Fermentation lactique	8
yaourt.....	8
III. Généralités sur Les bactéries lactiques	9
1. Définition	9
2. Classification	9
3. Les caractéristiques des bactéries lactiques	10
4. Les voies fermentaires des bactéries lactiques	11
4.1 Voie homofermentaire	11
4.2 Voie hétérofermentaire	11
IV. Les probiotiques	12
1. Définition	12
2. Les principaux rôles des probiotiques	12
3. Les espèces considérées comme des probiotiques	12
4. Les effets des probiotiques sur la santé.....	13
5. Les critères de sélection des probiotiques	13
5.1 Résistance à l'acidité gastrique	14
5.2 Résistance aux sels biliaires	14
5.3 Résistance par la production des substances antimicrobiennes	14
5.4 Bonnes propriétés technologiques	14

Chapitre 02 : Matériels et méthodes

1. Matériel.....	15
1.1.Matériel non biologique.....	15
1.2.1.Glands.....	15
1.2.2.Souches pathogènes cibles.....	15
2. Méthodes.....	16
2.1.Fermentation des glands.....	16
2.2.Préparation des dilutions décimales.....	16
2.3.Qualité microbiologique.....	16
2.4.Isolement des bactéries lactiques.....	16
2.4.1.Mise en culture.....	16

2.4.2. Dénombrement.....	16
2.4. 3. Purification.....	17
2.5. Pré-identification phénotypique et sélection des bactéries lactiques	17
2.5.1.Etude morphologique des bactéries lactiques.....	18
- Observation macroscopique.....	19
- Observation microscopique.....	19
2.5.2. Test de catalase.....	19
2.5.3. Autres Tests Physiologiques et Biochimiques.....	19
A- croissance à différentes températures	19
B- Test de salinité.....	19
C- Test de lait de Sherman.....	20
D- Test de Ph.....	20
E- type fermentaires.....	20
F- Production d'acétoïne.....	20
2.6. Aptitudes probiotiques des bactéries lactiques isolées.....	21
2.6.1. Résistance aux conditions gastro-intestinales.....	21
A-Tolérance à l'acidité	21
B/Tolérance aux sels biliaires	21
2.6.2. Evaluation de la sécurité des souches présumées probiotiques.....	21
A/Pouvoir hémolytique.....	21
B/Sensibilité aux antibiotiques.....	21
C/Activité antimicrobiennes des bactéries lactiques.....	22

Chapitre 3 : Résultats et discussion

1. Qualité microbiologique.....	24
2. Isolement, Sélection et Purification des Bactéries Lactiques.....	25
2.1. Dénombrement.....	25
2.2.Caractérisation macroscopique.....	25
2.3.Caractérisation microscopique.....	26
2.4.Test de catalase.....	28
3. Caractéristiques physiologiques et Biochimiques.....	28
A / Croissance à différentes températures.....	28

B/ Test de salinité.....	29
C/ Test de lait de Sherman.....	30
D/ Test de pH.....	31
E/ Test type fermentaire.....	32
F/ Test de production de l'acétoine.....	33
4. Aptitude probiotique des bactéries lactiques isolées.....	33
4.1 Résistance aux conditions gastro-intestinales.....	33
A/ Tolérance à l'acidité.....	33
B/ Tolérance aux sels biliaires.....	34
4.2 Evaluation de la sécurité des souches présumées probiotiques.....	35
A/ Pouvoir hémolytique.....	35
B/ Sensibilité aux antibiotiques.....	36
C/ Activité antimicrobienne (d'antagonisme) des bactéries lactiques.....	38

Conclusion

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

La fermentation microbienne est largement utilisée pour produire et améliorer les aliments fermentés, grâce aux activités métaboliques de micro-organismes comme les bactéries lactiques, les levures et les moisissures (**Hilgendorf et al., 2024**). Elle enrichit la valeur nutritionnelle, améliore les propriétés sensorielles et prolonge la conservation. Des aliments de base comme le yaourt, le kimchi, le tempeh et le kombucha, issus de diverses cultures, se distinguent par leurs saveurs uniques et leurs bienfaits reconnus pour la santé digestive et le système immunitaire (**Niyigaba et al., 2025**).

En effet, les probiotiques, souvent appelés « bonnes bactéries », apportent de nombreux bienfaits pour la santé humaine. Parmi lesquels, on compte la prévention ou l'amélioration de l'intolérance au lactose, la diarrhée, les infections, les allergies, l'hypercholestérolémie, les troubles gastro-intestinaux, ainsi que certains types de cancer, comme l'ont démontré plusieurs modèles animaux expérimentaux et des études cliniques chez l'homme (**Zaib et al., 2024**).

La majorité des bactéries probiotiques couramment utilisées dans l'alimentation humaine et animale sont des bactéries lactiques (BL), qui comprennent *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, et *Leuconostoc* (**Butel, 2014**).

Les bactéries lactiques sont largement utilisées comme cultures de démarrage dans la production de nombreux aliments fermentés, notamment les produits laitiers, les viandes, les fruits, les légumes et les céréales. Elles contribuent à la saveur, à la texture et à la valeur nutritionnelle des produits, tout en jouant un rôle dans l'accélération de la maturation, l'amélioration de la consistance et le contrôle des fermentations (**Bintsis, 2018**).

Bien que les produits laitiers fermentés et l'intestin animal soient les sources les plus courantes, les bactéries probiotiques peuvent également être dérivées de divers produits fermentés traditionnels fabriqués à partir de divers substrats (**Rivera-Espinoza et al.; Gallardo-Navarro, 2010**).

Les forêts méditerranéennes, riches en biodiversité, abritent notamment les chênes verts (*Quercus ilex*). Les glands de cette espèce sont valorisés dans plusieurs pays tel que l'Algérie, le Maroc, la France... etc, pour leur potentiel alimentaire et économique. Ils peuvent être consommés crus, bouillis, grillés ou transformés en farine, utilisée dans la préparation d'une variété diététique de couscous, notamment dans la wilaya de Jijel (**FAO, 2021**).

Un aspect clé de cette valorisation traditionnelle est la fermentation naturelle des glands, après un trempage prolongé dans de l'eau renouvelée, des micro-organismes naturels décomposent les tanins responsables de l'amertume, améliorant ainsi la digestibilité et les qualités gustatives du produit final (**Sebti et al., 2021**).

L'objectif de notre étude est d'isoler, purifier et caractériser des bactéries lactiques à partir de l'eau de fermentation des glands de *Quercus Ilex L.* sur les milieux MRS et M17, puis à évaluer leur potentiel probiotique et technologique.

Notre manuscrit est structuré en trois chapitres :

Le premier chapitre est consacré à une synthèse bibliographique articulée sur les généralités du Chêne ; *Quercus sp* et ses glands ; sur La définition et type de fermentation ainsi que les germes impliqués ; et sur les bactéries lactiques, leur taxonomie, habitat, classification et leur principale caractéristique de différents genres et les probiotiques.

Dans Le deuxième chapitre nous exposons le matériel et les méthodes mis en œuvre dans le cadre de la réalisation de ce travail. Il comporte les techniques d'identification morphologiques, physiologiques et biochimiques des souches lactiques isolées et purifiées

Le troisième chapitre du manuscrit est celui dédié aux résultats et discussion, en terminant avec une conclusion générale qui englobe les résultats, en plus des perspectives de cette étude.

I. Généralités sur le Chêne

1. Définition de chêne

Le chêne, se distingue comme l'un des arbres nobles et les plus représentatifs du bassin méditerranéen, avec une taille pouvant atteindre 20 à 25 mètres, dont le tronc est fréquemment tortueux et ramifié et appartenant à la famille des fagacées.

Couramment employé en ébénisterie, Certaines des bénéfices médicinaux de l'arbre ont déjà été exploitées.

L'arbre de chêne est perçu comme l'un des arbres les plus importants et impressionnants à l'échelle mondiale au total, on compte plus de 300 espèces de ces majestueux géants forestiers (Charef, 2011).

2. Répartition géographique du chêne

Le chêne s'étend dans l'hémisphère Nord, des régions tropicales aux confins septentrionaux des zones tempérées. Il occupe une variété d'habitat, depuis les régions arides comme le Nord de l'Afrique et Californie (USA) jusqu'aux zones tropicales humides la Colombie, Amérique centrale, sans oublier les zones tempérées comme l'Europe, Amérique du Nord et Asie centrale. Dans les régions méditerranéennes tel que l'ALGERIE, la richesse spécifique est supérieure à celle des zones tempérées (Kremer et al., 2002).

3. Présentation générale de chêne : Genre *Quercus* sp

3.1 Taxonomie

Selon Cronquist (1981) la classification de genre *Quercus* sp est :

Règne : Plantea

Sous règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnolipsida

Sous-classe : Hamamelidae

Ordre : Fagales

Famille : Fagaceae

Genre : *Quercus*

Espèce : *Quercus.sp*

3.2Description générale

Le genre *Quercus* sp est communément appelé chêne englobe plusieurs centaines d'espèces de 200 à 600 a émergé durant le réchauffement climatique il y a environ 55 millions d'années. Il représente l'un des genres les plus vastes de plantes ligneuses à fleurs. (Maldonado-Alconada et al., 2022).

En Algérie, on trouve plusieurs espèces de chênes, parmi lesquelles cinq sont particulièrement remarquables : *Quercus suber*, *Quercus ilex*, *Quercus faginea*, *Quercus afares* et *Quercus coccifera* (Sebti, et al., 2021). Plus précisément, le chêne liège (*Quercus*

suber L.) et le chêne vert (*Quercus ilex* L.) sont les espèces de chênes les plus communes et les plus douces que l'on peut observer dans le pays (Charef, 2011).

Toutes les espèces produisent un fruit largement reconnu, communément appelé « gland ». On dirait que l'origine du mot « ballout » est liée à celle du chêne vert (Sebti, et al., 2021).

3.2.1 Les glands de *Quercus* sp

3.2.1.1 Définition

Le gland, un akène comestible, est un fruit sec pouvant présenter différentes formes telles qu'ovoïde, sub-sylindrique ou globuleuse. Il fait partie de l'alimentation humaine, notamment sous forme de poudre utilisée pour la fabrication du pain ou comme substitut du café après torréfaction. De plus, il est employé dans la préparation d'un plat traditionnel, le couscous (Sebti, et al., 2021).

Les glands de différentes espèces de chênes ont été consommés presque partout dans le monde par les populations de chasseurs-cueilleurs vivant dans les zones tempérées, et cet usage a perduré jusqu'à l'époque moderne, où les glands servaient d'aliment complémentaire en période de disette (Broussaud, 2002). Ces fruits sont systématiquement riches sur le plan nutritionnel, ce qui explique leur utilisation comme source alimentaire secondaire pour l'homme (Vinha et al., 2016).

3.2.1.2 Toxicité

Les glands de *Quercus.sp* peuvent être plus ou moins gros et plus ou moins bons, mais tous sont comestibles une fois débarrassés de leurs tanins.

Les glands sont toxiques pour l'homme lorsqu'ils sont consommés en grandes quantités : ils produisent des douleurs abdominales, des troubles digestifs et des maux de tête.

Certains seront très doux, avec une très faible teneur en tanins ils n'auront presque pas besoin d'être cuits à grandes eaux, ce sont les meilleurs, d'autres très amers (Broussaud, 2002).

II. Généralités sur la fermentation

1. Définition

La fermentation est un processus métabolique naturel et ancien qui permet aux micro-organismes d'extraire de l'énergie des composés organiques sans nécessiter d'oxydant externe. Ce phénomène joue un rôle crucial dans la décomposition de la matière organique et est largement utilisé comme technologie alimentaire. En s'appuyant sur l'activité biologique des micro-organismes, la fermentation génère divers métabolites qui inhibent la croissance des microflore indésirables, améliorant ainsi la sécurité et la conservation des aliments.

Au-delà de la simple conservation, elle enrichit également la valeur nutritive des produits et améliore leurs qualités organoleptiques (**Karovičová et Kohajdová, 2007**).

2. Les aliments fermentés

La diversité des communautés microbiennes présentes dans les aliments fermentés est impressionnante. De plus, ces produits offrent aux consommateurs des bénéfices supplémentaires par rapport aux aliments non fermentés, notamment en termes de valeur nutritionnelle et d'effets positifs sur la santé (**Sharma et al., 2020**).

On peut diviser les aliments fermentés en six groupes : les produits laitiers fermentés (fromages, laits et beurres fermentés, yaourts), carnés (viande), céréaliers, ceux à base de poisson, les légumes/légumineuses fermentés et enfin les fruits fermentés (tableau 1) (**Penland, 2020**).

Tableau 1 : Exemples d'aliments fermentés (Penland, 2020)

Aliments fermenté	catégories	Groupes microbiens	Fermentation majeure
Pain	Céréales (blé)	Levures	Alcooliques
vin	Boissons fermenté (fruits)	Levures , bactéries lactiques	Alcoolique, malolactique
vinaigre	Fruits (raisins , pomme)	Bactéries acétiques	Acétiques
Yaourt	Lait	Bactéries lactiques	Lactiques
Kimchi	Légumes) (chou, oignons)	Bactéries	Lactiques
Pastirma	Carnés (viande de bœuf)	Bactéries lactiques	Lactique

3. Différents types de fermentations

3.1 Fermentation alcoolique

La fermentation alcoolique est un processus de transformation biochimique qui convertit les jus de fruits ou toute autre solution sucrée en vin par l'action principale des levures, notamment *Saccharomyces cerevisiae*, faisant intervenir des phénomènes physiques, biochimiques et biologiques complexes (Mounir et al., 2016). Telles qu'une élévation de la température, une altération du parfum et du goût, une réduction de la densité et une expansion des volumes (Burillard et al., 2016).

3.2 Fermentation Malolactique

La fermentation malolactique correspond à la transformation enzymatique de l'acide L-malique en acide L-lactique et du CO₂ dans le vin. Ce processus survient habituellement après la fermentation alcoolique, toutefois, il peut aussi se dérouler en même temps. Elle se déroule sur une période plus longue, mais avec une intensité inférieure à celle de la fermentation alcoolique (Bastard, 2015).

Les bactéries lactiques appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Pediococcus* et *Oenococcus* déclenchent le processus de fermentation malolactique mais le genre de *Oenococcus oeni* est l'organisme bactérien prédominant dans le vin (Eicher, 2024).

La fermentation malolactique est essentielle pour définir la qualité finale de la majorité des vins, car elle contribue à la stabilisation microbiologique du produit final (Bastard, 2015).

➤ Le vin

La production du vin, repose principalement sur deux types de fermentations successives : la fermentation alcoolique et la fermentation malolactique (Gosset, 2022).

