

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Blida 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire de fin d'étude
En vue d'obtention du diplôme de Master
Option : Microbiologie

**Etude de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques vis-à-vis
des souches pathogènes ATCC**

Présenté par :

Date de soutenance : 13 /07/2023

- **Mlle BAKLI Rania**
- **Mr ZOUIKRI Ahmed Nabil**

Devant le jury :

Mme BENAOU M.	MAA/USDB	Présidente
Mme AIT SAADI N.	MCA/USDB	Examinatrice
Mme BENHOUNA I.	MCB/USDB	Promotrice

Promotion: 2022-2023



Remerciements

Tout d'abord, nous remercions **Allah**, notre créateur tout puissant de nous avoir donné la force, la volonté et le courage de mener ce modeste travail à terme.

Nous tenons tout particulièrement à remercier chaleureusement notre promotrice Dr, **Mme Benhouma** pour nous avoir proposé ce sujet intéressant et accepté de nous encadrer

, merci aussi pour votre sagesse en matière


D'orientation et de conseils. Veuillez trouver ici, l'expression de notre profond respect et mes sincères remerciements.

Nous remercions les membres de jury d'avoir accepté d'évaluer ce modeste travail :

A madame **BENABOU**, Présidente du jury : Nous vous remercions de l'honneur et le plaisir d'accepter la présidence du jury de ce mémoire dont je lui exprime notre haute considération.

A madame **Ait Saadi** membre du jury. Nous désirons vous remercier d'avoir aimablement accepté d'examiner ce travail, Trouver ici le témoignage de notre reconnaissance et de notre profond respect.

Nous exprimons également nos remerciements à tous les enseignants de faculté de science de la nature et de la vie, et tous ceux qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.





Dédicace :

Nous rendons grâce à Allah le tout puissant « hamdoalleh »

Je dédie ce modeste travail

Tout d'abord mes parents Bakli Slimane et Ben Sherif Aicha ;

Ma chère mère, la lumière de ma vie qui guide mes routes et qui m'emmènes aux chemins de la réussite c'est grâce à toi que je dois toute ma réussite. Merci pour ton amour, tes sacrifices et tes mots d'encouragement qui m'ont toujours donné la force afin de continuer ce long chemin. Aucune dédicace ne sera suffisante pour exprimer ma gratitude envers tout ce que tu as fait pour moi. Je t'aime mama.

Mon cher père à l'homme de ma vie qui m'a toujours encouragé et soutenu durant toutes mes années d'études. Merci pour les valeurs noble, l'éducation et ta confiance totale .J'espère t'avoir fait honneur avec mon modeste travail. Je t'aime papa

Je ne pourrai jamais oublier d'exprimer ma profonde gratitude à :

A Mes frères : Racine, Daoud qui m'ont encouragé et soutenu dans les moments les plus difficiles.

A mes chères sœurs: Amina, Karima, Tkram qui m'ont poussé à travailler et à réussir

A mes oncles et à ma tante, chère à mon cœur, Samira et sa famille.

A Mon grand père et ma grand-mère que dieu vous donne une longue vie.

À ma source de joie et mon soutien moral mon fiancé Omar merci pour ton soutien et tout le bonheur que tu m'as donné depuis que tu es entré dans ma vie et spécial dédicace pour ma belle-famille ; ma deuxième famille.

A mes très chères amies : Mriem, Tkram, Nourhan, Foussera , Wahiba , Lydia , Areej , Soumia , Dina , Raounak... avec lesquelles j'ai partagé des bons souvenirs, je vous remercie pour votre présence.

Je remercie énormément Mon binôme Nabil pour m'aider à tout moment difficile, je vous remercie pour votre compréhension et compatibilité durant cette année je vous souhaite que de la réussite.

À tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ce travail, j'exprime mes profonds remerciements.

En fin je dédie ce travail à tous les étudiants de la promotion 2023, Microbiologie.

Rania





Dédicace :

*Avant toute chose, je remercie ALLAH le miséricordieux de m'avoir donné le courage
et la patience d'achever ce modeste travail que*

Je dédie avant tout à mes parents, ma mère, Driouèche Wahiba Thoreya et

Mon père Rachid, puisse dieu leur accorder longue vie.

À ma grand-mère qui est comme une deuxième mère pour moi avec toute

Sa bonté.

*A mon petit frère Nidhal ainsi que mes oncles, Hocine El drup et feu mon oncle Dr,
ZOUKRO Mohammed, que dieu l'accueille en son vaste paradis.*

A Ma meilleure amie F. Nihal pour son support continue,

A mon ami M. Fanis pour son aide durant la période du mémoire,

Et tous mes sincères remerciements à mes amis, sans oublier Mr, Hammèdeche.

*Mes pensées pleines de gratitude vont particulièrement aux enseignants (tes) qui m'ont
accompagné tout au long de mon cursus universitaire.*



Ahmed Nabil

Résumé :

Les bactéries lactiques possèdent de nombreuses propriétés technologiques qui leur donnent un rôle remarquable dans l'industrie agro-alimentaire car elles sont utilisées en fermentation, et bioconservation des aliments. Grâce à leur capacité de produire une variété de substances antimicrobiennes capables d'éliminer les microorganismes pathogènes.

De plus, actuellement, les bactéries lactiques sont utilisées sous forme de probiotiques jouant le rôle d'additifs alimentaires qui agissent positivement sur la santé de l'homme.

A partir d'un échantillon de lait de chamelle de la région d'Adrar, on a isolé 20 isolats lactiques dont les caractéristiques microscopiques et physiologiques sont les suivantes : Gram positif, forme cocci, et catalase négative. L'identification phénotypique des isolats a démontré qu'ils appartiennent au genre des *Enterococcus*.

L'étude de l'activité antimicrobienne vis-à-vis des germes pathogènes (Gram+ et Gram-) a été réalisée par contact direct entre les souches inhibitrices, et les souches indicatrices (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Klebsiella sp.*). Tandis que la recherche des bactériocines a été effectuée par la méthode de diffusion par puits, testée sur les surnageant de 9 isolats étudiés (8, 10, 11, 8A, 24, 25, 26, 27, 34).

Les résultats de l'activité antimicrobienne ont révélé que les 20 isolats sélectionnés excrètent dans le milieu de culture des substances inhibitrices capables d'inhiber la croissance de *Listeria monocytogène*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella sp*, en excluant *Pseudomonas aeruginosa*.

Par contre, la recherche des bactériocines par la méthode de diffusion par puis a donné un résultat négatif pour toutes les souches étudiées, témoignant l'incapacité des souches à produire des bactériocines.

Mots clés : Activité antimicrobienne, Bactéries lactiques, Bactériocines, Lait de chamelle, Souches pathogènes ATCC.

المخلص

تحتوي البكتيريا اللبنية على العديد من الخصائص التكنولوجية التي تعطيها دورا ملحوظا في صناعة الأغذية لأنها تستخدم في التخمير والحفظ الحيوي للغذاء بفضل قدرتها على إنتاج مجموعة متنوعة من المواد المضادة للميكروبات القادرة على القضاء على الكائنات الدقيقة الممرضة. وبالإضافة إلى ذلك، تستخدم البكتيريا اللبنية حاليا في صورة بروبيوتيك تعمل كمضافات غذائية لها تأثير إيجابي على صحة الإنسان.

أخذنا عينة من حليب الإبل من منطقة ادرار وتحصلنا على 20 سلالات من حمض اللاكتيك والتي كانت خصائصها الميكروسكوبية والفسولوجية هي موجب الغرام شكل كروي وسالب الكاتلاز، أظهر التعرف على *Enterococcus* النمط الظاهري للعزلات أنها تنتمي إلى جنس وقد أجريت دراسة النشاط المضاد للميكروبات ضد الجراثيم المسببة للأمراض (موجبة الجرام وسلبية الجرام) من خلال الاتصال المباشر بين السلالات المثبطة والسلالات المؤشرة:

(*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella sp.*)

في حين أن التحقيق في البكتريوسين تم بواسطة طريقة نشر الأبار، وتم اختبارها على المواد الطافية ل 9 سلالات المدروسة. (8, 10, 11, 8A, 24, 25, 26, 27, 34).

أظهرت نتائج النشاط المضاد للميكروبات أن العشرين السلالة المختارة تفرز في وسط الاستزراع مواد مثبطة قادرة على تثبيط نمو البكتيريا الممرضة *Listeria monocytogène*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* *Pseudomonas aeruginosa*. باستثناء *Klebsiella sp.*

من ناحية أخرى، أعطى البحث عن البكتريوسينات بطريقة الانتشار نتيجة سلبية لجميع السلالات المدروسة، مما يدل على عدم قدرة السلالات على إنتاج البكتريوسينات.

الكلمات المفتاحية: البكتريا اللبنية، البكتريوسين، حليب الإبل، النشاط المضاد، السلالات المسببة للأمراض ATCC.

Abstract:

Lactic acid bacteria have many technological properties, which give them a remarkable role in the food industry because they are used in the fermentation and biopreservation of food. Thanks to their ability to produce a variety of antimicrobial substances capable of eliminating pathogenic microorganisms.

In addition, currently, lactic acid bacteria are used in the form of probiotics acting as food additives, which have a positive effect on human health.

From a sample of camel milk from the Rouissat region (Adrar), 20 lactic acid strains were isolated whose microscopic and physiological characteristics are: Gram positive, coccoid form and catalase negative, the phenotypic identification of the isolates demonstrated that they belong to the genus *Enterococcus*.

The study of antimicrobial activity against pathogenic germs (Gram + and Gram-) is carried out by direct contact between inhibitory strains and indicator strains (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella sp.*). While the search for bacteriocins has been demonstrated by the well diffusion method, tested on the supernatants of nine strains studied. (8, 10, 11, 8A, 24, 25, 26, 27, 34).

The results of the antimicrobial activity revealed that the 20 selected strains excreted in the culture medium inhibitory substances capable of inhibiting the growth of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *klebsiella sp.*, except for *Pseudomonas aeruginosa*.

On the other hand, the search for bacteriocins by the diffusion method then gave a negative result for all the strains studied, testifying to the inability of the strains to produce bacteriocins.

Keywords: Antibacterial activity, Bacteriocins, Camel milk, Lactic acid bacteria, ATCC Pathogenic strains.

Table des matières

Remerciement

Dédicace

Résumé

الملخص

Abstract

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction..... 1

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

1	Les bactéries lactiques :.....	4
1.1	Généralité :	4
1.2	Définition :	4
1.3	Classification :.....	5
1.4	L'intérêt d'utilisation des bactéries lactiques :.....	7
1.4.1	Dans le secteur alimentaire :.....	7
1.4.2	Dans le domaine de la santé :	8
2	Activité antimicrobienne :.....	10
2.1	Les métabolites antimicrobiens non peptidiques :.....	11
2.1.1	Les acides organiques :.....	11
2.1.2	Le peroxyde d'hydrogène :.....	11
2.1.3	Le dioxyde de carbone :	12
2.1.4	Reutéline :	12
2.1.5	Le diacétyle :	12
2.2	Les métabolites antimicrobiens peptidiques : Les bactériocines.....	13
2.2.1	Définition :	13
2.2.2	Classification des bactériocines :.....	13
2.2.3	Mode d'action de bactériocine :	15
2.2.4	Applications potentielles des bactériocines :.....	16

Provenance des échantillons :.....	20
3 Identification phénotypique :.....	20
3.1 Isolement et purification des isolats :	20
3.2 Examen macroscopique :.....	21
3.3 Examen microscopique :	21
3.4 Caractéristique biochimique :.....	22
3.4.1 Test de catalase :.....	22
3.4.2 Profil fermentaire :	22
3.4.3 Test de résistance au pH 9,6 :.....	22
3.4.4 Test bile esculine :.....	23
3.4.5 Test de dégradation d'arginine :	23
3.5 Confirmation de la pré-identification :	23
4 Etude de l'activité antimicrobienne :.....	25
4.1 Méthode directe (spot agar test (Fleming et al., 1975)):	25
4.2 Méthode indirecte (diffusion par puits) :.....	26
5 Résultats :.....	29
5.1 Identification phénotypique :.....	29
5.1.1 Vérification de la pureté des isolats :.....	29
❖ Examen macroscopique :.....	29
❖ Examen microscopique :	29
5.2 Caractéristique biochimique :.....	29
5.2.1 Test de catalase :.....	29
5.2.2 Profil fermentaire :	30
5.2.3 Test de bile esculine :	30
5.2.4 Résultat du test de résistance a pH 9,6 :	31
5.2.5 Résultat de dégradation d'arginine :.....	31
5.3 Pré-identification des isolats :	32
5.4 Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des isolats lactiques :	33
5.4.1 L'activité antimicrobienne directe (Spot Agar Test) :.....	33
5.4.2 L'activité antimicrobienne Indirect (Méthode par puits) :	34
6 Discussion :	36
6.1 Identification phénotypique :.....	36
6.2 Caractéristiques Biochimiques :.....	36
6.2.1 Test de catalase :.....	36
6.2.2 Test du profil fermentaire :.....	36

6.2.3	Test de résistance au pH 9,6 :.....	36
6.2.4	Test de bile esculine :	37
6.2.5	Test de dégradation d'arginine :	37
6.3	Identification des Isolats :.....	37
6.4	Activité antimicrobienne :	38
6.4.1	L'activité antimicrobienne direct :	38
•	L'Activité antimicrobienne vis-à-vis <i>Escherichia coli</i> :.....	38
•	L'Activité antimicrobienne vis-à-vis <i>Staphylococcus aureus</i> :	38
•	L'Activité antimicrobienne vis-à-vis <i>Listeria monocytogène</i> :	39
•	L'Activité antimicrobienne vis-à-vis <i>Pseudomonas aeruginosa</i> :	39
•	L'Activité antimicrobienne vis-à-vis <i>Klebsiella sp.</i> :	39
	Conclusion	40
	Références bibliographiques	41
	Annexes	52

Liste des tableaux :

Tableau I : Métabolites antimicrobiens de faible masse moléculaire secrétés par les bactéries lactiques autres que les bactériocines (Leonard, 2013)	10
Tableau II : Récapitulatif des tests d'identification des 20 isolats.	33
Tableau III : Résultats de l'activité antimicrobienne directe des 20 isolats + amoxicilline contre les 5 souches pathogènes.	34

Liste des figures :

Figure 1 : Arbre phylogénétique des bactéries lactiques (Holzapfel et al., 2014).....	6
Figure 2: Mode d'action des bactériocines (Yanget al., 2014)	16
Figure 3 : Mise en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode spots sur agar (Fleming et al., 1975).....	26
Figure 4 : Observation microscopique des Cocci à Gram + sous microscope photonique, grossissement 1250x.....	29
Figure 5 : les résultats du test du profil fermentaire des isolats (gauche) et la comparaison avec un témoin (droite).....	30
Figure 6: résultats positifs du test de bile esculine	30
Figure 7 : résultats du test de résistance au pH 9,6 (gauche) et une comparaison avec le témoin (droite).....	31
Figure 8 : résultat de la dégradation d'arginine négatif (gauche) et positif (droite).	32
Figure 9: Résultats des galeries api 20E pour les isolats 11 et 8A.	32
Figure 10 : Activité antimicrobienne directe des souches (de gauche à droite Staphylococcus aureus, Listeria monocytogène, Escherichia coli)	34
Figure 11: Activité antimicrobienne indirecte (de gauche à droite : Pseudomonas aeruginosa, Listeria monocytogène, Klebsiella sp.)	35

Liste des abréviations :

ADH : Arginine Dihydrolase

ADN : acide désoxyribonucléique

API : Appareils et Procédés d'Identification

ATCC: American Type Culture Collection.

ATP : Adénosine triphosphate

BEA : Bile esculine agar

BL : Bactéries lactiques

CG: CytosineGuanine

CIT: Citrate

DO: Densité optique.

EPS: Exopolysaccharide

Gel: Gélatine

GRAS: Generally Recognized as Safe

IND: Indole

KDa: kilo dalton

LB: Lactobacille

LDC: Lysine Decarboxylase

MH: Mueller Hinton

MRS: De Man- Rogosa et Sharp.

ODC: Ornithine Decarboxylase

RPM: Rotation par minute

TDA: Tryptophane désaminase

URE : Urée

VP : Voges-Proskauer

W : Weissella

ZDI : diamètre de zone d'inhibition

INTRODUCTION

Introduction :

En 1909, le congrès international de la répression des fraudes a défini le lait comme : « le lait est le produit intégral de la traite totale interrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum » **(Benyoucef, 2018)**.