Le vin est une boisson alcoolisée obtenue à partir le jus de raisin. Ce processus est appelé vinification qui est un ensemble de processus élaborés pour convertir le raisin en vin, impliquant des levures et des bactéries. Ces micro-organismes se trouvent naturellement sur la peau du raisin, dans les cuves et les fûts, sur l'intégralité du matériel employé durant le processus de vinification. (Bastard, 2015).

Le jus de raisin est riche en sucres ainsi qu'en nutriments essentiels à la prolifération des micro-organismes ; il représente donc un environnement favorable à la reproduction de divers microorganismes (Leborgne, 2022).

3.3 Fermentation acétique

La fermentation acétique est l'oxydation de l'éthanol en acide acétique, mais ce n'est pas une fermentation au sens strict du terme, car elle exige la présence d'oxygène. Elle est principalement effectuée par la bactérie *Acétobacter*, une bactérie aérobie, ce qui justifie le besoin d'oxygène pour accomplir la réaction chimique (Durand et al., 2022).

En général, tous les boissons alcoolisées fermentés tels que le vin, la bière et le cidre, ont tendance à tourner au vinaigre lorsqu'ils sont exposés à l'air, particulièrement durant la saison estivale (Pasteur, 1864).

- **La vinaigre :** L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et la Food & Agriculture Organisation (FAO) définissent le vinaigre comme une boisson destinée à la consommation humaine, élaborée à partir de matières contenant de l'amidon ou des sucres simples, grâce à un processus de double fermentation (alcoolique et acétique) (Figure 1) (Burlion et Ameno, 2023).

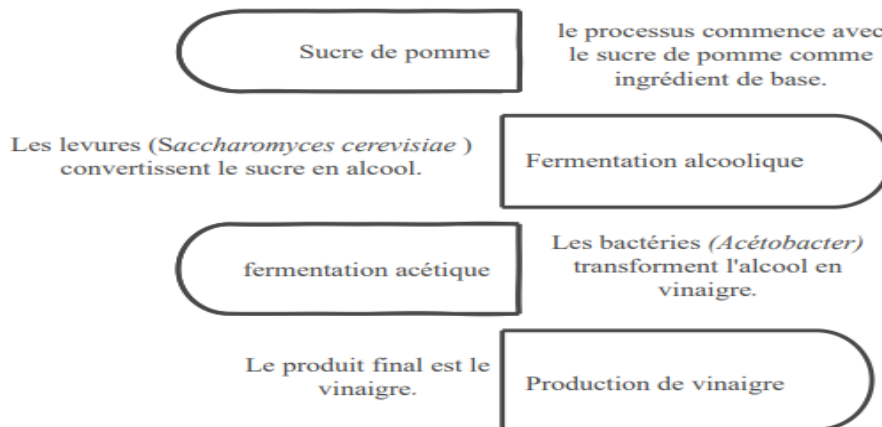


Figure 1 : Schéma représentatif de la relation entre la fermentation alcoolique et acétique (Burlion et Ameno, 2023)

3.4 Fermentation propionique

La fermentation propionique fait appel à une large gamme de substrats tel que le sucre, le glycérol, l'acide lactique et l'acide malique. Dans la fromagerie, la fermentation propionique utilisant l'acide lactique comme substrat a une grande importance. Ce sont les bactéries du genre *Propionibacterium* qui en sont les responsables (Burillard et al., 2016). Elles transforment les lactates générés par les bactéries lactiques principalement en dioxyde de carbone, acétate, propionate et succinate (Richoux et Kerjean, 1995).

3.5 Fermentation butyrique

La fermentation butyrique, principalement réalisée par des bactéries anaérobies du groupe *Clostridium*, en particulier *C. tyrobutyricum*, convertit le glucose en acide butanoïque, dioxyde de carbone et hydrogène. Bien que cette fermentation soit naturelle, elle est généralement non souhaitée dans la fabrication du fromage (Munier, 2023).

➤ Fromage

Les bactéries propioniques ont un rôle essentiel dans le processus d'affinage des fromages à pâte dure. Leur prolifération dans la pâte fromagère est attribuée à leur association avec des bactéries lactiques (Czarnocka-Roczniakowa et al., 1972).

Les agents responsables de la fermentation butyrique peuvent entraîner des défauts organoleptiques tels qu'une saveur piquante et une odeur de rancissement, ainsi que la formation de cavités gazeuses dans les fromages à pâte cuite (Munier, 2023).

3.6 Fermentation lactique

La fermentation lactique désigne le processus de modification du lactose présent dans le lait en acide lactique, réalisé par des micro-organismes spécifiques connus sous le nom de bactéries lactiques. Elle entraîne des changements biochimiques, physico-chimiques et organoleptiques dans le produit (**Béal et Sodini, 2019**).

Durant ce processus, les bactéries lactiques ont la capacité de générer divers métabolites bioactifs tels que des amines biogènes, des exopolysaccharides et des peptides issus de la protéolyse. Parmi ces derniers, on compte les bactériocines, qui sont de petites molécules antimicrobiennes produites par les ribosomes et contre lesquelles l'espèce productrice est immunisée. Ces bactériocines exercent une action soit bactéricide soit bactériostatique sur d'autres bactéries (**Hill et al., 2017**).

➤ Yaourt

Le yaourt est généralement défini comme un produit laitier cultivé à base de *Streptococcus thermophilus* et de *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus*, certains aliments fermentés, en particulier le yaourt et d'autres produits laitiers fermentés, peuvent également contenir des espèces probiotiques de *Bifidobacterium* et de *Lactobacillus*. Les bactéries présentes doivent être encore vivantes au moment de la consommation du yaourt, ce qui permet une meilleure digestion et un meilleur transit (**Burillard et al., 2016**).

III. Généralités sur Les bactéries lactiques

1. Définition

Les bactéries lactiques (BL) sont des cellules vivantes, procaryotes, Certaines d'entre-elles constituent des homofermentaires, puisqu'elles produisent l'essentiel de l'acide lactique en condition anoxie (excluant la présence d'oxygène); d'autres se disent par contre hétérofermentaire, et confient la production d'acide lactique ainsi d'autres acides organiques et d'autres substances (CO₂, acétate, éthanol...)(**Tahar Berrabah et Tahar Berrabah, 2020**).

Les bactéries lactiques se trouvent fréquemment dans la nourriture, soit parce qu'elles y pénètrent naturellement, soit parce qu'elles sont incorporées lors du processus de transformation et elles jouent un rôle crucial dans les techniques de préservation des aliments (**Sionek et al., 2024**).

Les bactéries lactiques sont responsables de la fermentation des produits alimentaires, c'est pourquoi on les appelle aussi 'ferments lactiques' ou 'levains' ou encore 'starters' (**Badis, 2005**).

2. Classification

Les bactéries lactiques sont classées dans le phylum des Firmicutes, Classe : Bacilli, Ordre : Lactobacillales qui comprend 6 familles : Streptococcaceae, Enterococcaceae, Carnobacteriaceae, Lactobacillaceae, Leuconostocaceae et Aerococcaceae (**Bouguerra, 2021**).

Elles regroupent 12 genres bactériens dont les plus étudiés sont *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium* et *leuconostoc* (Figure 2 ; Tableau 2) (**Bermúdez-Humarán et Langella, 2009**).

De façon classique, les bactéries lactiques ont été catégorisées selon leurs caractéristiques phénotypiques, comme la morphologie, façon de fermenter le glucose, développement à diverses températures, configuration lactique et la fermentation de différents glucides (**Holzappel, 2001**).

Durant les années 1990, l'évolution des méthodes moléculaires a permis une caractérisation plus approfondie des bactéries lactiques. En général, elles affichent une faible concentration en bases azotées ; la guanine et cytosine inférieure à 50 mol %, bien que certains lactobacilles aient été notés pour atteindre jusqu'à 57 mol % (**Bouguerra, 2021**).

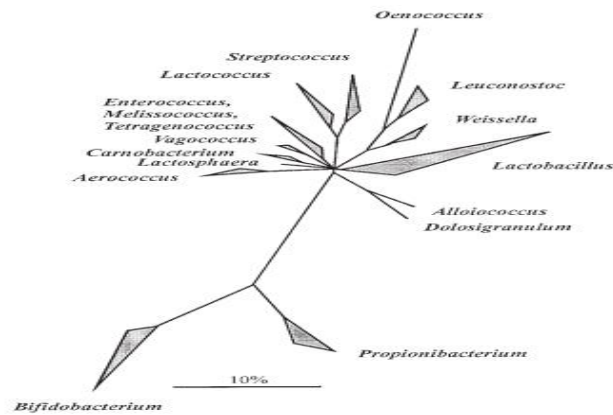


Figure 2 : Arbre phylogénétique des bactéries lactiques (Bouguerra, 2021)

3. Les caractéristiques des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes Gram positifs, non sporogènes, catalase-négatifs, sans cytochrome et de nature non aérobique ; bien qu'ils tolèrent l'aérobie ; ils ont des exigences spécifiques et sont acido-tolérants et strictement fermentatifs, leur produit principal de fermentation du sucre est l'acide lactique (Holzapfel, 2001).

Elles constituent un groupe varié de coques et de bacilles, dont la production d'acide lactique par fermentation des sucres est la caractéristique principale (Badis, 2005).

Tableau 2 : les caractéristiques différentielles des principales bactéries lactiques (Hammes et Vogel, 1995; Carr et al., 2002; Abella, 2006; Yakoob et Pradeep, 2019 ; ; ; Hadeef, 2012).

LB \ Aspect	<i>lactobacillus</i>	<i>streptococcus</i>	<i>leuconostoc</i>	<i>bifidobactérium</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Enterococcus</i>
Forme	bâtonnet ou coccobacille	Cocci	Cocci	Bacilles forme très irrégulière	Cocci	Cocci
T°	30 -45°	35 -45	18 -37	37-41°	10 °-30°	10-45°
Ph optimal	5.5 – 6.5	6.5-7	5.5 -6.2	6.5 - 7	6.5-7	6-7.5
Type fermentaire	Homo/hétéro	Homo-fermentaire	Hétéro-fermentaire	Hétéro-fermentaire	Homo-fermentaire	Homo-fermentaire

Mobilité	-	-	-	-	-	-
----------	---	---	---	---	---	---

4. Les voies fermentaires des bactéries lactiques

Selon le produit final de leur fermentation, les bactéries lactiques sont classées en homofermentaires obligatoires, hétérofermentaires obligatoires (**Sionek et al., 2024**).

4.1 Voie homofermentaire

Les homofermentaires génèrent principalement de l'acide lactique lors de la fermentation du glucose (**Sionek et al., 2024**).

Les genres *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* et *Pediococcus* sont parmi les genres de bactéries lactiques homofermentaires (**Fessard, 2017**).

4.2 Voie hétérofermentaire

Les hétérofermentaires génèrent divers produits en plus de l'acide lactique, y compris du dioxyde de carbone, de l'acide acétique et de l'éthanol, suite à la fermentation du glucose (**Sionek et al., 2024**).

Les genres *Leuconostoc*, *Weissella*, *Oenococcus* ainsi que certaines espèces de *Lactobacillus* font partie des bactéries hétérofermentaires (**Fessard, 2017**).

IV. Les probiotiques

1. Définition

Les probiotiques sont des micro-organismes vivants ; lorsqu'ils sont administrés en quantités appropriées ; apportent un avantage à la santé de l'hôte (Coudeyras, 2010).

Au fil des dernières décennies, plusieurs définitions ont été proposées, La définition qui se démarque est la suivante : les probiotiques sont des préparations contenant des microorganismes et leurs métabolites, utilisés en tant qu'additifs alimentaires qui peuvent être incorporés dans divers produits, tels que les denrées alimentaires, les médicaments et les compléments nutritionnels (Smoragiewicz et al., 1993 ; World Gastroenterology Organisation, 2011).

2. Les principaux rôles des probiotiques

Les arguments cliniques les plus solides en faveur des probiotiques se concentrent sur leur utilisation pour favoriser la « santé intestinale » et renforcer l'activité immunitaire (World Gastroenterology Organisation, 2011).

Les probiotiques doivent également être capables à survivre et à se multiplier dans des environnements naturels où vivent des bactéries nuisibles (Makhloufi, 2011). Ils représentent une option pour prévenir ou soigner la diarrhée liée à l'utilisation d'antibiotiques (Graf, 2007).

3. Les espèces considérées comme des probiotiques

On a souvent recours aux espèces de Lactobacillus et Bifidobacterium en tant que probiotiques, néanmoins, certaines levures comme Saccharomyces cerevisiae et quelques espèces de *E. coli* et *Bacillus* sont aussi employées dans ce but (Tableau 3).

Les bactéries lactiques, telles que certaines espèces de Lactobacillus, utilisées pour la conservation alimentaire par fermentation depuis des millénaires, peuvent assumer une double fonction en tant qu'agents de fermentation alimentaire et comme alliés bénéfiques pour la santé (World Gastroenterology Organisation, 2011).

Tableau 3 : les principales espèces de bactéries lactiques à activité probiotique (Hadeb, 2012)

Espèces de lactobacillus		
<i>Lb.acidophilus</i>	<i>Lb.gasseri</i>	<i>Lb.paracasei</i>
<i>Lb.amylovorus</i>	<i>Lb.johnsonni</i>	<i>Lb.Rhammosus</i>
<i>Lb.crispatus</i>	<i>Lb.casei</i>	<i>Lb.Plantarum</i>
Espèces de bifidobacterium		
<i>Bf.lactis</i>	<i>Bf.animalis</i>	<i>Bf.infantis</i>
<i>Bf.Longum</i>	<i>Bf.bifidum</i>	<i>Bf.Breve</i>
<i>Bf.adolescentis</i>		
Autres bactéries lactiques		
<i>Lc.lactis</i>	<i>St.diacetylactis</i>	<i>En.faecalis</i>
<i>Ln.mesenteroides</i>	<i>St.Intermedius</i>	<i>En.faecium</i>
<i>P.aciddilactici</i>	<i>St.thermophilus</i>	

4. Les effets des probiotiques sur la santé

Le scientifique Elie Metchnikoff a testé les impacts positifs des ferments lactiques sur la flore intestinale et de manière plus générale sur la longévité (Figure4) (Quimeby, 2024).

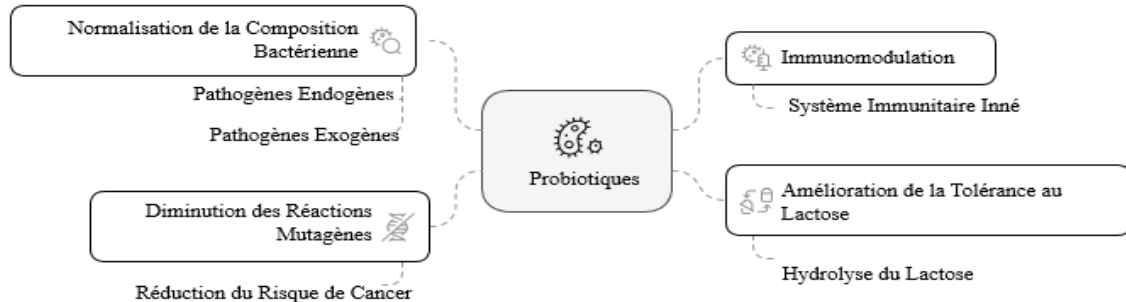


Figure 4 : les bienfaits des probiotiques sur la santé (Poupet, 2020)

L'absorption du lactose est améliorée chez les individus déficients en lactase par la consommation de lait ou de yaourts probiotiques enrichis et cela diminue les symptômes associés à l'intolérance au lactose. Les probiotiques ont aussi un rôle primordial dans la gestion des processus inflammatoires liés aux affections intestinales comme la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse. En interagissant avec les cellules immunocompétentes, ils régulent la réaction immunitaire grâce à leurs éléments actifs, en encourageant des réponses humorales et cellulaires appropriées, tout en provoquant la tolérance orale afin d'éviter les allergies (Guertarni, 2007).

Ils fonctionnent principalement dans le côlon, où ils affectent directement ou indirectement la flore intestinale, aidant à préserver l'équilibre entre la santé et la maladie en supprimant les microbes nuisibles et en stimulant le système immunitaire de l'intestin (Mathieu, 2015).

4. Les critères de sélection des probiotiques

Les caractéristiques des probiotiques peuvent varier en fonction de l'espèce ou de la souche microbienne. Il est primordial d'identifier le type et l'espèce de la souche employée, car les effets probiotiques sont propres à chaque souche microbienne (Figure 5) (Hadeef, 2012).

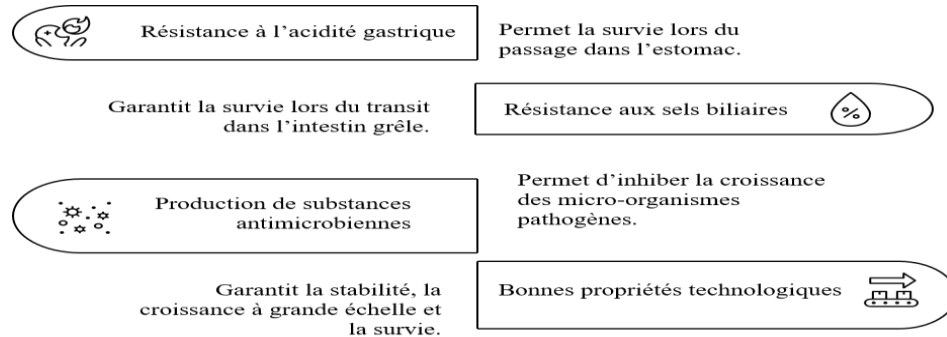


Figure 5 : schéma modifié représentatif des principaux critères pour la sélection des probiotiques. (Hadeef, 2012)

➤ **Résistance à l'acidité gastrique**

La production d'acide gastrique dont le Ph varie entre 1 et 3 représente un élément de protection crucial contre l'envahissement du système digestif par des bactéries, qu'elles soient pathogènes ou non. Néanmoins, la résistance à l'acide varie considérablement entre les micro-organismes, et certains réussissent à survivre totalement ou partiellement après leur traversée de l'estomac (**Flourié et Nancey, 2007**).

La capacité à résister à l'acide sera ainsi un critère déterminant pour le choix des probiotiques capables d'ajuster l'activité de certaines de leurs enzymes pour survivre lors de leur transit par le tube digestif (**Hamelin, 2021**).

➤ **Résistance aux sels biliaires**

Les hydrolases de sels biliaires (BSH) sont généralement des enzymes situées à l'intérieur des cellules de la bile, qui ne sont pas affectées par l'oxygène et catalysent l'hydrolyse des sels biliaires. On a souvent identifié et caractérisé plusieurs BSH chez les bactéries probiotiques, et la capacité de ces souches à produire des BSH est fréquemment utilisée comme critère de sélection pour l'identification des souches probiotiques (**Belhamra, 2018**).

➤ **Résistance par la production des substances antimicrobiennes**

Des bactéries probiotiques ont généré diverses substances antimicrobiennes. Ces composés incluent des acides gras de courte chaîne, des bactériocines, du peroxyde d'hydrogène, entre autres. Ces composés possèdent la faculté de concurrencer avec les microbes de l'intestin et par conséquent d'empêcher la prolifération des bactéries nuisibles. (**Yakoob et Pradeep, 2019**).

➤ **Bonnes propriétés technologiques**

Pour être utile, un probiotique doit être stable et résistant dans les aliments ou boissons, capable de se reproduire après avoir traversé l'estomac et capable d'atténuer les effets des microorganismes nuisibles ou libérer des métabolites susceptibles de freiner la prolifération de bactéries dommageables (**Bene, 2023**).

Matériels et méthodes

L'objectif principal de cette étude est l'obtention d'un lot de bactéries lactiques à potentiels probiotique et biotechnologique par l'isolement et la caractérisation de bactéries à partir du milieu de fermentation des glands. Cette étude a été réalisée au sein du laboratoire de microbiologie de l'Ecole Normale Supérieure de Kouba. Le travail s'est déroulé durant la période du 11 mars au 29 mai 2025.

1. Matériel

1.1. Matériel non biologique

Le matériel non biologique, y compris l'appareillage, la verrerie, et les milieux de culture sont consignés en annexe 3.

1.2. Matériel biologique

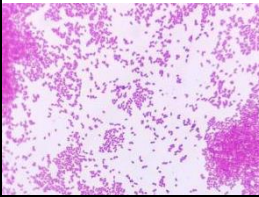
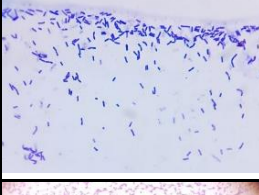
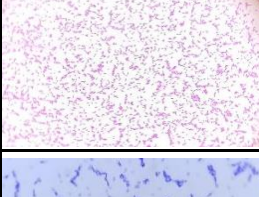
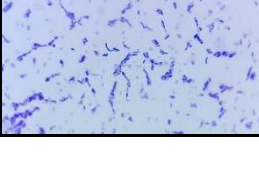
1.2.1. Glands

Cette recherche s'est basée sur des glands doux de *Quercus ilex* ramassés dans les montagnes de Babour au niveau de la wilaya de Jijel.

1.2.2. Souches pathogènes cibles

Nous avons utilisé quatre souches pathogènes pour les tests d'antagonisme avec les souches de bactéries lactiques isolées. Les souches pathogènes cibles ont été choisies et ré-identifiées parmi une collection de germes fournis par le laboratoire de microbiologie de l'ENS de KOUBA.

Tableau 4 : Souches de bactéries pathogènes choisies et ré-identifiées pour les test d'antagonisme

Souches pathogènes	Gram	Observations microscopiques
<i>Escherichia coli</i>	Gram -	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Gram +	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram -	
<i>Bacillus subtilis</i>	Gram +	

2. Méthodes

2.1. Fermentation des glands

Dans un récipient cylindrique, en plastique, d'une capacité 20 L, 5 Kg de glands doux de chaine vert (*Quercus ilex* L.) ont été mis à fermenter en ajustant le volume avec de l'eau de source naturelle. Le récipient a été fermé hermétiquement avec son couvercle. Après 3 mois, un échantillon de 500 ml de liquide avec quelques glands ont été prélevés ensuite conservés au réfrigérateur entre 4 et 7 °C pour les essais d'isolement.

2.2. Préparation des dilutions décimales

Dans des conditions aseptiques, 1ml de liquide de fermentation a été prélevé à partir de l'échantillon et ajouté à 9 ml d'eau distillée stérile ; ensuite bien homogénéiser pour obtenir la première dilution décimale, 10^{-1} . Refaire l'opération à partir de ce tube pour obtenir une dilution de 10^{-2} et poursuivre avec d'autres dilutions jusqu'à 10^{-6} .

2.3. Qualité microbiologique

Une évaluation microbiologique qualitative du liquide de fermentation a été réalisée. Pour cela, 100 µl de la solution mère ont étéensemencés dans des conditions d'aspect aseptique sur des milieux de culture sélectifs dans la recherche de germe de contamination et pathogènes (tableau 2.1). L'incubation des cultures est réalisée dans une étuve à 37 °C.

Tableau 2.2 : germes recherchés dans le contrôle de la qualité microbiologique du liquide de fermentation

Germes recherchés	Milieux de culture	Ensemencement
Flore Mésophile Aérobie Totale (FMAT)	Gélose nutritive	En surface
Staphylococcus aureus	Chapman	En surface
Germes anaérobies	Viande Foie	En profondeur
Moisissures et levures	Sabouraud	En surface

2.4. Isolement des bactéries lactiques

2.4.1. Mise en culture

Une quantité de 1000µl de chaque dilution a été étalé sur la surface de gélose MRS (Man de Rogosa Sharpe) ou M17 contenu dans une boîte de Pétri à raison de quatre répétitions. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 48h : deux en aérobiose et deux en anaérobiose.

2.4.2. Dénombrement

L'approche utilisée permet de compter les microorganismes viables, c'est-à-dire, ceux qui ont la capacité de se reproduire dans les milieux de culture utilisés, selon les conditions de croissance établies (température, oxygène, humidité, lumière, etc.). (Marchand et al., 2011).

La technique de comptage permet de mesurer avec précision le nombre de bactéries sur la surface des boîtes de comptage. Elle devrait être adéquate pour répondre à l'écart de confiance (30 - 300) exigé pour le dénombrement en UFC (unités formant colonies) par millilitre d'échantillon. Selon l'équation suivante :

$$N = \frac{\sum C}{V(n1+0.1n2)d} \text{ (UFC/ml)}$$

$\sum C$ = somme des colonies sur les deux boîtes.

$n1$ = nombre de boîtes à la dilution la plus faible (moins diluée).

$n2$ = nombre de boîtes à la dilution suivante .

V = volumeensemencé (1 ml).

D = facteur de dilution la plus faible retenue.

2.4. 3. Purification

Pour obtenir des colonies distinctes, homogènes et pures, plusieurs repiquages ont été réalisés sur des géloses. Le processus de purification des souches impliquait leur ensemencement en stries sur des boîtes de Pétri remplies de milieux MRS ou M17 solides (**Karam et Karam, 2006**).

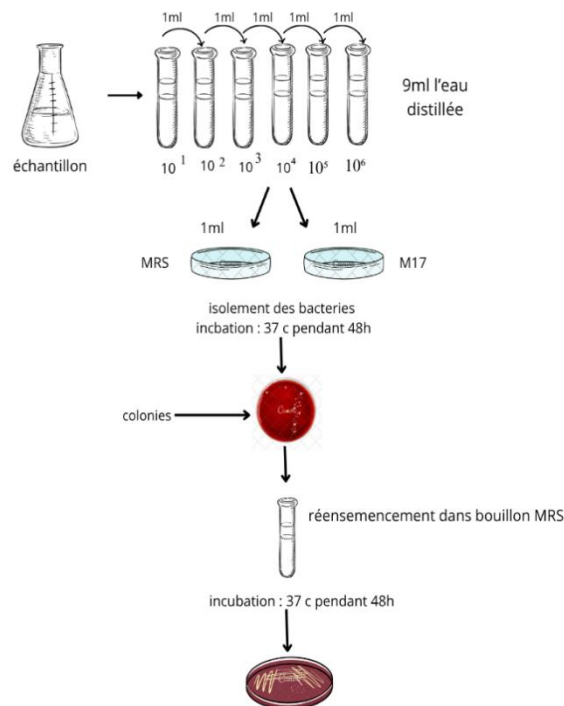


Figure 6 : Protocole d'isolement et purification des bactéries lactiques.

2.5. Pré-identification phénotypique et sélection des bactéries lactiques

L'identification des souches de bactéries lactiques a été réalisée à travers l'analyse de divers tests morphologiques et physiologiques. Cette procédure a été effectuée sur des colonies distinctes de 48h (**Badis et al., 2004**).

2.5.1. Etude morphologique des bactéries lactiques

Cette étude est basée sur l'observation macroscopique et microscopique

-Observation macroscopique

La morphologie de la colonie est observée sur le milieu solide (MRS ou M17). Il s'agit d'un contrôle visuel qui vise à identifier les paramètres suivants :

- La forme des colonies : circulaires, arrondies, allongées, érodées
- Le contour : régulier ou irrégulier,
- L'opacité : opaque, translucide ou transparente,
- L'élévation : convexes, concaves, plates, ou à centre élevé
- La surface : lisse, rugueuse, sèche ou dentelée.
- La taille : grande, moyenne ou petite.

- Observation microscopique

La micromorphologie des bactéries isolées est principalement observée et caractérisée après application de la coloration de Gram.

Coloration de Gram

- La coloration de Gram est une technique de colorant différentiel qui aide à identifier deux catégories de bactéries : les Gram positif et les Gram négatif. Les bactéries Gram positif se lient de manière indissociable au violet de gentiane. Suite à une exposition à l'alcool acétone, elles se révèlent bleu-violet, tandis que les bactéries Gram négatif prennent une teinte rouge-rose (**Zayukua et al., 2019**).
- Elle offre également la possibilité d'examiner la morphologie des bactéries (formes allongées pour les bacilles et formes arrondies pour les Cocci) (**Astier-Théfenne et al., 2014**).
- **Les étapes de coloration de Gram selon Mariko (2005) :**
 - Sur une lame, déposez une goutte d'eau saline pour préparer la suspension bactérienne à partir d'une culture pure qui sera étalée en couche fine.
 - **Fixation** : Le frottis, une fois séché à l'air libre, est fixé en le passant sur la flamme d'un bec Bunsen (ce qui permet de tuer les bactéries, de fixer leur structure cytologique et de les faire adhérer à la lame).
 - **Coloration primaire** : Appliquez sur ce frotti quelques gouttes de violet de gentiane et laissez agir pendant une minute, puis rincez à l'eau.
 - **Mordantage** : Puis, appliquez quelques gouttes de Lugol, laissez agir pendant 30 secondes à une minute, et rincez ensuite à l'eau.
 - **Décoloration** : Il suffit d'appliquer quelques gouttes d'alcool sur la surface de la lame positionnée en biais et de laisser agir pendant 20 à 30 secondes. Rincez largement à l'eau.

- **Contre-coloration :** Appliquez quelques gouttes de fuchsine sur le frotti, puis laissez agir entre 30 secondes et 1 minute avant de rincer délicatement à l'eau distillée. Séchez la lame sur une platine chauffée à 50 °C.
- **Observation :** Après le processus de séchage, nous avons procédé à l'observation au microscope : Examinez avec une goutte d'huile à immersion en utilisant un objectif 100 (grossissement $\times 100$). Cet examen nous a permis de déterminer la morphologie des bactéries, leur groupement et leur type de Gram.