Le lait de chamelle est d'une couleur blanche opaque. Cette couleur est notamment due à la structure et la composition de sa teneur en matière grasse, relativement pauvre en β -carotène. Il est un peu sucré, avec un goût acide, parfois même salé et ou amère **(MERZOUK, 2015)**. C'est un élément important pour le régime alimentaire humain dans de nombreuses régions du monde, et il est considéré aussi comme un aliment clé des différentes régions de Sahara. Notamment pour les peuples nomades, il ressemble un peu à celui de la vache, mais il a une similitude parfaite à celui du lait maternel **(Siboukeur, 2007)**.

Les bactéries lactiques sont des microorganismes présentant des caractéristiques morphologiques, physiologiques, et métaboliques variées **(Dridier et Prévost, 2006)**. On les trouve essentiellement dans les produits laitiers (yaourt, fromage, leben, etc.), mais aussi dans d'autres niches écologiques en étant seules ou en association avec d'autres microorganismes bénéfiques comme les levures **(Novel, 1993)**.

Les bactéries lactiques sont largement utilisées dans l'industrie alimentaire, en tant que starters dans les procédés de fermentations afin de répondre aux exigences croissantes des consommateurs en produits alimentaires moins traités et exempts de conservateurs chimiques **(Benguella, 2015)**. Leurs apports bénéfiques consistent à améliorer la qualité des produits fermentés en développant certaines caractéristiques organoleptiques sans altérer le goût ni l'odeur, tout en augmentant leur durée de conservation. Cette préservation est conférée par la production de plusieurs métabolites ayant une activité antimicrobienne, tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, la reutérine, le diacétyl et les bactériocines **(Dortu et Thonart, 2009 ; Moraes et al., 2010)**.

L'intérêt des bactériocines des bactéries lactiques réside dans leur effet antimicrobien, qu'il soit à spectre large ou étroit, ainsi que dans leur sécurité pour la santé humaine en raison de leur sensibilité aux protéases digestives et de leur non toxicité pour les cellules eucaryotes. Ces

substances antimicrobiennes ont la capacité de cibler sélectivement les bactéries pathogènes ou altérantes, sans pour autant inhiber les bactéries indispensables. Ces substances bioactives présentent également une grande tolérance aux variations de pH et aux traitements thermiques. Tous ces critères suggèrent que les bactériocines peuvent être un substituant idéal des conservateurs chimiques (**Dortu et Thonart, 2009; Mehdi née Benguella, 2015**).

L'objectif de ce travail est de réaliser une étude de l'activité antibactérienne de certaines bactéries lactiques vis-à-vis des souches pathogènes ATCC (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella*, *Listeria monocytogène*, et *Pseudomonas aeruginosa*). Ces BL ont été isolée à partir de lait de chamelle.

CHAPITRE 1 :
SYNTHÈSE
BIBLIOGRAPHIQUE

1 Les bactéries lactiques :

1.1 Généralité :

Les bactéries lactiques appartiennent à un groupe de bactéries bénéfiques qui sont très fréquentes dans la nature ainsi que dans le système digestif de l'homme (**HAMMI,I, 2016**). Elles sont constituées d'un groupe hétérogène de micro-organismes (**Tailliez, 2001**) et ont des exigences nutritionnelles complexes en facteurs de croissance tels que la vitamine B, des acides aminés, des bases azotées, des peptides (**LEONARD, 2013**). Généralement, elles sont mésophiles, mais elles sont capables de se multiplier à des températures comprises entre 5°C et 45°C, avec un pH optimal de croissance variant de 5,0 à 9,0. Elles tolèrent les milieux acides (pH 3,2) et alcalins (pH 9,6) (**LEONARD, 2013**), avec un contenu en GC de leur ADN inférieur à 50% (**BEKHOUCHE, 2006**).

1.2 Définition :

Le groupe des bactéries lactiques a été défini pour la première fois par **Orla-Jensen (1919)**. Ce sont des organismes vivants, procaryotes hétérotrophe et chimio-organotrophes (**BELARBI, 2011**).

Ce groupe est assez hétérogène, à Gram positif, généralement immobile, et jamais sporulé. Ils sont oxydase négatifs, anaérobies facultatifs, microaérophiles (**Ahmed-GAID, 2018**), catalase négatif, à l'exception de certaines souches possédant une pseudo-catalase. Ils sont tolérants à acidité, peuvent avoir des formes de coques ou de bacilles, et leur principal produit métabolique est l'acide lactique (**BENMOUNA, 2012**). Ces bactéries sont incapables de fermenter le glycérol, ne liquéfient pas la gélatine, ne produisent ni l'indole ni l'hydrogène sulfuré. Elles sont protéolytiques, généralement ne possèdent ni nitrate réductase ni cytochrome oxydase (à l'exception de quelques souches sous certaines conditions) (**Salminen et al., 2004, Ababsa, 2012**).

Elles sont caractérisées par leur capacité à fermenter les sucres en acide lactique. Si l'acide lactique est le principal produit final, ce sont des bactéries homo-fermentaires. Si elles produisent en plus de l'acide lactique d'autres composés (acide acétique, éthanol, CO₂ ...etc.), ce sont des hétéro-fermentaires (**SADJI.H, 2019**).

1.3 Classification :

Les BL constituent un groupe de bactérie dont la taxonomie est régulièrement mise à jour avec la progression des données moléculaires (**Federighi, 2005**). Elles appartiennent à divers genres, notamment :

- **Les Entérocoques** : ils sont composés de streptocoques fécaux (*Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*) sont toutes les deux utilisées comme probiotiques (**Devriese et al., 2006 ; Hanchi et al., 2018**).
- **Les lactobacillus** : ils se présentent sous forme de cellules immobiles, sphériques ou ovoïdes, avec une disposition en paires ou en chaînes longues (**Ababsa, 2012**). Principalement Les *Lb. helveticus* et *Lb. delbrueckii subsp. lactis* sont utilisées pour la fabrication des fromages à pâte pressée cuite, tandis que *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* peut être employé dans plusieurs autres types de fromages (**François, 2008**).
- **Les leuconostocs** : ce sont des hétéro-fermentaires obligatoires produisant de l'acide D (-) lactique, de l'éthanol et du CO₂ après la fermentation de glucose. Ces espèces ont des exigences nutritionnelles et leur croissance est toujours lente (**Björkroth et Holzappel, 2006 ; Yehia et al., 2017**) .
- **Les lactocoques** : ce sont des Cocci en paires ou en chaînes (**Lazreg, 2017**). Ce sont des bactéries homofermentaires ne produisant que de l'acide lactique L (+). Seul *Lactococcus lactis ssp. Lactis biovar. Diacetylactis* produit le diacétyl (**Tamime, 2002**). Elles sont utilisées dans l'industrie agroalimentaire, et les espèces les plus importantes sont : *Lactococcus lactis* (**Stiles et Holzappel, 1997**).
- **Weissella** : les cellules des espèces de ce genre sont ovoïdes ou de courts bâtonnets à bout ronds qui s'associent en paires ou en courtes chaînes, immobiles et hétérofermentaires (**Jang et al., 2002 ; Fusco et al., 2015**). L'intérêt porté à leur potentiel probiotique, les souches de *W. confusa* et de *W. cibaria* sont connues pour produire de grandes quantités de polysaccharides extracellulaires non digestibles, principalement du dextrane (**Benhoua, 2019**).
- **Les bifidobactéries** : elles ont la forme irrégulière d'un V ou une morphologie bifide en forme de Y. Ce genre est essentiellement un groupe probiotique dans les produits laitiers (**Issa et Tahergorabi, 2019**). Il produit de l'acide lactique et de l'acétate, ce qui entraîne une baisse du pH défavorable à la croissance d'autres germes (**Delcenserie et al., 2002**).

- **Les streptocoques** : les cellules de ce genre sont immobiles, sphériques ou ovoïdes, avec une disposition en paires ou en chaînes longues. Ce sont des commensales ou pathogènes chez l'homme et les animaux. La seule espèce de streptocoques utilisée en technologie alimentaire est *Streptococcus thermophilus* (Chandan et al., 2017).
- **Les Oenococcus** : leurs cellules sont immobiles et asporulantes, de forme ellipsoïdale à sphérique (Mokoena, 2017).
- **Les Pediococcus** : ce genre rassemble des cellules immobiles de forme sphérique, parfois ovoïdes, isolées ou en paires, qui se divisent dans deux directions perpendiculaires, formant ainsi des tétrades, mais jamais des chaînes (Buron-Moles et al., 2019). Ils sont parfois utilisés comme levains lactiques pour les charcuteries (Tosukhowong et al., 2005).
- **Les Tetragenococcus** : ont des cellules immobiles, sphériques ou ovoïdes, avec un diamètre de 0.5 - 1.0 µm, formant des tétrades après leur division dans deux directions perpendiculaires et peuvent s'isoler en paire (Buron-Moles et al., 2019). Les espèces de *Tetragenococcus* jouent un rôle crucial dans la fabrication des produits alimentaires à concentration élevée en sel, tels que les sauces de soja (Tosukhowong et al., 2005).