2.5.2. Test de catalase

L'examen de catalase permet d'identifier l'enzyme catalase présente dans les bactéries (**Reiner, 2010**).

Les micro-organismes génèrent des enzymes, comme la catalase qui participe à la décomposition du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène gazeux. Ce processus peut être vérifié par l'apparition de bulles de gaz. Les bactéries lactiques sont généralement catalase négative.

Le processus est décrit ci-dessous :



Sur une lame de microscope, installée dans une boîte de Pétri, a été déposée une colonie, soigneusement prélevée à partir de milieu MRS et M17 à l'aide d'une anse de platine. Ensuite, une goutte de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à 3% a été versée sur la colonie en utilisant une pipette Pasteur.

La formation immédiate de bulles confirme le résultat positif du test. L'apparition de quelques bulles signale une réaction faible. Un test négatif se manifeste par l'absence de bulles ou par une apparition sporadique de quelques bulles au bout de 20 secondes (**Khatoon et al., 2022**).

2.5.3. Autres Tests Physiologiques et Biochimiques

A/ Croissance à différentes températures

Ce test est important car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles et la capacité de croître dans des variations de température (**Bouchibane, 2022**). L'expansion à diverses températures a été établie dans les bouillons MRS et M17 à 10 °C, 37 °C et 45 °C pendant 24 à 48 heures (**Kihal et al., 2009**).

B/ Test de salinité

La croissance des isolats en présence de 4 et 6,5 % de NaCl a été effectuée dans un bouillon MRS pendant 5 jours (**Guessas & Kihal, 2004**).

La croissance des isolats purs en présence de NaCl, est principalement utilisée pour distinguer le genre *Enterococcus* des autres genres lactiques. L'apparition d'un trouble bactérien est un indicateur de croissance (**Saidi, 2020**).

C/ Test de lait de Sherman

Le test de lait de Sherman permet de démontré la capacité des bactéries à se développer en présence de bleu de méthylène, qui apparaît bleu en milieu fortement oxydant et incolore en milieu réducteur. Chaque culture à évaluer a étéensemencée dans le lait écrémé avec du bleu de méthylène à 0,1% et à 0,3%.

Suite à une incubation à 37°C pendant 24 à 48 heures, on consigne les observations concernant la diminution du bleu de méthylène et la coagulation du lait (**Benreguieg, 2015**).

D /Test de pH

Ce test permet de différencier les genres des bactéries lactiques selon leur intervalle de pH (**Badis et al., 2005**).

Le bouillon MRS est ajusté à différents pH (4,8 et 9,6) avec des de solution de NaOH ou d'HCl 1N et 0,1N, puis stérilisé. Des tubes contenant 5 ml de milieu sont inoculés avec les souches isolée sur les milieu MRS et M17 (**Guessas et Kihal, 2004**).

E/ Type fermentaire

Ce test permet d'apprécier le type de métabolisme par lequel le substrat carboné est transformé. Il permet de mettre en évidence le CO₂ produit dans le milieu.

La méthode consiste à ensemencer des tubes à essai contenant le bouillon MRS ou M17 (dépourvu de préférence de glucose) avec cloche de Durham qui sont inoculés par les différents isolats purs incubés à 37 °C pendant 48 h. La production de gaz se manifeste par la montée de la cloche et l'apparition de bulles d'air. Les isolats qui ont produit du gaz dans les cloches ont été notés hétérofermentaires ; les autres isolats sont homofermentaires (**Saidi, 2020**).

F/ Production d'acétoïne

La production d'acétoïne (acétyl-méthyl-carbinol) est examinée sur des milieux Clark et Lubs. La culture des souches dans cet environnement permet la réalisation de la réaction de Voges-Proskauer (traduit par un test VP⁺, lié à l'apparition de l'acétoïne dans le milieu) (**Saidi, 2020**). Chaque tube est exposé à une culture à inspecter. Après une incubation de 24 à 48 à 37°C. Nous avons incorporé 5 gouttes des deux composés du Réactif VP (VP₁ et VP₂) dans chaque tube présentant une croissance positif, suivie d'une agitation. Une teinte rose après 10 minutes signale la présence d'acétylméthylcarbinol. Cette substance se transforme en acétoïne sous l'action de la soude (VP_{II}) et crée un complexe rouge lorsqu'elle se combine à l'a-naphtol (VP_I) (**Hadef, 2012**).

2.6. Aptitudes probiotiques des bactéries lactiques isolées

2.6.1. Résistance aux conditions gastro-intestinales

A/ Tolérance à l'acidité

Ce test permet de savoir si les souches isolées tolèrent l'acidité de l'estomac et peuvent survivre ; le bouillon MRS est ajusté à Ph 3 par HCl et puis inoculé avec les souches ; Car le pH 3 constitue le niveau idéal et approprié pour la sélection des souches probiotiques (Azat *et al.*, 2016).

B/ Tolérance aux sels biliaires

Le test porte sur la capacité des isolats de bactéries lactiques à persister, à croître et de caractériser la tolérance maximale aux sels biliaires, permettant d'identifier les souches les plus adaptées aux applications alimentaires ou thérapeutiques (Hadeif, 2020)

La méthode consiste à la préparation le milieu MRS additionné de 3% de sels biliaires, gélifié, autoclavé puis coulé dans des boîtes pétries. Après la solidification de la gélose, les quatres souches lactiques ont étéensemencés en stries serrées. et ensuite incubé à 37° pendant 24 h à 48 h (Azizi et Bouchicha, 2019).

2.6.2. Evaluation de la sécurité des souches présumées probiotiques

A/ Pouvoir hémolytique

L'activité hémolytique se réfère à la capacité des isolats lactiques de provoquer la destruction des globules rouges chez l'hôte (Ida Muryany *et al.*, 2017).

Pour évaluer l'activité hémolytique, des cultures fraîchement préparées ont été inoculées sur une gélose enrichie de sang humain. Après incubation à 37 °C pendant une durée de 48 heures, d'éventuelles zones d'hémolyse sont observées :

- Zone avec des reflets verdâtres : α -hémolyse ;
- Zones plus claires autour des colonies : β -hémolyse
- Le milieu n'est pas modifié : γ -hémolyse (Maragkoudakis *et al.*, 2006).

B/ Sensibilité aux antibiotiques

Ce procédé définit l'utilisation de la méthode de diffusion des disques d'antibiotiques *in vitro* selon Kirby-Bauer pour tester la sensibilité.

L'objectif est de contrôler la résistance des bactéries face aux antibiotiques couramment utilisés.

La technique de diffusion des disques chargés d'antibiotiques, qui implique la mise en place sur une gélose Mueller-Hinton, colonisée par la souche bactérienne examinée, de disques de papier filtre chargés des antibiotiques à évaluer. Les disques sources diffusent les antibiotiques dans la gélose selon un graduant de concentrations (Rammali, 2022).

Tableau 5 : liste des antibiotiques utilisés dans l'étude de la sensibilité des BL

Antibiotiques	Gentamycine	Chloramphenicol	Fosfomycine	Tetracycline	Pénicilline
Abréviation	GEN	C	FOS	TET	P

Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés afin de déterminer l'aptitude des BL vis-à-vis des antibiotiques testés ; l'activité a été évaluée comme étant sensible, S (≥ 21 mm) ; intermédiaire, I (16-20 mm) et résistante, R (≤ 15 mm) (**Liasi et al., 2009**).

C/ Activité antimicrobiennes des bactéries lactiques

Pour confirmer l'activité antagoniste des souches de bactéries lactiques, nous avons utilisé la méthode des spots (méthode de **Barefoot et Kaenhammer, 1983**).

L'évaluation de l'activité antibactérienne des souches de bactéries lactiques a été effectuée en utilisant des cultures récentes en phase de croissance et ce, vis-à-vis de quatre bactéries pathogènes standards : *Listeria monocytogenes* ; *Escherichia coli* ; *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Les quatre souches ont été déposées en spot sur la gélose MRS, puis incubées à une température de 37 °C pendant une durée de 24 heures. Par la suite, les zones ont été recouvertes de 10 ml de Muller Hinton inoculé avec 10 ml de suspension des bactéries pathogènes puis incubées pendant 24 heures à 37 °C (**Alegría et al., 2010**).

L'activité antimicrobienne est identifiée et évaluée en observant les zones d'inhibition autour des dépôts et en mesurant leurs diamètres (**Alegre, 2009**).

Résultats et discussion

1. Qualité microbiologique

La qualité microbiologique de notre matériel, le liquide de fermentation, a été mise en évidence par l'évaluation de la charge microbienne et par la recherche des microorganismes pathogènes (Tableau 7). Les caractères cultureux et microscopiques de la flore poussée sur chaque milieu sont résumés dans le tableau (8).

Tableau 7 : Caractérisation de la qualité microbiologique du liquide de fermentation.

Germes recherchés	Milieux de culture	Dénombrement UFC/ml
Flore Mésophile Aérobie Totale (FMAT)	Gélose nutritive	10 ² ufc/ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	Chapman	50 ufc/ml, Mannitol ⁺
Germes anaérobies	Viande Foie	+, Gaz ⁻
Moisissures et levures	Sabouraud	> 3.10 ³ ufc/ml

Tableau 8 : Caractères cultureux et microscopiques des flores isolées sur les différents milieux de l'analyse de la qualité microbiologique du liquide de fermentation.

Milieu	Forme et Gram	Observation macroscopique	Coloration de Gram
Chapman	Bacilles/+		
Sabouraud	Bacilles et coques /+		
Gélose nutritive	Bacilles/+		
Viande -Foie	ND		ND

ND : non définis

A partir des résultats des tableaux 7 et 8 :

Une faible charge microbienne (10^2 UFC/ml de milieu GN) et absence des germes pathogènes recherchés notamment ; *S. aureus* ; *clostridium sulfito-réducteurs* ; Sur le milieu Sabouraud une croissance d'un nombre trop élevé (non dénombrable) de colonies a été observée ($> 3.10^3$). Cependant ; l'observation microscopique d'un prélèvement de la nappe obtenue sur ce milieu montre l'absence des levures et moisissures.

Par ailleurs, nous avons observées des bacilles a gram + sur Chapman et GN et des bacilles en plus des Cocci à Gram + sur le milieu Sabouraud.

L'absence des germes pathogènes de contamination, recherchés est probablement due a la compétition et antagonisme exercés par les bactéries lactiques et aux conditions inadéquats qui inhibent les pathogènes notamment le pH et le faible potentiel redox en produisant des acides organiques (comme l'acide lactique et acétique), des bactériocines et du peroxyde d'hydrogène, qui abaissent le pH du milieu et empêchent la croissance des microorganismes nuisibles (Ilesanmi et Eniola, 2023).

2. Isolement, Sélection et Purification des Bactéries Lactiques

2.1. Dénombrement

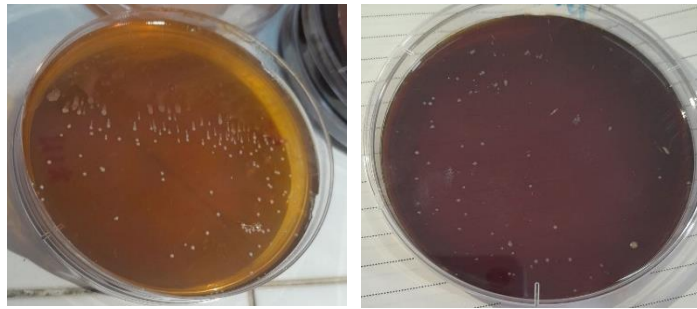
Les boites dénombrées appartiennent aux différentes dilutions de 10^{-3} et 10^{-4} sur les milieux gélosés MRS et M17 ayant présente des nombres dans l'intervalle de confiance de 30 – 300 colonies ont permet de compter $2,4 \times 10^5$ UFC/ml et 2.2×10^5 UFC/ml respectivement ; Ceci signifie que le liquide de fermentation a renferme une flore importante de bactéries présumées être lactiques (Tableau 9).

Tableau 9 : Les résultats de dénombrement des bactéries lactiques isolées sur les milieux gélosés MRS et M17 à partir du milieu de fermentation des glands de chêne vert.

	MRS		M17	
Les dilutions	10^{-3}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-4}
Nbre ufc/ml liquide de fermentation	2.4×10^5 UFC/ml		2.2×10^5 UFC/ml	

2.2 Caractérisation macroscopique

Sur gélose MRS et M17, les isolats sont apparus sous forme de colonies de petite taille, de forme circulaire ou lenticulaire, à pourtour régulier ou irrégulier et de couleur blanchâtre. Dans le bouillon MRS, les souches présentent un trouble homogène qui caractérise le groupe des bactéries lactiques (Figure 7)(Annexe 4).



Milieu MRS

Milieu M17

Figure 6 : observation macroscopique de colonies sur gélose MRS et M17

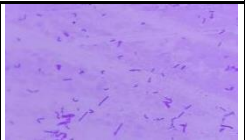
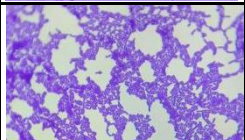
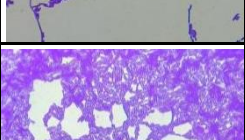
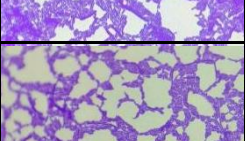
2.3 Caractérisation microscopique

Après coloration de Gram, l'observation microscopique a été faite au grossissement x100 en utilisant l'huile à immersion. Toutes les bactéries sélectionnées pour cette étude sont Gram+ de forme Cocci ou bacilles (Tableau 10).

La présence de formes cocci et bacilles avec une prédominance bacillaire concorde avec celles citées dans plusieurs études menées dans le même contexte (**Bouzaid et al., 2016**) ; mais contrairement aux résultats trouvées par (**Pereira et al., 2019**) qui a obtenu exclusivement des bacilles.

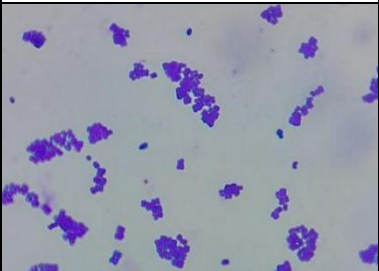
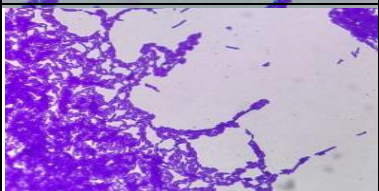
Tableau 10 : Caractéristiques microscopiques des souches obtenues après l'isolement.