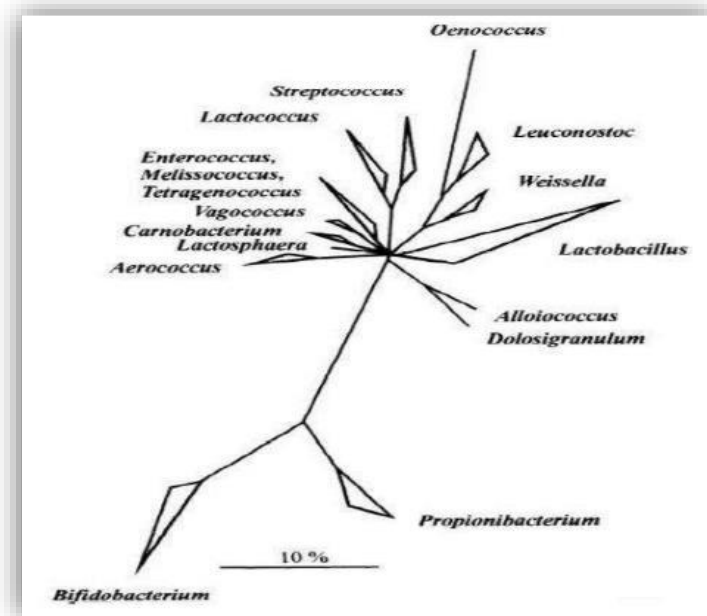


Figure 1 : Arbre phylogénétique des bactéries lactiques (Holzapfel et al., 2014)

1.4 L'intérêt d'utilisation des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques sont utilisées dans plusieurs technologies pour répondre aux besoins de l'industrie alimentaire, cosmétique, et pharmaceutique (**BOUZAID et al., 2016**).

1.4.1 Dans le secteur alimentaire :

❖ Conservation et sécurité des aliments :

L'utilisation des BL contribue à la préservation des aliments en produisant divers agents antimicrobiens naturels, tels que les acides organiques (acide lactique, acides acétiques...), le dioxyde de carbone, le peroxyde d'hydrogène, l'éthanol, les bactériocines, la reutrine, et la reutricycline, qui peuvent contribuer à l'arôme tout en préservant l'aliment contre la détérioration (**Reis et al., 2012 ; Favaro et al., 2015 ; Mir et Masoodi, 2018**).

La production in situ des bactériocines peut développer la compétitivité de la souche dans la matrice alimentaire et contribue à la préservation des aliments (**Ries et al., 2012 ; Tambaraski et al., 2018**)

❖ Amélioration de la texture :

La capacité des bactéries lactiques à synthétiser des exopolysaccharides (EPS) joue un rôle important pour la consistance et la rhéologie des produits transformés. Les *Lb. Delbrueckii ssp. Bulgaricus* et *St. thermophilus* produisant des EPS sont utilisés dans la fabrication des yaourts. Cela permet d'améliorer la texture, éviter la synérèse, et d'augmenter la viscosité (**ALLOUCHE et al., 2017**), ainsi que l'onctuosité du produit (**HAMMI, 2017**). L'utilisation de BL productrice d'EPS comme culture starter permettrait donc de répondre aux attentes des consommateurs pour des produits bio sans additifs alimentaire et d'éviter à l'industrie des étapes de purification d'EPS issus d'organisme qui n'ont pas l'appellation GRAS (généralement reconnu étant comme sans danger) (**Benhoua, 2019**).

❖ Production d'arôme et de saveur :

Les bactéries lactiques sont capables de produire de nombreux composés aromatiques tels que l'acétolactate, l'acétaldéhyde, le diacétyl, l'acétoïne et le 2,3-butanediol, ainsi que l'éthanol, l'acétate, le formiate, principalement à partir du lactose, du citrate, des acides aminés

et des matières grasses. Cette fonctionnalité est particulièrement importante lors de l'élaboration de laits fermentés, de fromages frais, de crèmes et de beurre, dont l'arôme principal est lié à cette activité microbienne (**ALLOUCHE et al., 2017**). Ils ont la capacité d'acidifier les aliments, entraînant un goût acidulé d'acide lactique, en plus d'avoir des activités protéolytiques, et lipolytiques, produisant des composés aromatiques à partir d'acides aminées qui contribuent à l'arôme du produit final (**Favaro et al., 2015**). Elles sont également capables de produire des acides et des esters gras libres pour modifier les saveurs (**CHEKHCHOUKH et al., 2016**).

1.4.2 Dans le domaine de la santé :

Le rôle des bactéries lactiques sur la santé était étudié dans le cadre des probiotiques, (**Boumediene, 2013**). **Havenaar et Hisinint Veld (1992)** ont décrit un probiotique comme « une mono ou culture mixte de microorganisme vivants bénéfiques pour l'homme et l'animal en améliorant les propriétés de la microflore indigènes » (**Rusch, 2002**).

Dans des études récentes, les bactéries lactiques ont démontré leur potentiel à promouvoir la santé cutanée et à exercer une réponse immunitaire cellulaire nécessaire à la défense cutanée (**Yan yan et al., 2014**). Ensuite, elles sont utilisées dans un processus semi-industriel pour obtenir d'autres produits fermentés avec une meilleure qualité hygiénique et à caractère thérapeutique très poussé, surtout que ces dernières années, des recherches se sont accentuées pour trouver des voies de thérapies à base des probiotiques pour le traitement de diverses maladies chroniques (**Lairini et al., 2014**).

L'utilisation des souches de *Lactobacillus crispatus* sous forme de suppositoires pour empêcher la colonisation du vagin par les bactéries pathogènes et de prévenir ainsi les rechutes chez les femmes qui souffrent d'inflammations fréquentes et répétées de la vessie (**MAHI, 2010**).

Les souches lactiques sont également utilisées dans le traitement de certaines infections telles que :

- Les diarrhées et les allergies alimentaires grâce à leur activité protéolytique.
- La prévention des gastro-entérites nosocomiales chez le nourrisson.

- Les propriétés anti-hypercholestérolémiques, la lutte contre *Clostridium difficile* et *Helicobacter pylori*, ainsi que la prévention des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (**BERRADIA AMOURIA, 2016**).

2 Activité antimicrobienne :

Les organismes microbiens disposent d'un ensemble unique de mécanismes de défense qui leur permettent de survivre et de protéger leur environnement écologique contre les concurrents et les infections. L'une de leurs premières lignes de défense consiste à produire des peptides qui interagissent directement avec d'autres micro-organismes. Ces peptides peuvent déstabiliser les membranes des bactéries, des virus ou des champignons, ou interagir avec d'autres cibles moléculaires pour protéger la niche de l'organisme (Djadouni, 2013). Diverses études ont démontré les effets inhibiteurs des bactéries lactiques sur les bactéries nuisibles (Rodrigues et al., 2005 ; Reis et al.,2012 ; Mercha et al.,2020). Les attributs antimicrobiens de ces bactéries peuvent être corrélés à de nombreux facteurs. Ceux-ci résultent de l'impact cumulé de divers aspects biologiques issus de leurs processus métaboliques, ainsi que de la production d'éléments présentant des propriétés bactériostatiques ou bactéricides, y compris, mais sans s'y limiter, l'acide lactique, les acides organiques, le diacétyle et le dioxyde de carbone (Chentouf, 2015 ; Bouzaidet al., 2016).

Tableau I : Métabolites antimicrobiens de faible masse moléculaire secrétés par les bactéries lactiques autres que les bactériocines (Leonard, 2013) .

Composés antimicrobiens	Souches productrices	Spectre microbien
Acide lactique	Toutes les bactéries lactiques	Levures Bactéries Gram+/-
Acide acétique	Bactéries lactiques hétéro fermentaires	Levures Bactéries Gram+/-
Diacétyle	<i>Lactococcus</i> <i>Leuconostoc</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Pedicoccus</i>	Levures Bactéries Gram+/-

Peroxyde d'hydrogène	Toutes les bactéries lactiques	Levures Bactéries Gram+/-
Dioxyde de carbone	Les bactéries lactiques hétérofermentaires	La plus part des groupes taxonomiques de microorganismes

2.1 Les métabolites antimicrobiens non peptidiques :

2.1.1 Les acides organiques :

Les bactéries lactiques génèrent des acides organiques tout au long du processus de fermentation, les plus importants étant l'acide lactique, l'acide acétique et l'acide propionique. Ces acides agissent comme des inhibiteurs pour les levures et autres bactéries non résistantes qui ne parviennent pas à se développer dans des environnements très acides.

La raison principale de l'impact inhibiteur des acides organiques est due à la présence de molécules non dissociées qui pénètrent les couches lipidiques des membranes microbiennes, entraînant une baisse du pH dans le cytoplasme. Cette baisse entraîne à son tour la déstabilisation des cellules. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que la baisse du pH a un impact sur les fonctions cellulaires, ce qui conduit à la mort de la cellule (**Zhitnitsky et al., 2014**).

2.1.2 Le peroxyde d'hydrogène :

Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) présente un effet antimicrobien qui peut être expliqué par la production de radicaux libres, tels que le groupement superoxyde (O₂•) et le groupement hydroxyle (OH•), capables d'endommager l'ADN bactérien. En outre, le pouvoir inhibiteur du peroxyde d'hydrogène pourrait être dû à des réactions d'oxydation des groupes sulfhydryles provoquant une modification de la conformation des protéines et donc la perte de fonction des enzymes. De plus, il peut engendrer la peroxydation des lipides membranaires, augmentant

ainsi la perméabilité de la membrane qui entoure le micro-organisme en question (**Nair et al., 2017**).

2.1.3 Le dioxyde de carbone :

Les bactéries lactiques hétérofermentaires produisent du dioxyde de carbone (CO₂) comme sous-produit métabolique secondaire. L'accumulation excessive de CO₂ dans le milieu environnant peut entraîner des conditions anaérobies nuisibles aux micro-organismes aérobies vivant dans l'aliment. Dans le même temps, de faibles niveaux de CO₂ peuvent agir comme un stimulant de la croissance pour certaines espèces bactériennes spécifiques (**Singh, 2018**).

2.1.4 Reutéline :

La reutéline, également connue sous le nom de 3-hydroxypropionaldéhyde, est une substance antimicrobienne produite comme métabolite intermédiaire lors de la fermentation anaérobie du glycérol par certaines espèces de *Lactobacillus*. La fermentation du glycérol se déroule en deux étapes distinctes. Tout d'abord, le glycérol subit une déshydratation par un glycérol déshydratase pour former de la reutéline, qui est ensuite réduite en 1,3-propanediol par une oxydoréductase. Cependant, cette deuxième étape est inhibée en l'absence de glucose. Par conséquent, la reutéline s'accumule dans les microorganismes producteurs. À des concentrations élevées, elle est excrétée dans le milieu environnant. Sa toxicité envers la cellule productrice limite sa production, bien que certaines espèces comme *Lactobacillus reuteri* montrent une résistance accrue (**Langaet al., 2014**).

2.1.5 Le diacétyl :

Le diacétyl (C₄H₆O₂) est un métabolite dérivé du citrate qui est responsable de l'arôme caractéristique de "beurre" dans les produits laitiers. De plus, il exerce une action inhibitrice sur la croissance bactérienne en interférant vraisemblablement avec les mécanismes régulateurs de l'utilisation de l'arginine. Cependant, il convient de noter que sa présence dans les aliments est généralement limitée et ne permet pas d'obtenir une activité antimicrobienne significative (**Heita, 2014**).

2.2 Les métabolites antimicrobiens peptidiques : Les bactériocines

2.2.1 Définition :

Le terme "bactériocine" a été introduit en 1964 par André Lwoff, un éminent médecin et biologiste français (**Dillenseger, 2019**). Les bactériocines sont des protéines ou des complexes de protéines dotés d'une activité bactéricide spécifiquement dirigée contre des espèces étroitement apparentées à la souche productrice. Ce sont des peptides antimicrobiens composés d'environ 20 à 60 acides aminés, synthétisés par les bactéries à l'aide de la voie ribosomique. La production de bactériocines implique des groupes de gènes ou des clusters comportant une ou plusieurs unités de transcription, génétiquement spécifiques, qui sont présents chez les bactéries à Gram positif, à Gram négatif et chez les archées (**Sidhu et Nehra, 2017**).

Les bactériocines sont généralement caractérisées par leur cationicité, leur amphiphilie et leur stabilité thermique. Elles peuvent être modifiées ou non post-traductionnellement et ont une masse moléculaire comprise entre 2 et 6 kDa. Les bactériocines constituent une vaste classe de substances antagonistes qui présentent une grande diversité en termes de poids moléculaire, de propriétés biochimiques, de spectres d'action et de modes d'action (**Taale et al., 2016**).

Ces métabolites ne sont pas classés comme des antibiotiques à proprement parler, bien qu'ils possèdent des propriétés antibiotiques, étant capables d'exercer une action bactéricide ou bactériostatique. Les bactériocines se distinguent des antibiotiques par leur mode de synthèse ribosomique, contrairement à la synthèse enzymatique des antibiotiques. De plus, elles démontrent une activité efficace à des concentrations bien plus faibles que celles des antibiotiques classiques, et leur spectre d'activité est généralement plus restreint (**Mekri, 2016 ; Djelloul, 2021**).

2.2.2 Classification des bactériocines :

La classification des bactériocines est principalement établie en fonction de plusieurs critères, dont le spectre d'action, la structure, le poids moléculaire et les mécanismes d'action des bactériocines. Sur cette base, les bactériocines sont actuellement divisées en quatre classes distinctes (**Mokdad, 2020**).

2.2.2.1 Bactériocine de classe I : lantibiotiques

Les lantibiotiques sont de petits peptides cationiques, hydrophobes et thermostables qui contiennent des acides aminés inhabituels (lanthionine et/ou méthyl lanthionine, qui sont des thioéther aminoacides) formés après la traduction. Ces protéines ont un poids moléculaire inférieur à 10 kDa et subissent des modifications post-traductionnelles. Ces modifications sont possibles grâce à la présence d'une séquence de peptides signaux qui assurent la reconnaissance, le transport et le maintien du peptide inactif. La Classe I, à laquelle appartiennent les lantibiotiques, peut être divisée en trois sous-classes : Ia, Ib et Ic. La sous-classe Ia est composée de peptides cationiques hydrophobes contenant 34 acides aminés. La sous-classe Ib regroupe des peptides globulaires chargés négativement ou sans charge, comprenant jusqu'à 19 acides aminés. La sous-classe Ic est constituée de peptides à structure cyclique formés de deux peptides agissant en synergie (Mekri, 2016 ; Gonzalez-perez et al., 2018).

2.2.2.2 Bactériocines de classe II : les peptides non modifiés

La Classe II regroupe les bactériocines qui ne possèdent pas de cycles lanthionine. Leur taille générale ne dépasse pas 10 kDa et elles sont thermostables. Ce type de bactériocines ne subit aucune modification post-traductionnelle. Leur mode d'action principal consiste à induire la perméabilisation de la membrane interne, ce qui entraîne une fuite des métabolites intracellulaires et, ultimement, la mort bactérienne. Ces bactériocines sont diverses et appartiennent à différentes sous-classes (Cherier, 2017).

- **La Classe IIa** : est caractérisée par la présence d'un deuxième pont disulfure dans leur partie C-terminale, ce qui stabilise leur structure tertiaire.
- **La Classe IIb** : nécessite l'association de deux peptides pour être actives. Il existe deux types d'associations : le type E, appelé "Enhancing", où l'association des deux peptides augmente mutuellement leur activité, et le type S, appelé "Synergie", où les deux peptides sont complémentaires.
- **La Classe IIc** : regroupe les bactériocines qui ne peuvent pas être classées dans les sous-classes IIa et IIb. Parmi celles-ci, on retrouve la plantaricine A, la lactococcine A, la lactococcine 972, et d'autres encore (Dillenseger, 2019).

2.2.2.3 Bactériocines de classe III : Bactériolysines

Les bactériocines appartenant à la Classe III sont des protéines de taille supérieure à 30 kDa, sensibles à la chaleur, et sont principalement des endopeptidases. Leur structure et leur mode

d'action différent considérablement des autres bactériocines produites par les bactéries lactiques. Cette classe comprend quatre bactériocines : l'helveticin, l'enterolysine A, la zoocin A et la millericin B, qui sont produites respectivement par *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus zooepidemicus* et *Streptococcus milleri* (Djelloul, 2021).