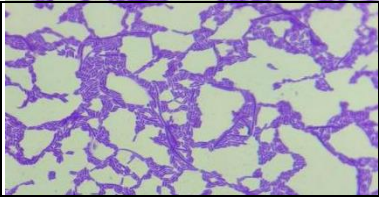
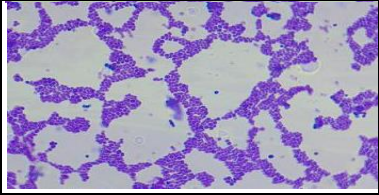
Souches	Milieu	Gram	Catalase	Regroupement	Observation microscopique
BL1	M17	Cocci	-	Isolées, Diploïdes , Amas	
BL2	MRS	Bacilles	+	Isolées, Diploïdes Chaînette	
BL3	M17	Cocci	-	Isolées, Diploïdes Chaînette	
BL4	MRS	Bacilles	-	Isolées, Diploïdes Chaînette	

BL5	MRS	Bacilles	-	Isolées,Diploïdes Chaînette	
BL6	MRS	Bacilles	+	Isolées,Diploïdes Chaînette	
BL7	MRS	Bacille	+	Isolées,Diploïdes Chaînette	
BL8	MRS	Bacille	+	Isolées,Diploïdes Chaînette	
BL9	MRS	Bacille	+	Isolées,Diploïdes Chaînette	

La purification des isolats a été établie par la réalisation des subcultures sur milieu MRS solide par la méthode des stries jusqu'à l'obtention des colonies bien distinctes et homogènes. Une seconde caractérisation microscopique, de confirmation, a été réalisée pour les souches de bactérie lactiques sélectionnées BL1, BL3, /BL4, /BL5 (Tableau 11).

Tableau 11 : Observation microscopiques des souches purifiés.

souches	forme	Regroupement	Observation microscopique
BL1	Cocci	Isolés Diploïdes Amas	
BL3	Bacilles (fins)	Isolés Diploïdes En chainettes	

BL4	Bacilles (fins longs)	Isolés Diploïdes chaînettes	
BL5	Cocci	Isolés Diploïdes chaînettes	

2.4 Test de catalase

Les quatre souches isolées sur les milieux MRS et M17 ne représentent pas d'effervescence (Pas de bulles d'air) l'ors de l'ajout d'une goutte de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 .

L'absence d'effervescence après l'ajout de peroxyde d'hydrogène indique que les quatres souches lactiques isolées sont catalase négatives, ce qui est caractéristique des bactéries lactiques, confirmant qu'elles ne produisent pas l'enzyme catalase capable de décomposer le H_2O_2 en eau et dioxygène, et ce résultat est essentiel pour leur identification microbiologique leur distinction par rapport à d'autres bactéries catalase positives; le test catalase est discriminatif pour les bactéries lactiques (**de Jesus et al., 2022**) (annexe4).

3. Caractéristiques physiologiques et Biochimiques

A / Croissance à différentes températures

Ce test permet de distinguer la croissance des bactéries mésophile déjà isolées à une température de 37° C et leur tolérance aux températures variables. Le résultat montre qu'aucune des bactéries n'a pu pousser à 4 ou à 45 °C par contre, présence de croissance à 37 °C après 24 heures d'incubation (Tableau 12) (Figure 7).

Le résultat indique une tolérance limitée aux températures extrêmes et une adaptation spécifique à des conditions thermiques modérées indiquant que les isolats sont probablement des strictement mésophiles.

Tableau 12 : Croissance des bactéries lactiques à différentes températures.

Les souches	Températures		
	4°	37°	45°
BL1	-	+	-
BL3	-	+	-
BL4	-	+	-
BL5	-	+	-

+ : croissance - : Pas de croissance +/- : faible croissance

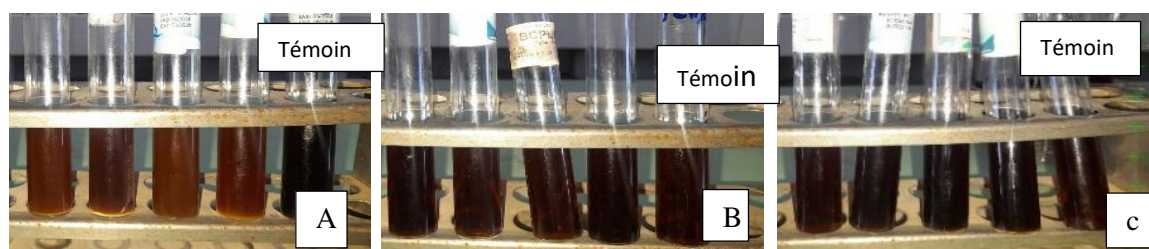


Figure 7 : Aspect macroscopique des bactéries lactiques obtenues après 48h d'incubation (A) : à 37° ; (B) : à 45° ; (C) : à 4°.

B/ Test de salinité

Les résultats indiquant que toutes les souches bactériennes tolèrent une concentration modérée de NaCl entre 3% et 6,5%, favorisant leur croissance, tandis qu'aucune croissance n'est observée à 9,6%, montrent que ces bactéries sont légèrement halotolérantes (Tableau 13).

Elles peuvent se développer dans des milieux à salinité modérée, mais leur tolérance a des limites au-delà desquelles la croissance est inhibée. Cette tolérance limitée est typique des bactéries halotolérantes qui ne nécessitent pas obligatoirement le sel pour croître mais peuvent survivre en sa présence jusqu'à une certaine concentration (**Lach et al., 2021 ; Grégoire et al., 2009**).

Ainsi, ces souches sont adaptées à des environnements à faible ou moyenne salinité, ce qui est important pour leur utilisation biotechnologique dans des procédés où la concentration en sel reste modérée, car elles ne supportent pas des conditions fortement salines (au-delà de 9,6% NaCl) qui seraient typiques des halophiles modérés ou extrêmes (**Ventosa et Arahall, 2011**).

Tableau 13 : Résultats du test de culture sur milieu hypersalé

Souches	NaCl		
	3	6.8	9.8
BL1	+	+	-
BL3	+	+	-
BL4	+	+	-
BL5	+	+	-

C/ Test de lait de Sherman

Les résultats positifs se traduisent pas la coagulation du lait et la réduction de colorant indiquant que les bactéries peuvent se développées dans un milieu oxydant et ont consommé l'oxygène du milieu.

Les résultats montrent que toutes les souches, à l'exception de BL3 , ont pu croître en présence de bleu de méthylène à 0,1%, traduisant leur aptitude à consommer l'oxygène et à se développer dans un environnement partiellement oxydant. En revanche, aucune souche n'a pu croître à 0,3% de bleu de méthylène, ce qui révèle une sensibilité accrue à cette concentration plus élevée, limitant leur capacité à survivre dans des conditions fortement oxydantes (Tableau 14) (Figure 8).

Ce profil est caractéristique des bactéries lactiques, qui sont généralement microaérophiles et capables de tolérer de faibles concentrations d'oxygène mais non des milieux fortement oxydants (**Boumaiza, 2017**).

Tableau 14 : les résultats de test de lait de Sherman.

Bleu de méthylène Souches	0.1 %	0.3%
BL1	+	-
BL3	-	-
BL4	+	-
BL5	+	-

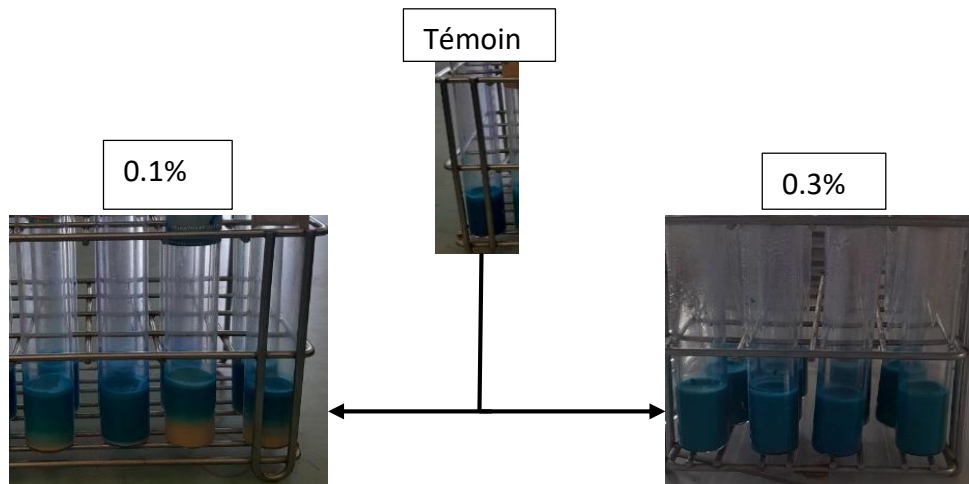


Figure 8 : Observation macroscopique des bactéries lactiques en milieu de Sherman à 0.1% et 0.3% après 48h d'incubation.

D/ Test de pH

La majorité des isolats ont démontré une capacité de croissance significative dans un milieu acide à pH 4,8, ce qui reflète leur adaptation à des environnements à faible pH typiques des bactéries lactiques, tandis qu'aucune croissance n'a été observée à pH alcalin (9,6), indiquant une sensibilité à des conditions basiques et une préférence pour des milieux légèrement acides à neutres, conforme aux caractéristiques physiologiques de ces micro-organismes (Gänzle, 2009) (Tableau 15 ; Figure 9).

Nos souches ont montré une capacité de croissance à des pH acides de 4,8, ce qui concorde avec les observations de (Bouchibane, 2022) Contrairement à ces résultats, dans la thèse de (Saidi, 2020), il rapporte une croissance d'isolats des bactéries lactiques en milieu à pH 9.6 ce qui suggère une capacité d'adaptation à différents environnements, y compris des pH alcalins.

Tableau 15 : Résultat du test de croissance à différents pH

Souches	4.8	9.6
BL1	+	-
BL3	+	-
BL4	+	-
BL5	+	-

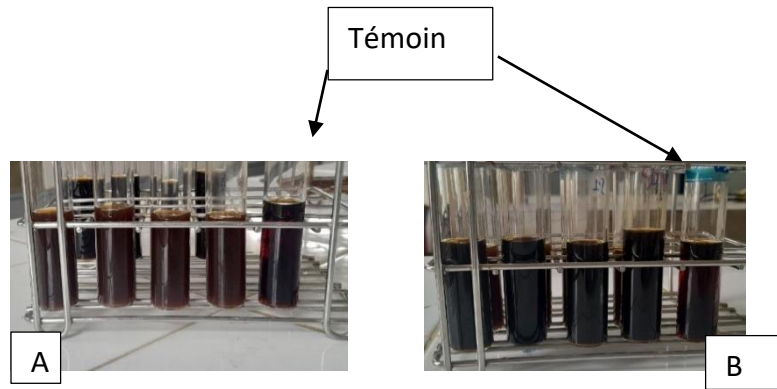


Figure 9 : Aspect macroscopique des bactéries lactiques obtenues après 48h d'incubation : pH =4.8 ; pH=9.6.

E/ Test type fermentaire

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

Toutes les souches, à l'exception de BL4, ont montré la présence de bulles d'air, indiquant une fermentation hétérofermentaire caractérisée par la production de lactate accompagnée de sous-produits gazeux tels que le dioxyde de carbone (CO_2) (Figure 10).

En revanche, la souche BL4, dépourvue de formation de bulles, est homofermentaire, produisant exclusivement du lactate comme produit final de fermentation. Ce résultat est conforme aux caractéristiques métaboliques classiques des bactéries lactiques, où les hétérofermentaires génèrent plusieurs produits fermentaires tandis que les homofermentaires produisent principalement de l'acide lactique (Axelsson, 2004).



Figure 10 : Détermination des types fermentaires des isolats par l'observation macroscopique des bulles d'air formées dans la cloche de Durham dans le bouillon MRS.

F/ Test de production de l'acétoïne

Après addition du réactif de Voges-Proskauer, l'absence de coloration rouge caractéristique indique que les souches testées ne produisent pas d'acétoïne (Figure 11).

L'absence de production d'acétoïne par certaines bactéries lactiques peut s'expliquer par leur incapacité à fermenter le citrate, un précurseur clé de l'acétoïne, en raison de l'absence des enzymes spécifiques telles que la citrate perméase et la citrate lyase (Kleerebezem et al., 2003).

De plus, ces bactéries privilégient souvent la voie homofermentaire, produisant principalement de l'acide lactique et la voie hétérofermentaire par la production d'autres composés sans générer de composés aromatiques comme l'acétoïne (Gänzle, 2009).

Cette spécificité métabolique est bien documentée dans la littérature, où seules certaines espèces sont capables de produire ces composés aromatiques (Settanni et Moschetti, 2010)



Figure 11 : Observation macroscopique de la production d'acétoïne.

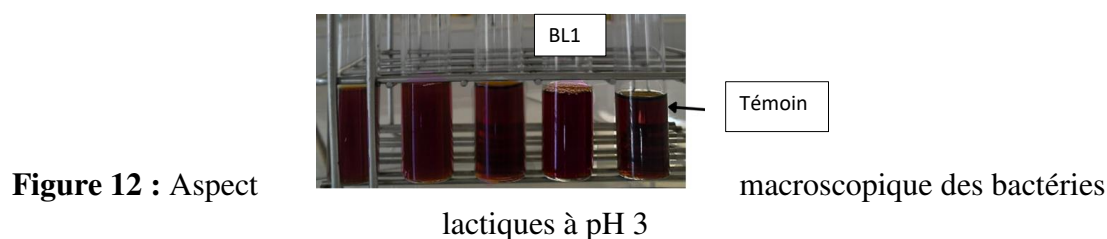
4. Aptitude probiotique des bactéries lactiques isolées

La deuxième étape de notre étude consiste à mettre en évidence le potentiel probiotique des isolats de bactéries lactiques ; en étudiant leur tolérance à l'acidité équivalente à celle de l'estomac et aux sels biliaires, pouvoir hémolytiques ; leurs activités antagonistes contre les bactéries pathogènes et leur résistance aux antibiotiques (Bouacha et al., 2021).

4.1 Résistance aux conditions gastro-intestinales

A/ Tolérance à l'acidité

La majorité des souches lactiques isolées montrent une bonne tolérance à un pH acide de 3 (Figure 12), ce qui reflète leur capacité à survivre et se développer dans des environnements fortement acidifiés.



À l'exception de la souche BL1 (Figure 18) qui ne supporte pas cette acidité. Cette aptitude à croître à pH bas est cohérente avec les mécanismes d'adaptation au stress acide décrits chez les bactéries lactiques, qui leur permettent de maintenir un pH intracellulaire stable malgré un pH extracellulaire défavorable, favorisant ainsi leur survie dans des milieux tels que l'estomac ou les produits fermentés acides (Van de Guchte *et al.*, 2002 ; Azat *et al.*, 2016).

La production d'acide gastrique joue un rôle de défense crucial en empêchant la colonisation du tractus digestif par des bactéries, qu'elles soient pathogènes ou non. La capacité à résister à l'acide sera par conséquent un critère de choix pour les probiotiques (Flourié et Nancey, 2007).

B/ Tolérance aux sels biliaries

Le test d'hydrolyse des sels biliaries a montré que toutes les souches isolées sont incapables de dégrader ces composés, comme en témoigne l'absence de croissance sur le milieu contenant des sels biliaries (Figure 13), indiquant une sensibilité aux sels biliaries.

L'utilisation d'une concentration élevée de sels biliaries (3%) dans les tests de tolérance des bactéries lactiques permet de simuler des conditions extrêmes pour évaluer la robustesse maximale des souches probiotiques. Bien que la concentration physiologique des sels biliaries dans l'intestin grêle soit généralement comprise entre 0,3% et 0,5%, des concentrations supérieures sont parfois utilisées *in vitro* pour mieux distinguer les souches capables de survivre à des stress sévères (Busnuv *et al.*, 2023).

Ainsi, bien que l'absence d'activité BSH limite la résistance directe aux sels biliaries, les souches étudiées conservent un profil fonctionnel intéressant pour des applications probiotiques, notamment dans des environnements où la détoxification des sels biliaries n'est pas le seul facteur déterminant de survie et d'efficacité.

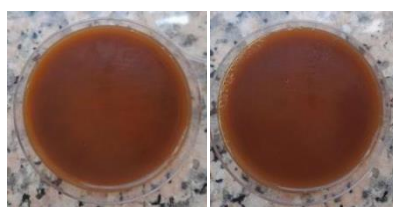


Figure 13 : Observation macroscopique de l'hydrolyse des sels biliaries

4.2 Evaluation de la sécurité des souches présumées probiotiques

A/ Pouvoir hémolytique

Après incubation à 37 °C pendant 24h, les résultats montrent que les souches étudiées ne produisent aucune modification sur la gélose au sang, ce qui correspond à une γ -hémolyse, définie comme une absence totale d'hémolyse autour des colonies (Figure 14).

Cela signifie que ces bactéries ne produisent pas de toxines capables de lyser les globules rouges présents dans le milieu, ce qui est un indicateur important de leur innocuité, notamment pour des applications alimentaires ou probiotiques.

En microbiologie, la γ -hémolyse est considérée comme un signe de non-pathogénicité, contrairement à l' α -hémolyse (hémolyse partielle) ou à la β -hémolyse (hémolyse totale) qui sont associées à des activités hémolytiques plus agressives. (Franz, 2011).

Une hémolyse de type gamma a été observée, ce qui indique l'absence d'activité hémolytique de nos isolats, ce qui traduit la non nocivité de ces souches (Bahri, 2014).

En effet, l'évaluation de l'activité hémolytique constitue un critère essentiel de sécurité pour les souches probiotiques. Les micro-organismes utilisés comme probiotique doivent être exempts de toute forme de pathogénicité afin de garantir leur innocuité pour le consommateur (FAO/OMS, 2002).

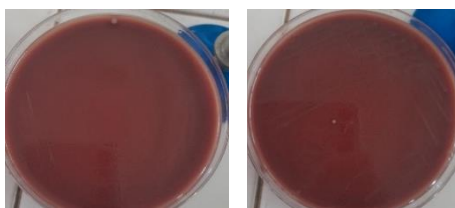


Figure 14 : Observation macroscopique des bactéries lactiques sur gélose au sang.

B/ Sensibilité aux antibiotiques

Les résultats montrent que :

Toutes les souches sont sensibles à la tétracycline et au chloramphénicol. BL1,2,4 sont sensibles à la gentamicine. Les souches 1 et 2 sont sensibles à la pénicilline.

Par contre, toutes les souches sont résistantes à la fosfomycine. La souche BL3 est résistante à la gentamicine. Les souches BL3 et BL4 sont résistantes à la pénicilline (Tableau 16 ; Figure 15).

Toutes les souches sont sensibles à la tétracycline et au chloramphénicol, ce qui indique que ces antibiotiques restent efficaces contre ces isolats du a leur spectre d'action large reconnu. Les souches BL1, 2 et 4 sont également sensibles à la gentamicine, un antibiotique aminoglycoside, tandis que seules les souches BL1 et 2 sont sensibles à la pénicilline, un bêta-lactame fréquemment utilisé dans les infections usuelles. Cette variabilité traduit la diversité des mécanismes de résistance ou de sensibilité au sein des bactéries lactiques, qui peuvent être intrinsèques ou acquises (Cardot et al., 2019).

En revanche, toutes les souches sont résistantes à la fosfomycine. Cette résistance est souvent liée à une incapacité de l'antibiotique à pénétrer efficacement dans la cellule bactérienne. La résistance à la fosfomycine est un phénomène courant chez ces bactéries, lié à leur physiologie spécifique (Falagas et al., 2016).

La souche BL3 est résistante à la gentamicine, et les souches BL3 et 4 sont résistantes à la pénicilline. La résistance à la pénicilline est souvent due à la production de bêta-lactamases, des enzymes capables d'hydrolyser le cycle bêta-lactame de l'antibiotique, ou à des modifications des protéines de liaison aux pénicillines (PBP), réduisant ainsi l'affinité de l'antibiotique pour sa cible. La résistance à la gentamicine peut être liée à des mécanismes d'efflux ou à des enzymes modifiant l'antibiotique (Mainardi, 2015).

Ces résultats soulignent l'importance de réaliser un antibiogramme pour chaque souche de bactéries lactiques, notamment dans un contexte probiotique ou industriel, afin de garantir la sécurité et l'efficacité des souches utilisées. Ils reflètent également la nécessité d'une surveillance continue des résistances pour éviter la dissémination de gènes résistants, notamment par transfert horizontal entre bactéries commensales et pathogènes (Begley, 2006).

Tableau 16 : Les résultats de l'antibiogramme.

Souches	Gentamycine	Fosfomycine	Pénicilline	Tétracycline	Chloramphénicol
BL1	22	-	23	24	22
BL2	26	-	16	25	10
BL3	-	-	-	25	22
BL4	28	-	-	28	21
BL1	S	R	S	S	S
BL2	S	R	I	S	R
BL3	R	R	R	S	S
BL4	S	R	R	S	S

R : résistante

I : intermédiaire

S : sensible

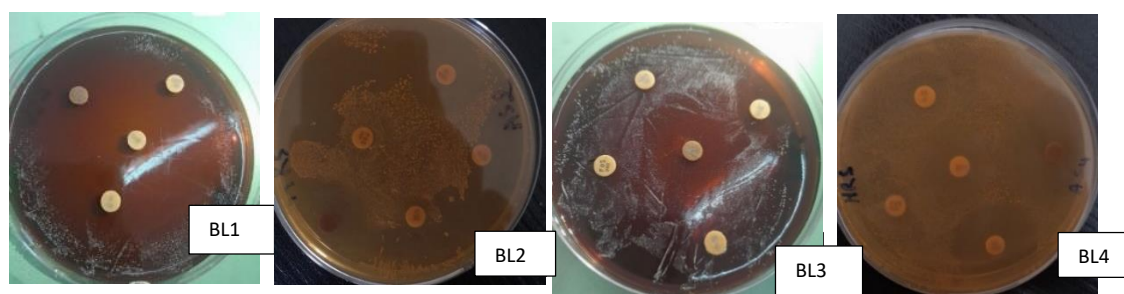


Figure 15 : Observation macroscopique des zones d'inhibition dans les antibiogrammes des isolats de bactéries lactiques.

C/ Activité antimicrobienne (d'antagonisme) des bactéries lactiques

Les souches de bactérie lactique ayant provoqué une zone d'inhibition mesurée en mm, sont considérées comme productrices de substances antibactériennes capable d'inhiber la croissance du germe cible. La taille de la zone d'inhibition est proportionnelle à la sensibilité de ce dernier (Figure 16).

Les résultats montrent que les bactéries lactiques présentent une activité inhibitrice significative contre plusieurs bactéries pathogènes, mais avec des profils d'inhibition distincts selon les genres bactériens ciblés (Tableau 17 ; Figure 16).

Les souches BL3 et BL4 montrent une forte inhibition contre *E. coli* (27 mm), ce qui illustre leur capacité à produire des substances inhibitrices efficaces, probablement des acides organiques, des bactériocines ou du peroxyde d'hydrogène, connus pour leur rôle dans la lutte contre les pathogènes. La faible ou nulle inhibition de BL2 contre *L. monocytogenes* (0 mm) suggère une spécificité d'action des métabolites produits, ce qui est fréquent puisque certaines bactéries lactiques ciblent préférentiellement certains pathogènes (Nahal, 2016).

L'activité plus modérée contre *P. aeruginosa* (16-25 mm) reflète la difficulté à inhiber cette bactérie opportuniste souvent résistante, ce qui a été également observé dans d'autres travaux (Saidi, 2020).

La production d'acide lactique et l'abaissement du pH jouent un rôle majeur dans l'inhibition, mais peuvent être insuffisants face à des bactéries résistantes comme *P. aeruginosa* (Hicks et Goepfert, 1968; Yazdanparast, 2002).

Ces résultats confirment que les bactéries lactiques exercent un effet antagoniste important contre plusieurs pathogènes grâce à la production de métabolites antimicrobiens (acides organiques, bactériocines, peroxyde d'hydrogène). La variabilité de l'activité selon la souche et la cible pathogène souligne l'importance de la sélection rigoureuse des souches pour des applications spécifiques, notamment en tant qu'agents de conservation ou probiotiques (Grégoire et al., 2009; Reid et al., 2003).

L'absence d'activité de BL2 contre *L. monocytogenes* illustre que certaines souches lactiques peuvent être inefficaces contre certains pathogènes, ce qui nécessite souvent l'utilisation de mélanges de souches pour une couverture antimicrobienne plus large (Nahal, 2016).

Les souches BL3 et BL4 présentent les plus grandes zones d'inhibition contre *Bacillus subtilis* (30 mm), ce qui indique une forte capacité à produire des bactériocines ou d'autres substances antimicrobiennes efficaces contre cette bactérie Gram-positif. Ce résultat est en accord avec les études de Settanni et Moschetti (2010), qui rapportent que certaines bactéries lactiques sont particulièrement actives contre les bacilles à Gram positif, souvent responsables de détérioration alimentaire.

Par ailleurs, l'efficacité moindre contre *P. aeruginosa* met en évidence les limites intrinsèques des bactéries lactiques et la nécessité d'associer d'autres stratégies antimicrobiennes dans certains contextes.

l'étude souligne le potentiel biotechnologique des bactéries lactiques comme agents antimicrobiens naturels, tout en rappelant que leur efficacité dépend fortement de la souche et de la cible, ce qui doit guider leur sélection et leur utilisation dans l'industrie agroalimentaire et la santé.

Tableau 17 : Résultats de l'activité antimicrobienne diamètres des zones d'inhibition en mm

BL \ SC	BL	BL1	BL3	BL4	BL5
<i>E. coli</i>		19	27	27	24
<i>L.monocytogenes</i>		28	00	27.5	27.5
<i>P. aeruginosa</i>		25	18	18	16
<i>B. subtilis</i>		23	00	30	30

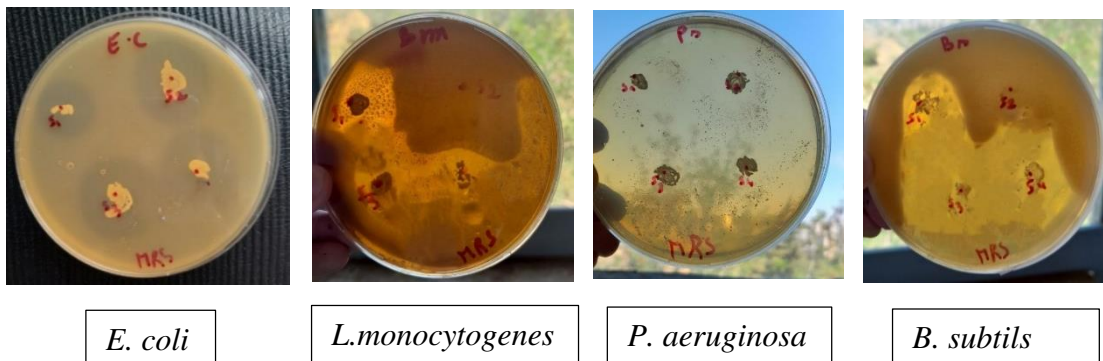


Figure 16 : Observation macroscopique des zones d'inhibitions des bactéries lactiques.

Tableau récapitulatif de la caractérisation des souches sélectionnées.

Souches Les tests		BL1	BL3	BL4	BL5
Forme cellulaire		Cocci	Bacilles	Bacilles	Cocci
Gram		+	+	+	+
Catalase		-	-	-	-
Croissance à différentes températures	4° et 45°	-	-	-	-
	37°	+	+	+	+
Tolérance à l'NaCl 3% et 6.8	3 % et 6.8%	+	+	+	+
	9.8%	-	-	-	-
Lait de Sherman	0.1 %	+	-	+	+
	0.3%	-	-	-	-
Type fermentaire		hétérofermentaire	hétérofermentaire	hétérofermentaire	homofermentaire
Test de ph	ph=4.8	+	+	+	+
	ph=3	-	+	+	+
	PH=9.6	-	-	-	-
Acétoïne		-	-	-	-
Genre		<i>Leuconostoc sp</i> ou <i>Weissella sp</i>	<i>Lactobacillus sp</i>		<i>Lactococcus sp</i>

Conclusion

Les bactéries lactiques présentent un intérêt significatif dans l'amélioration de la qualité et de la sécurité alimentaires. Employées comme suppléments nutritionnels et agents thérapeutiques, elles exercent des effets bénéfiques sur la santé humaine et animale.

Ces bactéries révèlent continuellement des particularités surprenantes à travers des études approfondies ; leurs fonctions principales incluent la production d'acides organiques, de composés aromatiques, l'inhibition des micro-organismes pathogènes, l'amélioration de la qualité nutritionnelle, l'activité probiotique, l'élaboration de la texture et la dégradation des composés toxiques (Yao *et al.*, 2009).

L'objectif principal de cette étude était d'isoler des bactéries lactiques à partir de glands de *Quercus illex*, provenant de la région de Jijel et d'évaluer certaines aptitudes probiotiques et technologiques. Les principaux résultats sont :

- L'isolement, la sélection et la pré-identification de trois souches lactiques appartenant au genre *Lactobacillus*, ainsi qu'une souche de *Lactococcus* ou *weissella sp.*, ont été réalisés à l'aide de tests de microbiologie classiques.
- L'étude des aptitudes technologiques a révélé que toutes les souches étudiées présentent *in vitro* des propriétés probiotiques intéressantes, telles qu'un pouvoir antibactérien, une résistance aux antibiotiques et une tolérance au stress acide.
- Le test d'antagonisme suggère que les souches étudiées produisent des substances inhibitrices vis-à-vis des bactéries pathogènes et montrent une résistance modérée aux conditions acides avec une résistance maintenue même après 48 heures d'exposition.