2.2.2.4 Bactériocines de Classe IV : Bactériocine complexe

La Classe IV englobe les peptides qui requièrent une composante lipidique ou glucidique pour exercer leur activité. Jusqu'à présent, aucune bactériocine appartenant à cette classe n'a été répertoriée (Makhloufi, 2012).

2.2.3 Mode d'action de bactériocine :

Les bactériocines présentent des mécanismes d'action distincts et peuvent être divisées en deux catégories : celles qui favorisent ou causent un effet bactéricide, avec ou sans lyse cellulaire, et celles qui ont un effet bactériostatique, inhibant la croissance cellulaire. Les bactériocines altèrent la perméabilité membranaire des bactéries, inhibent la synthèse de leur peptidoglycane ou détruisent les liaisons peptidiques entre les peptidoglycanes (Nes et al., 2011).

Les lantibiotiques, qui sont des bactériocines de classe I, exercent leur action en interagissant avec les membranes cellulaires. Ces interactions sont principalement basées sur des interactions électrostatiques ou la liaison à des récepteurs spécifiques. Lorsque les lantibiotiques se fixent, ils induisent la formation de pores larges et non spécifiques à la surface des cellules cibles, entraînant un efflux rapide des composés cytoplasmiques tels que les ions, l'ATP et les acides aminés. Cette augmentation de la perméabilité membranaire conduit à la destruction des bactéries cibles. De manière similaire, les bactériocines de classe II agissent en provoquant la perméabilisation de la membrane, ce qui entraîne la mort cellulaire. En revanche, les bactériocines de classe III ont un mode d'action complètement différent. Elles agissent en hydrolysant les liaisons peptidiques entre les peptidoglycanes présents dans la membrane des bactéries sensibles. Le spectre d'action des bactériocines varie en fonction du nombre de bactéries sensibles, ce qui peut être étroit pour certaines, telles que la zoocine A, ou large pour d'autres, comme l'entérolysine A et la millericine B (De freireBastos et al., 2015 ; Bali et al., 2016 ; Tenea et Yépez, 2016).

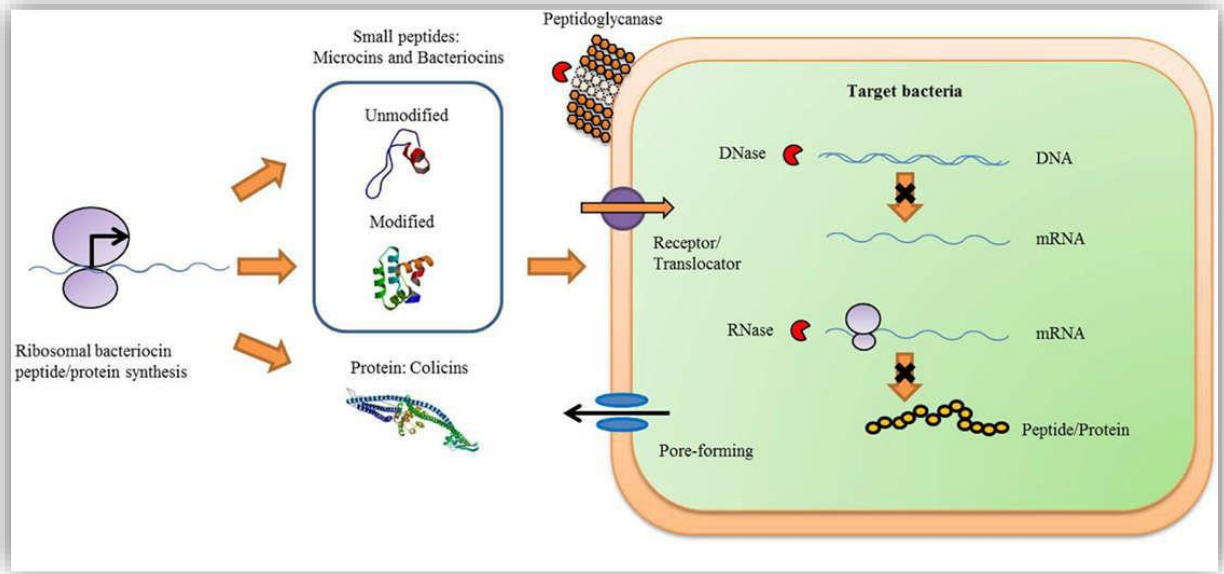


Figure 2: Mode d'action des bactériocines (Yanget al., 2014) .

2.2.4 Applications potentielles des bactériocines :

2.2.4.1 Domaine alimentaire :

Les bactériocines sont des composés incolores, inodores et sans saveur, ce qui les rend compatibles avec l'acceptabilité des aliments lorsqu'elles sont utilisées comme suppléments. Cependant, leur stabilité peut être compromise par la présence d'enzymes dans l'hôte ou l'environnement, entraînant une dégradation des bactériocines. Cette dégradation réduit la capacité des fragments dégradés à interagir avec les souches cibles et diminue les risques de développement de résistance. Néanmoins, l'utilisation des bactériocines dans l'industrie alimentaire est devenue extrêmement intéressante en raison de leur potentiel à assurer la sécurité microbiologique et la qualité des produits alimentaires. L'utilisation de bactériocines comme additifs naturels dans les aliments a suscité un intérêt croissant de la part des consommateurs, qui cherchent à minimiser l'utilisation d'additifs chimiques artificiels dans leur alimentation. De nombreuses études ont démontré l'efficacité de la nisine en tant qu'agent de conservation dans divers produits alimentaires tels que la truite fumée, les produits à base d'œufs liquides pasteurisés, les fromages et autres produits laitiers. En réalité, la nisine est la bactériocine la plus étudiée et la seule utilisée commercialement dans l'industrie alimentaire. Son utilisation témoigne de l'intérêt croissant pour l'application des bactériocines dans le

domaine alimentaire, en tant qu'alternative prometteuse aux additifs chimiques traditionnels, tout en répondant aux exigences des consommateurs soucieux de la sécurité et de la qualité alimentaire (**Egan et al., 2016**).

2.2.4.2 Domaine thérapeutique :

Face à l'augmentation alarmante des infections causées par des bactéries résistantes aux antibiotiques, la recherche s'est orientée vers de nouvelles molécules antimicrobiennes pour lutter contre l'émergence de la résistance chez les bactéries pathogènes (**Bemena et al., 2014**). Les bactériocines, grâce à leur mode d'action distinct des antibiotiques conventionnels, pourraient représenter une alternative prometteuse dans le contrôle de la prolifération et l'inhibition des souches bactériennes pathogènes émergentes, ainsi que dans le traitement d'infections cutanées, systémiques, urogénitales, gingivales, mastitiques, otitiques, etc. Il est donc urgent de trouver des solutions efficaces pour faire face à ce problème de santé publique, et les bactériocines offrent un potentiel intéressant en tant qu'agents antimicrobiens ciblés et spécifiques. Leur utilisation pourrait contribuer à réduire la dépendance aux antibiotiques traditionnels et à prévenir la propagation de la résistance aux médicaments. Toutefois, des études supplémentaires sont nécessaires pour évaluer pleinement leur efficacité, leur sécurité et leur applicabilité dans diverses situations cliniques (**Chikindas et al., 2018**).

Effectivement, des études ont montré que les bactériocines pourraient avoir une activité contre les cellules tumorales dans le contexte du traitement du cancer. Par exemple, des recherches in vitro ont démontré que la nisine, une bactériocine bien étudiée, peut inhiber la croissance des cellules tumorales. De plus, d'autres peptides antimicrobiens ont également montré des résultats prometteurs in vitro en tant que potentiels médicaments anticancéreux.

Ces observations suggèrent que les bactériocines pourraient être explorées en tant qu'agents thérapeutiques dans le traitement du cancer. Cependant, il convient de noter que les études in vitro constituent les premières étapes de recherche et que des études supplémentaires sont nécessaires pour évaluer l'efficacité et la sécurité des bactériocines in vivo, c'est-à-dire dans des modèles animaux et des essais cliniques sur les patients atteints de cancer (**Chikindas et al., 2018 ; Ibrahim, 2019**).

En raison de leur nature peptidique, il est possible de modifier génétiquement les bactériocines afin de développer des peptides spécialement conçus pour être plus sûrs, stables et efficaces dans le traitement des maladies. Ces modifications génétiques permettent de créer des

médicaments sur mesure qui répondent aux besoins spécifiques des traitements (**Cotter et al., 2013 ; Chikindas et al., 2018**).