Cette recherche vise à utiliser à l'avenir des souches probiotiques sélectionnées pour prévenir et traiter les infections, notamment celles liées aux maladies intestinales chroniques.

Pour cela, des études supplémentaires sont nécessaires afin de confirmer leur efficacité et leur sécurité. Ces études devraient porter sur plusieurs points importants :

- Tout d'abord isoler plus de souches afin de mieux exploiter le milieu de fermentation des glands et bien comprendre son écologie microbienne.
- Refaire le test de la résistance aux sels biliaires à des concentrations variables mais plus faibles que celle déjà testée dans ce travail et qui n'a pas donné de résultat satisfaisant ; , exemple des concentrations entre 0,1 et 1%.
- Tester leur capacité à adhérer aux entérocytes humaines, ce qui est crucial pour qu'elles puissent coloniser et agir efficacement.
- Faire des tests prébiotiques des souches obtenues chez un modèle animal comme le poussin par exemple.
- Purifier et analyser les substances antimicrobiennes qu'elles produisent, afin de confirmer leur nature et leur mode d'action contre les microbes nuisibles.
- Utiliser des techniques de biologie moléculaire afin d'identifier précisément les souches de bactéries lactiques et mieux comprendre leur fonctionnement.

- Etudier leurs propriétés technologiques comme la dégradation des protéines et des lipides, ainsi que leur capacité à acidifier leur environnement, ce qui est important pour leur utilisation dans les aliments.
- Évaluer leurs effets bénéfiques dans des modèles animaux et des essais cliniques, notamment leur capacité à réduire l'inflammation et à renforcer le système immunitaire.

En fin, cette étude constitue un point de départ approprié pour caractériser les des bactéries lactiques isolées d'un nouveau milieu alimentaire très rarement étudié. De plus, ces informations pourraient être utilisées dans l'élaboration d'un programme de recherche visant à identifier et à sélectionner des souches probiotiques à des fins thérapeutiques.

Références bibliographiques

A

Abella, A. (2006). *Étude des Bifidobacterium comme indicateur des sources diffuses de pollution*. Institut National de la Recherche Scientifique (Canada).

Alegre, E. I. (2009). *Les protéines bactériennes en tant que biomarqueurs de l'activité probiotique* (Doctoral dissertation, Strasbourg).

Alegria, Á., Delgado, S., Rocas, C., López, B., & Mayo, B. (2010). Bactériocines produites par des souches sauvages de *Lactococcus lactis* isolées de fromages traditionnels au lait cru, sans levain. *Revue internationale de microbiologie alimentaire* ,

Ammor, MS, et Mayo, B. (2007). Critères de sélection des bactéries lactiques à utiliser comme ferments lactiques fonctionnels dans la production de saucisses sèches : une mise à jour. *Meat science* , 76 (1), 138-146.

Astier-Théfenne, H., Wolf, A., Darles, C., & Garnotel, É. (2014). Vérification des performances d'une méthode selon le SH FORM 44: application à la coloration de Gram. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2014(461), 37-46.

Azat, R., Liu, Y., Li, W., Kayir, A., Lin, D. B., Zhou, W. W., & Zheng, X. D. (2016). Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented Xinjiang cheese. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 17(8), 597–609. bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre des régions arides d'Algérie. *Journal Algérien des Régions Arides*, (01), 1-10.

Azizi, H., & Bouchicha, A. (2019). Isolement et sélection de souches de bactéries lactiques à effet probiotique [Mémoire de Master, Université Mohamed Saddik Ben Yahia Jijel, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Département de Microbiologie Appliquée et Sciences Alimentaires]

B

Badis, A., Guetarni, D., Kihal, M., & Naceur, M. W. (2004). Etude physiologique des Bactéries Lactiques Isolées du Lait Cru de Chèvre de la race «Ouled Djellal». *Journal Algérien des Régions Arides*, 3(1), 13-22.

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 "arabes et kabyles". *Sciences & Technologie. C, Biotechnologies*, 30-37.

Bahri, F. (2014). Isolement et caractérisation de souches de lactobacilles à caractères probiotiques à partir de selles d'enfants (Doctoral dissertation, Thèse de Doctorat (Université Constantine I, Algérie)).

Barefoot, S. F. and Kaenhammer, T. R. 1983. Detection and activity of Lactocin B. A bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 45(6):1808-1815.

Bastard, A. (2015). *Interactions micro-organismes-bois et impact sur les propriétés physico-chimiques du vin: fermentation malolactique par le biofilm de *Cenococcus æni** (Doctoral dissertation, Université de Bourgogne).

Bauwin, M. Dépression, microbiote intestinal et alimentation.

Bayane, A. (2005). *Etude de la diversité et des propriétés technologiques de bactéries acidifiantes originaires du Burkina Faso* (Doctoral dissertation, UNIVERSITÉ DE LIÈGE, GEMBLoux AGRO-BIO TECH, GEMBLoux, BELGIQUE).

Béal, C., & Sodini, I. (2019). Lafermentation lactique. Dans : Fabrication des yaourts et des laits fermentés (f6315). Techniques de l'Ingénieur.

Belhamra, Z. (2018). *Croissance et survie des probiotiques en présence des édulcorants et des additifs alimentaires* (Doctoral dissertation).

Bene, Y. R. L. E. (2023). Activité autolytique de bactéries lactiques et action anti-escherichia coli de symbiotiques à base d'extraits d'exopolysaccharides

Begley, M., Hill, C., & Gahan, C. G. M. (2006). Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 1729–1738.

BOUACHA, C., ALOUACHE, S., BENKHALED, A., & ZAIDAT, L. M. (2021). ETUDE DU POTENTIEL PROBIOTIQUE DES BACTERIES LACTIQUES ISOLEES A PARTIR D'Artemia sp.

Benguettat-Magliano, O., & Esposito, M. P. (2016). Le dénombrement bactérien in vivo: une méthode de quantification de bactéries dans l'intestin de drosophile. *Cahier des Techniques de l'INRA*, 89, 7-p.

Benreguieg, M. (2015). *Propriétés Antibactériennes et Probiotiques de Bactéries Lactiques Isolées à Partir du Lait de Vache, de Chèvre et de Brebis dans la région de l'Ouest Algérien* (Doctoral dissertation, thèse de doctorat. Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Département de Biologie, 181p).

Bouguerra, A. (2021). *Evaluation du potentiel probiotique des souches lactiques isolées à partir du lait de chamelle* (Doctoral dissertation)

Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, JC, Gerds, ML, Hammes, WP, ... & Hansen, EB (2012). Fermentations alimentaires : micro-organismes à usage technologique bénéfique. *Revue internationale de microbiologie alimentaire*, 154 (3), 87-97.

Bouzaid, 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.

Broussaud-Le-Strat, F. (2002, février). Chênes à glands doux. Synthèse réalisée à partir des échanges sur le forum Tela Botanica, Version 2.

Burillard, L., Daumas, V., Glaz, M., Kouyoumdjian, L., Lobrot, S., Logier, D., Mallot, N., Marchand, C. & Borges, F. (2016). Les fermentations alimentaires : Synthèse bibliographique. Rapport d'étude, ENSAIA, Université de Lorraine.

Busnuy, A., Dupont, L., Martin, S., & Lee, J. (2023). Characterization and selection of probiotic lactic acid bacteria: tolerance to bile salts and acid conditions. *Frontiers in Microbiology*, 14, Article 1241581.

Burlion, M., & Ameno, J. (2023). Le vinaigre dans la prévention et la gestion des troubles cardiométaboliques chez l'adulte.

C

Charef, M. (2011). Contribution à l'étude de la composition chimique et étude des propriétés phytochimiques et nutritionnelles des lipides des fruits de *Pistacia lentiscus* et du *Quercus*. *Quercus*, 07-08.

Coudeyras, S., & Forestier, C. (2010). Microbiote et probiotiques: impact en santé humaine. *Canadian Journal of Microbiology*, 56(8), 611-650.

Cronquist, A. (1981). *Un système intégré de classification des plantes à fleurs*. Presses universitaires de Columbia

Czarnocka-Roczniakowa, B., Jaworski, J., & Kornacka, D. (1972). Effet stimulant de la microflore lactique sur l'activité biochimique des bactéries propioniques. *Le lait*, 52(513-514), 193-202.

D

de Jesus, LCL, da Silva, TF, de Assis Glória, R., dos Santos Freitas, A., Américo, MF, da Silva Fernandes, LJ, ... & Azevedo, V. (2022). Boissons à base de bactéries lactiques pour la promotion de la santé du tractus gastro intestinal. Dans *Microbiome, immunité, santé digestive et nutrition* (pp. 373-385). Presse académique.

Durand, C., Kocik, M., Lagniez, S., & Lelong, C. (2022). Fabrication de vinaigre de vin et de cidre, mère de vinaigre, biofilm, évolution du pH.

E

Eicher, C. (2024). *Évolution adaptative et acido-tolérance de la bactérie d'intérêt œnologique Oenococcus oeni* (Doctoral dissertation, Académie Amorim).

ESA-Mostaganem, E. B. K. P. (2023). Identification des bactéries lactiques isolées des produits laitiers artisanaux: Aptitudes technologiques et essais de fabrication d'un lait fermenté (Doctoral dissertation, Université de Mostaganem)

F

FAO. (2012). État actuel des ressources génétiques forestières en Algérie. Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture.

FAO/OMS (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization (Organisation Mondiale pour la Santé OMS). Working Group Report. London, Ontario, Canada

FAO. 2021. Utilisation des glands de chêne dans la préparation du couscous bil ballout à Jijel, Algérie. Rome.

Feng, R., Chen, L. et Chen, K. (2018). Voyage de fermentation : microbes étonnants, métabolismes étonnants. *Annales de microbiologie*, 68, 717-729.

Fessard, A. (2017). *Recherche de bactéries lactiques autochtones capables de mener la fermentation de fruits tropicaux avec une augmentation de l'activité antioxydante* (Doctoral dissertation, Université de la Réunion).

Flourié, B., & Nancey, S. (2007). Propriétés fonctionnelles des probiotiques. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 42, 38-44.

Franz, C. M. A. P., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W., & Gálvez, A. (2011). Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes*, 2(3), 164–185.

G

Gänzle, M. G. (2015). Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*, 2, 106–117.

Gosset, M. (2022). Mise en oeuvre de microorganismes immobilisés pour un procédé innovant de vinification en continu (Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse, Université de Toulouse). Soutenue le 28 octobre 2022.

Graf, C., & Sarasin, F. P. (2007). Probiotiques: efficacité. *Rev Med Suisse*, 3, 2350-4.

Grégoire, M., Dupont, L., & Martin, P. (2009). Tolérance au sel chez les bactéries lactiques : implications écologiques et biotechnologiques. *Journal of Microbial Ecology*, 15(2), 123-130

GUETARNI, H. (2007). Etude de l'effet des bactéries lactiques sur l'inhibition des bactéries impliquées dans la physiopathologie digestive in vitro (Doctoral dissertation, Ahmed BENSaid)

H

Hadef, S. (2012). *Evaluation des aptitudes technologiques et probiotiques des bactéries lactiques locales* (Doctoral dissertation).

Hamelin, L. (2021). Effet de la digestion gastrique sur la viabilité et l'expression de gènes de stress de bactéries probiotiques dans une matrice de sève d'érable.

Hammes, WP, Vogel, RF (1995). Le genre *Lactobacillus* . Dans : Wood, BJB, Holzapfel, WH (éd.), Les genres de bactéries lactiques. Les bactéries lactiques, vol. 2. Springer, Boston, MA.

Hill, D., Sugrue, I., Arendt, E., Hill, C., Stanton, C., & Ross, R. P. (2017). Recent advances in microbial fermentation for dairy and health. *F1000Research*, 6, 751.

Holzapfel, WH, Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., et Schillinger, U. (2001). Taxonomie et caractéristiques importantes des micro-organismes probiotiques dans l'alimentation et la nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition* , 73 (2), 365s-373s.

I

Ilesanmi, T. M., & Eniola, K. I. T. (2023). Isolation and antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from pineapple and watermelon. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 23(2), 148–154.

J

Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2005). *Modern Food Microbiology* (7th ed.). Springer.

Jha, V., Sarang, C., Sawant, D., Nalawade, K., Dhamapurkar, V., Kaur, N., Thakur, K., Amin, S., Mane, P., and Marath, A. (2022). Exploration of Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated from Different Food Sources. *American Journal of BioScience*, 10(3), 13.

Jones, M. L., Tomaro-Duchesneau, C., & Prakash, S. (2013). The gut microbiome, probiotics, bile acids axis, and human health. *Trends in Microbiology*, 21(7), 357–367.

K

Kleerebezem, M., Vaughan, E. E., & de Vos, W. M. (2003). Metabolic engineering of lactic acid bacteria for improved aroma production. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 123-130.

Kahina Maya Makhloufi. Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Bactériologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2011. Français. { NNT : } . { tel-00678029}

Karam, H. Z., & Karam, N. E. (2006). Bactéries lactiques du lait de chamelle d'Algérie: mise en évidence de souches de *Lactococcus* résistantes au sel. *Tropicultura*, 24(3), 153-156.

Kremer, A., Petit, R. J., & Ducouso, A. (2002). Biologie évolutive et diversité génétique des chênes sessile et pédonculé. *Revue forestière française*, 54(2), 111-130.

Kumar, A., and Kumar, D. (2015). Characterization of *Lactobacillus* isolated from dairy samples for probiotic properties. *Anaerobe*, 33, 117-123.

L

Lach, S., Bernard, A., & Rousseau, F. (2021). Halotolerance and fermentation performance of lactic acid bacteria in food processing. *Food Microbiology Reviews*, 38(4), 245-260

Landman, C., & Quévrain, E. (2016). Le microbiote intestinal: description, rôle et implication physiopathologique. *La Revue de médecine interne*, 37(6), 418-423.

Leborgne, C. (2022). *Déterminants du comportement des pigments au cours de la fermentation alcoolique des vins rosés* (Doctoral dissertation, Montpellier SupAgro).

Lemarié, S. (2015). Étude des mécanismes de fermentation malolactique chez les bactéries lactiques œnologiques : rôle des facteurs génétiques et environnementaux (Thèse de doctorat, Université de Bourgogne).

Liasi, S. A., Azmi, T. I., Hassan, M. D., Shuhaimi, M., Rosfarizan, M., & Ariff, A. B. (2009). Antimicrobial activity and antibiotic sensitivity of three isolates of lactic acid bacteria from fermented fish product, Budu. *Malaysian Journal of Microbiology*, 5(1), 33-37.

M

Makhloufi, K. M. (2011). *Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza (Doctoral dissertation, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI).

M.J. Butel, Probiotics, gut microbiota and health *Medicine et Maladies Infectieuses*, 44 (1)(2014), pp. 1-8, 10.1016/j.medmal.2013.10.002

Marchand, G., Barrette, M. C., & Lesage, J. (2011). Dénombrement des bactéries et moisissures viables de l'air prélevées sur filtre de polycarbonate.

Mariko, R. (2005). Contribution à l'étude des infections urinaires chez la femme enceinte à l'Hôpital Gabriel Touré (Thèse de doctorat, Université de Bamako, Mali).

Mathieu, V. D. (2015). Viabilité, propriétés technologiques et effets anti-inflammatoires et anti-obésité de nouvelles souches probiotiques dans les produits laitiers.

Mengesha, Y., Tebeje, A., & Tilahun, B. (2022). A review on factors influencing the fermentation process of teff (*Eragrostis teff*) and other cereal-based Ethiopian injera. *International journal of food science*, 2022(1), 4419955.

Monika, Savitri, Kumar, V., Kumari, A., Angmo, K., & Bhalla, T. C. (2017). Isolation and characterization of lactic acid bacteria from traditional pickles of Himachal Pradesh, India. *Journal of food science and technology*, 54(7),

Morandi, S., Cremonesi, P., Silveti, T., & Brasca, M. (2013). Technological characterisation, antibiotic susceptibility and antimicrobial activity of wild-type *Leuconostoc* strains isolated from north Italian traditional cheeses. *Journal of Dairy Research*, 80(4), 457–466

Mounir, M., Belgire, M., Lahnaoui, S., Hamouda, A., Thonart, P., Delvigne, F., & ALAOUI, M. I. (2016). Maîtrise de la fermentation alcoolique sous stress éthanolique, thermique et osmotique de la souche *Saccharomyces cerevisiae* YS-DN1 en vue de la préparation du vinaigre de fruits. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 4(2), 86-95.

N

Nguyen, T. T. (2013). Étude des mécanismes de fermentation propionique chez *Propionibacterium freudenreichii* : production et régulation des acides organiques (Thèse de doctorat, Université de Lorraine).

Nguyen, T. T. (2023). Étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la fermentation et la production de métabolites bioactifs par des micro-organismes (Thèse de doctorat, Université de Lorraine).

O

Oliveira, R. B. P., Oliveira, A., de L., Glória, M.B.A. (2008). Screening of lactic acid bacteria from vacuum packaged beef for antimicrobial activity. *Brazilian journal of microbiology*, 39(2), 368–374.

P

Pasteur, L. (1864). Mémoire sur la fermentation acétique. Annales scientifiques de l'École Normale Supérieure, 1, 113–158.

Parvez, S., Malik, K. A., Kang, S. A., & Kim, H. Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. Journal of Applied Microbiology, 100(6), 1171–1185.

Penland, M. (2020). *Etude de la diversité microbienne de produits fermentés traditionnels méditerranéens: olives de table et fromage de chèvre* (Doctoral dissertation, Université de Bretagne occidentale-Brest).

Pereira, GA, Santos, EM, Araújo, GGL, Oliveira, JS, Pinho, RMA, Zanine, ADM, ... et Nascimento, TVC (2019). Isolement et identification des bactéries lactiques dans les plantes fraîches et dans l'ensilage d'Opuntia et leurs effets sur la fermentation et la stabilité aérobie de l'ensilage. *Le Journal des sciences agricoles*, 157 (9-10), 684-692.

Poupet, C. (2020). Caractérisation in vivo des propriétés antimicrobiennes de la souche probiotique Lcr35 Utilisation du modèle *Caenorhabditis elegans* pour l'étude des interactions hôte-microorganismes (Doctoral dissertation, Université Clermont Auvergne (UCA)).

Q

Quimeby, L. M. (2024). Le microbiote intestinal, la clé de notre santé mentale Implication de l'axe intestin-cerveau dans la physiopathologie de la dépression et de la maladie de Parkinson (Thèse de doctorat en pharmacie, Université de Bordeaux, soutenue le 28 juin 2024).

R

RAMMALI, S. (2022). Contribution à la caractérisation moléculaire de nouvelles souches de *Streptomyces* productrices de métabolites antimicrobiens, antioxydants et anticancéreux isolées d'écosystèmes telluriques extrêmes marocains.

Richoux, R., & Kerjean, J. R. (1995). Caractérisation technologique de souches pures de bactéries propioniques : test en minifabrication de fromages à pâte cuite. *Le lait*, 75(1), 45-59.

S

Saidi, N., Guessas, B., Bensalah, F., Badis, A., Hadadji, M., Henni, D. E., ... & Kihal, M. (2002). Caractérisation des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre des régions arides d'Algérie. *Journal. Algérien des Régions Arides*, (01), 1-10.

Saidi, Y. (2020). Biodiversité de la microflore lactique du lait cru de dromadaire et évaluation de ses caractères technologiques.

Sarıtaş, S., Portocarrero, A. C. M., Miranda López, J. M., Lombardo, M., Koch, W., Raposo, A., ... & Witkowska, A. M. (2024). The Impact of Fermentation on the Antioxidant Activity of Food Products. *Molecules*, 29(16), 3941.

Settanni, L., & Moschetti, G. (2010). Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology*, 27(6), 691-697.

Sharma, R., Garg, P., Kumar, P., Bhatia, SK, et Kulshrestha, S. (2020). Fermentation microbienne et son rôle dans l'amélioration de la qualité des aliments fermentés. *Fermentation*, 6 (4), 106.

Smoragiewicz, W., Bielecka, M., Babuchowski, A., Boutard, A., & Dubeau, H. (1993). Les probiotiques. Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal .

T

Tahar Berrabah, C. et Tahar Berrabah, F. (2020). Isolement et caractérisation des lactobacilles à partir du lait de chèvre.

Tailliez, P. (2001). Mini-revue : les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y a près de 3 milliards d'années. *Le Lait*, 81, 1-11.

V

Van de Guchte, M., et al. (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82(1-4), 187–216.

Ventosa, A., & Arahal, D. R. (2011). Microbial life in hypersaline environments: classification and adaptations of halophilic bacteria. *Extremophiles*, 15(3), 321-330

W

World Gastroenterology Organisation.(2011, octobre). Probiotiques et prébiotiques (Version française des lignes directrices mondiales).

Y

Y. Rivera-Espinoza, Y. Gallardo-Navarro, Non-dairy probiotic products Food Microbiology, 27 (1) (2010), pp. 1-11, 10.1016/j.fm.2008.06.008

Yakoob, R., & Pradeep, B. V. (2019). Bifidobacterium sp. comme agent probiotique : rôles et applications. Journal of Pure and Applied Microbiology, 13(3), 1407-1417.

Yao, A. A., Egounlety, M., Kouame, L. P., & Thonart, P. J. A. M. V. (2009). Les bactéries lactiques dans les aliments ou boissons amylacés et fermentés de l'Afrique de l'Ouest: leur utilisation actuelle. Ann. Méd. Vét, 153, 54-65.

Z

Zarour, K., Benmechernene, Z., Hadadji, M., Moussa-Boudjemaa, B., Henni, J. E., & Kihal, M. (2013). Caractérisation microbiologique et technologique des espèces de Leuconostoc mesenteroides isolées du lait cru de chèvre et de chamelle d'Algérie. Nature & Technology, (8), 39A.

Zayukua, E. B., Umba, J. D. M. B., Kusika, C. N., Masimango, T. N., & Lufimpadio, J. G. N. (2019). Contribution à l'analyse microbiologique des poulets, des chinchards (Trachurus trachurus) et des poissons salés vendus à Kinshasa en vue de la sensibilisation à la méthode ISO-22000: 2005 HACCP. Journal of Animal & Plant Sciences, 42(2), 7256-7268.

Zhang, F., Jiang, M., Wan, C., Chen, X., Chen, X., Tao, X., Shah, N. P., and Wei, H. (2016). Screening probiotic strains for safety : Evaluation of virulence and antimicrobial susceptibility of enterococci from healthy Chinese infants. Journal of Dairy Science, 99(6), 4282-4290

Zulkawi, N., Ng, K. H., Zamberi, R., Yeap, S. K., Satharasinghe, D., Jaganath, I. B., Jamaluddin, A. B., Tan, S. W., Ho, W. Y., Alitheen, N. B., & Long, K. (2017). In vitro characterization and in vivo toxicity, antioxidant and immunomodulatory effect of fermented foods; Xeniji™. BMC complementary and alternative medicine, 17(1), 344.

Annexes

Annexe 01 : La composition des milieux de cultures utilisées

Gélose MRS	Gélose M17
Peptone 10 g Extrait de viande 10 g Extrait de levure..... 5 g Glucose20 g Tween 801ml Phosphate dipotassique 2 g Acétate de sodium 5 g Citrate triammonium 2 g Sulfate de magnésium0,20 g Sulfate de manganèse 0,05 g Eau distillée 1000 ml Ph 6,2. Stériliser par autoclavage 120°C pendant 15min	Peptone de caséine 2,50 g Peptone de viande 2,50 g Peptone de soja5 g Extrait de levure 2,50 g Extrait de viande 5 g Lactose 5 g Glycérophosphate de Sodium 19 g Sulfate de magnésium 0,25 g Acide ascorbique 0,50 g Agar 15 g Eau distillée 1000 ml Ph 7,2. Stériliser par autoclavage 120°C pendant 15min
Bouillon nutritif	Gélose nutritif
Extrait de viande 5g Peptone10 g Chlorure de sodium 5 g Eau distillée1000 ml Ph 7.2.Stériliser par autoclavage 120°pendant 20 min	Peptone 10 g Extrait de viande 10 g Extrait de levure..... 5 g Glucose 20 g Tween 80 1ml Phosphate dipotassique 2 g Acétate de sodium 5 g Citrate triammonium 2 g Sulfate de magnésium 0,20 g Sulfate de manganèse 0,05 g Eau distillée 1000 ml Ph 6,5+ou- 0.1. Stériliser par autoclavage 120°C pendant 15min

Bouillon MRS	Mueller Hinton
Peptone.....10g	Extrait de viande 2 g
Extrait de levure.....5g	Hydrolysate acide de caséine..... 17.5 g
Extrait de viande10g	Amidon 1.5 g
Glucose20g	Agar10 g
Polysorbate 80.....01g	Ph finale 7.4
Citrate d' ammonium.....2g	
Acétate de sodium5g	
Sulfate de magnésium.....0.1g	
Sulfate de manganèse0.05g	
Phosphate disodique02g	

Annexe 02 : La composition des réactifs et colorants utilisée

Violet de gentiane	Lugol
Violet de gentiane10 g	Iode5 g
Phénol 5 g	Iodure de potassium10 g
Ethanol à 0.95 20 cm ³	Eau distillé1dm ³
Eau distillé 1dm ³	
Fuchsine de Ziehl	
Fuchsine basique..... 10 g	
Phénol 50 g	
Ethanol 0.5 cm ³	
Eau distillée 1 dm ³	

Annexe 03 : Matériels non biologiques



Etuve



Autoclave



Bain marie



Vortex



Bec Bunsen



Microscope



Balance



Agitateur



Plaque chauffante

Annexe 04

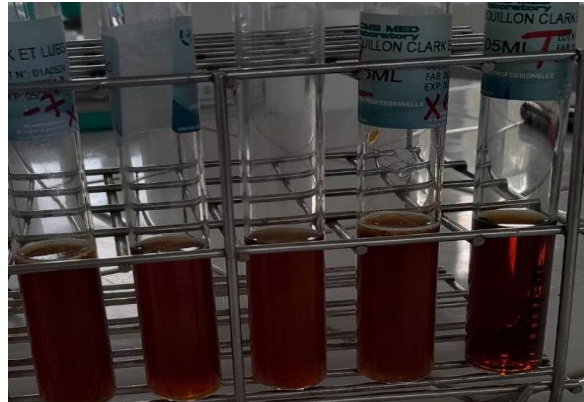


Figure 1 : observation macroscopique de trouble dans des bouillons MRS



Figure 2 : observation macroscopique de test de catalase

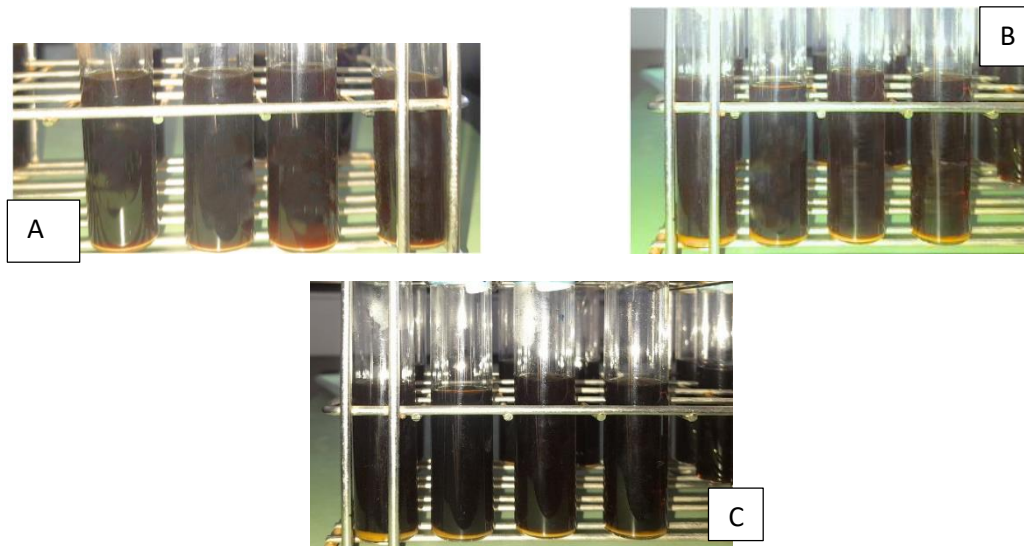


Figure 3 : Aspect macroscopique des bactéries lactiques obtenues après 5 jours d'incubation (A) :3% ;(B) :6.5% ;(C) :9.6%

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université SAAD DAHLEB Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département De Biologie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV

Filière Sciences Biologiques

Option : Microbiologie

Thème

**Isolement et caractérisation des bactéries lactiques à
partir du milieu de fermentation des glands**

Présenté par :

Bouleghebar Bouchra

Akir chainez

Date de soutenance:

Le 07/07/2025

Devant le jury:

- Fares R.
- Benhoua I.
- Kadri F.
- Boumeridja S.

MCB/USDB
MCB/USDB
MCA/USDB
INGENIEURE P

Présidente
Examinatrice
Promotrice
Co-promotrice

Benhoua I.

2024/2025