2.2.4.3 Domaine vétérinaire :

Les bactériocines peuvent être utilisées en combinaison avec des ionophores dans une stratégie visant à prévenir l'apparition de résistances. L'utilisation intermittente de bactériocines plutôt que d'antibiotiques permettrait de détruire les populations bactériennes résistantes. Contrairement aux ionophores antibiotiques qui ont un large spectre d'action et peuvent affecter une grande partie de la flore naturelle présente dans le rumen des bovins, les bactériocines sont extrêmement spécifiques. Cela permet de cibler sélectivement, par exemple, les bactéries responsables de la dégradation des protéines alimentaires ou celles qui produisent du méthane.

Un autre avantage des bactériocines est qu'elles sont des protéines non toxiques et facilement digestibles. Comme elles sont digérées par l'animal, il n'y a aucun risque de résidus dans la viande ou le lait. En revanche, les ionophores antibiotiques classiques ne sont pas digestibles, sont hautement toxiques et nécessitent une manipulation et une administration prudentes (**Menad,2017**).

2.2.4.4 Domaine agricole :

Les bactériocines sont utilisées en agriculture pour protéger les plantes contre les microorganismes phytopathogènes et préserver les semences. Dans ce contexte, les bactériocines antibactériennes et antifongiques sont associées pour combattre les ravageurs phytopathogènes. Cette approche permet de développer des stratégies de lutte intégrée visant à contrôler efficacement les infections bactériennes et fongiques qui peuvent causer des dommages aux cultures et aux semences. En utilisant les propriétés antimicrobiennes spécifiques des bactériocines, il est possible de réduire l'utilisation de produits chimiques agressifs tout en assurant une protection ciblée des plantes et des semences (**Khodja, 2018**).

CHAPITRE 02 :
MATÉRIELS
&
MÉTHODES

Cette étude a été réalisée dans le laboratoire de microbiologie, département des sciences de la nature et de la vie, université Saad Dahleb 1 de Blida, et le laboratoire d'hygiène durant la période mars-juin de l'année 2023. L'objectif de ce travail repose sur la mise en évidence de l'activité antimicrobienne direct et indirect (bactériocine) de quelques isolats de bactéries lactiques prélevés du lait de chamelle vis-à-vis des souches pathogènes de référence.

Provenance des échantillons :

Les isolats de bactéries lactiques ont été isolés à partir d'un échantillon de lait cru de chamelle collecté dans la région saharienne du Sud-Ouest de l'Algérie, plus précisément à Adrar.

Les souches pathogènes ATCC proviennent du laboratoire d'hygiène de Tipaza, *Pseudomonas aeruginosa* CNR ISPA PS20, *Escherichia coli* ATCC8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 19095, *Listeria monocytogène* ATCC 9525, *Klebsiella sp.*

3 Identification phénotypique :

3.1 Isolement et purification des isolats :

Pour la purification et l'isolation, un milieu de culture sélectif connu sous le nom de MRS a été utilisé pour le but de favoriser la croissance spécifique des bactéries lactiques (BL), tout en empêchant la croissance d'autres types de bactéries. Afin d'atteindre cet objectif, un échantillon de lait cru provenant de chammelles a été prélevé de manière stérile, et 1 ml de chaque échantillon a été ajouté à 9 ml d'eau physiologique stérilisée. Par la suite, des dilutions décimales successives ont été réalisées, couvrant une plage de valeurs allant de 10^{-1} à 10^{-9} .

Pour l'inoculation, une quantité de 1 ml des trois dernières dilutions (10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9}) a été introduite en profondeur dans des boîtes de Pétri contenant un milieu de culture MRS à un pH de 6,8, c'est ce qu'on appelle un ensemencement en masse. Les boîtes ont ensuite été incubées à une température de 30°C pendant une durée de 48 heures (**Mokdad, 2020**).

Par la suite, toutes les colonies présentant des caractéristiques morphologiques distinctes, notamment en termes de forme, de taille, de couleur et de texture, ont été isolées à partir des boîtes incubées. Ces colonies ont ensuite été purifiées par des transferts successifs dans du bouillon MRS, ainsi que par un ensemencement en surface sur du gélose MRS, jusqu'à obtenir

des colonies présentant une taille et une forme identiques. Ce processus garantit la pureté des isolats obtenus (Mokdad, 2020).

3.2 Examen macroscopique :

Une observation macroscopique permet de décrire à l'œil nu la forme, l'aspect, le contour, la viscosité, la surface et la couleur des colonies à partir des cultures obtenues sur la gélose MRS après 24-48 heures d'incubation à 30°C (Bentoura, 2018).

3.3 Examen microscopique :

L'observation microscopique au grossissement ($G \times 1250$) permet de classer les bactéries selon leur Gram (+/-), leur morphologie cellulaire et leur mode d'association.

Ces caractères sont déterminés par coloration de Gram qui consiste à :

- **Préparer un frottis :**

- Déposer sur une lame propre une goutte d'eau physiologique, puis prélever à l'aide d'une pipette pasteur stérile une fraction d'une colonie isolée.
- Réaliser le frottis de façon à obtenir un étalement mince et homogène.
- Sécher à l'air libre, puis fixer le frottis par 3 passages rapides et bref de la lame au-dessus d'une flamme d'un bec bunsen.

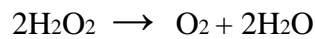
- **Etape de la coloration différentielle de Gram :**

- Recouvrir la lame de violet de gentiane pendant 1 minute.
- Rejeter le violet de gentiane et recouvrir de Lugol pendant 1 minute.
- Rejeter le Lugol, décolorer à l'alcool à 95° pendant 30 secondes, et rincer immédiatement à l'eau.
- Recouvrir la lame à la fuchsine dilué 1/10 pendant une minute, puis rincer.
- Sécher à la chaleur et faire la lecture ($\times 100$) avec l'huile à immersion (Denis *et al.*, 2011, Fares *et al.*, 2020).

3.4 Caractéristique biochimique :

3.4.1 Test de catalase :

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



La méthode de recherche de la catalase consiste à étaler une colonie sur une lame en verre, sur laquelle on ajoute une goutte du H₂O₂. La présence de l'enzyme se manifeste par le dégagement de bulles de gaz (Guy et al., 2006).

3.4.2 Profil fermentaire :

Ce test consiste à mettre en évidence la capacité des bactéries à fermenter différents types de sucres, ce qui à son tour nous permet d'identifier les bactéries. Il repose sur la mesure des produits de la fermentation tels que les acides organiques, les gaz et l'éthanol (Mokdad 2020).

On inocule les isolats grâce à une anse en platine dans des tubes contenant 10 ml de bouillon MRS et une cloche de Durham submerger. Puis, on incube à une température de 30°C pendant 24 à 72 heures en aérobiose, la lecture se fait après 24, 48 et 72 heures.

Un isolat homofermentaire ne conduit pas à un dégagement de gaz, tandis que pour les hétérofermentaires, le gaz produit est collecté dans la cloche qui est ainsi poussée vers le haut du tube (Hayward, 1957).

3.4.3 Test de résistance au pH 9,6 :

Le test de résistance au pH 9,6 repose sur le principe de démontrer si les bactéries sont capables de survivre et de résister dans un milieu alcalin. Ce test nous aide à identifier le genre des bactéries.

Pour ce test les isolats ont été inoculés grâce à une anse en platine dans des tubes contenant du bouillon MRS à un pH basique (9,6). La lecture se fait après une incubation à 30°C pendant 48h.

Un trouble homogène visible est indicateur de survie et résistance dans un milieu alcalin, donc un résultat positif (Bentoura ; 2018).

3.4.4 Test bile esculine :

Le principe du test BEA repose sur la capacité de la bactérie à hydrolyser l'esculine pour produire de l'esculétine et du glucose, ce qui nous aidera à identifier le genre de la bactérie.

La méthode consiste à faire un ensemencement sur la gélose BEA (ça contient un indicateur de pH) à partir d'isolats jeunes de bactéries lactiques. Lecture se fait 18 à 24 heures après incubation à 30°C. Un noircissement du milieu est indicateur de la capacité de la bactérie à dégrader l'esculine, donc un résultat positif, tandis qu'un résultat négatif présente aucun changement de couleur. Le noircissement est dû à la diminution du pH lors de la dégradation (**Bentoura, 2018**).

3.4.5 Test de dégradation d'arginine :

Le test d'arginine avec l'enzyme ADH est couramment utilisé pour évaluer la capacité des bactéries à décarboxyler l'arginine en ornithine et CO₂. Un milieu de culture spécifique, appelé A.D.H Moeller - Arginine, contenant de l'arginine et un indicateur de pH, est utilisé. Les bactéries capables de décarboxyler l'arginine grâce à l'enzyme ADH entraînent une augmentation du pH, ce qui provoque un changement de couleur dans le milieu. Les résultats obtenus grâce à ce test permettent de différencier les bactéries capables de décarboxyler l'arginine de celles qui ne le peuvent pas, ce qui facilite leur identification (**Bentoura, 2018**).

Le test d'Arginine des BL a été effectué en inoculant chaque isolat dans des eppendorfs à essai contenant 1 ml du milieu de culture A.D.H Moeller - Arginine. Après une incubation à une température de 30°C pendant 24 heures, les échantillons ont été observés afin de détecter tout changement de couleur (**Bentoura, 2018**).

Le changement de couleur du violet au jaune est un indicateur que les bactéries sont capables de dégrader l'arginine, donc un résultat positif. Ceux qui ne présentent aucun changement de couleur sont incapables de dégrader l'arginine, donc un résultat négatif. Cela permet de distinguer les bactéries positives des bactéries négatives lors de la décarboxylation de l'arginine.

3.5 Confirmation de la pré-identification :

La confirmation se fait par la galerie API 20^E, les étapes sont :

- Préparation de l'inoculum en réalisant une suspension bactérienne (dans 5ml de NaCl 0,85%, milieu de suspension API, eau physiologique stérile ou l'eau distillée) à partir d'une colonie sur milieu gélosé prélever préférentiellement d'une culture jeune.

- Introduire la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide de la même pipette.
- Pour les tests CIT, VP et GEL, remplir tube et cupule.
- Pour les autres tests, remplir uniquement les tubes.
- Pour les tests ADH, LDC, ODC, H₂S, URE crée une anaérobiose en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
- Renfermer la boîte d'incubation et incuber à 36°C ± 2°C pendant 18-24 heures.
- Après incubation la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture.
- Test TDA : ajouter 1 goutte de réactif TDA.
- Test IND : ajouter 1 goutte de réactif JAMES ou Kovac.
- Test VP : ajouter 1 goutte des réactifs VP1 et VP2 et attendre 10 minutes.
- Déterminer le profil numérique puis rechercher le dans la liste des profils à l'aide du logiciel d'identification **apiweb™**.

4 Etude de l'activité antimicrobienne :

4.1 Méthode directe (spot agar test (Fleming et al., 1975)):

Ce test d'antagonisme est réalisé dans le but de révéler la production ou non des substances antibactériennes par les souches de bactéries lactiques envers les souches pathogènes.

À partir d'une pré-culture de souches lactiques sélectionnées obtenues après 18 heures d'incubation à 30°C, 5µl ont étéensemencées sous forme de spots sur gélose MRS de façon à obtenir quatre spots par boîtes de même taille et identiques, comme démontrer dans la figure 03.

L'incubation se fait en Aérobiose à 30°C pendant 24 heures. Après l'incubation, les boîtes sont ensuite recouvertes de 10 ml de gélose MH (Muller Hinton) inoculée par une pré-culture de 18h (Do 600 :0.08-0.1) de chaque bactérie pathogène (*Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogène*, *Klebsiella sp.*), comme démontrer dans la figure 03, et mettre de l'amoxicilline sous forme de disque d'antibiotique comme témoin positif.

Après 24 heures d'incubation à 37 °C des souches inhibitrices (souches lactiques) et indicatrices (souches pathogènes), les boîtes ont été examinées en vue de détecter les zones d'inhibition autour des spots et le diamètre de la zone d'inhibition est mesuré. (Fleming et al., 1975). Les résultats positifs se manifestent par l'apparition d'une zone claire ≥ 6 mm autour des souches inhibitrices sont considérées comme productrices de substances antimicrobiennes.

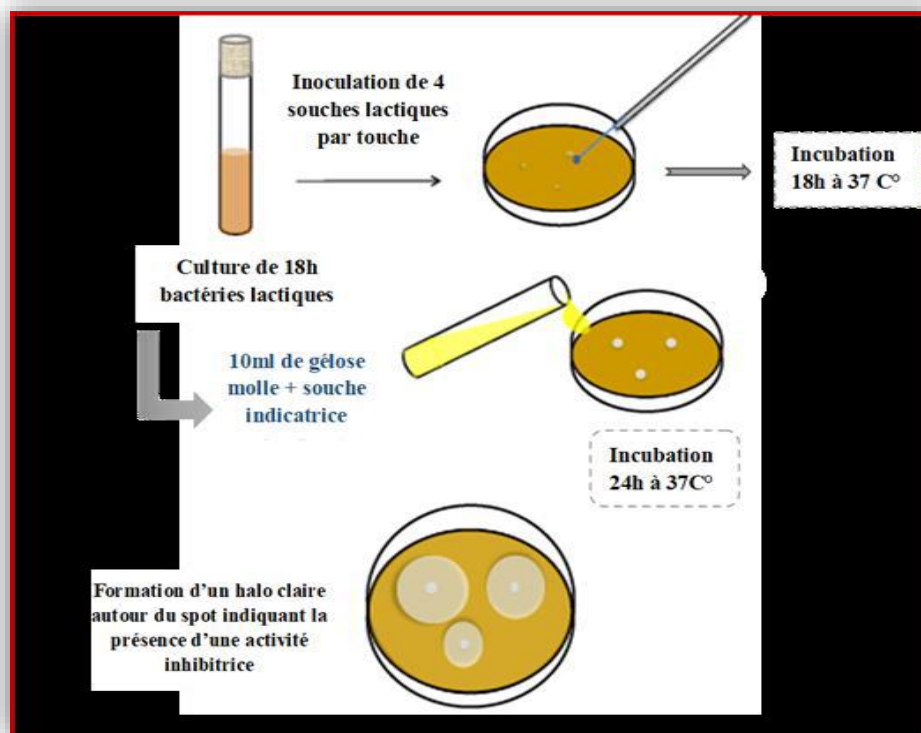


Figure 3 : Mise en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode spots sur agar (Fleming et al., 1975)

4.2 Méthode indirecte (diffusion par puits) :

Selon la méthode de diffusion en puits de Barefoot et Kaenhammer (1983), un volume du milieu Mueller-Hinton agar est coulé dans des boîtes de Pétri stériles. Après solidification du milieu, les boîtes sontensemencées en surface par la suspension de la souche pathogène (100µl, DO 600= 0,08 à 0,1). Ensuite, des puits de 6 mm de diamètre sont creusés stérilement à l'aide d'un emporte-pièce sur la gélose et seront remplis par 60 à 80µl de surnageant filtré et neutralisé, obtenu après centrifugation à 8000 rpm pendant 10 min à 4°C d'une culture de la souche lactique (dans le bouillon MRS). Puis, mettre de la gentamicine sous forme de disque d'antibiotique comme témoins positifs.

Les boîtes de Pétri sont placées à une température de +4°C/2 h pour permettre la bonne diffusion de la substance antibactérienne. Ensuite, les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures, et l'activité antimicrobienne se révèle par l'apparition de zones d'inhibition autour des puits (Tabak et Bensoltane, 2011).

Les diamètres des zones d'inhibition apparaissant autour des puits seront mesurés. Le résultat est positif si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur de 2 mm. La mesure du diamètre d'inhibition ZDI est effectuée selon la formule suivante :

$ZDI \text{ en (mm)} = \text{diamètre de la zone d'inhibition obtenue (mm)} - \text{diamètre de puits (6 mm)}$.

CHAPITRE 03 :
RÉSULTATS
&
DISCUSSION

5 Résultats :

5.1 Identification phénotypique :

5.1.1 Vérification de la pureté des isolats :

La purification et l'isolation des souches lactiques ont aboutie par 20 isolats de bactéries lactiques.

❖ Examen macroscopique :

L'observation macroscopique révèle des petites colonies arrondis, bombées et lisses de couleur blanchâtre, translucides ou opaques, ayant un contour régulier.

❖ Examen microscopique :

L'étude microscopique des bactéries lactiques après la coloration de Gram nous a révélé que les 20 isolats sont tous à Gram positif, avec une forme de cellule en Cocci disposée en paires ou en petites chaînettes.

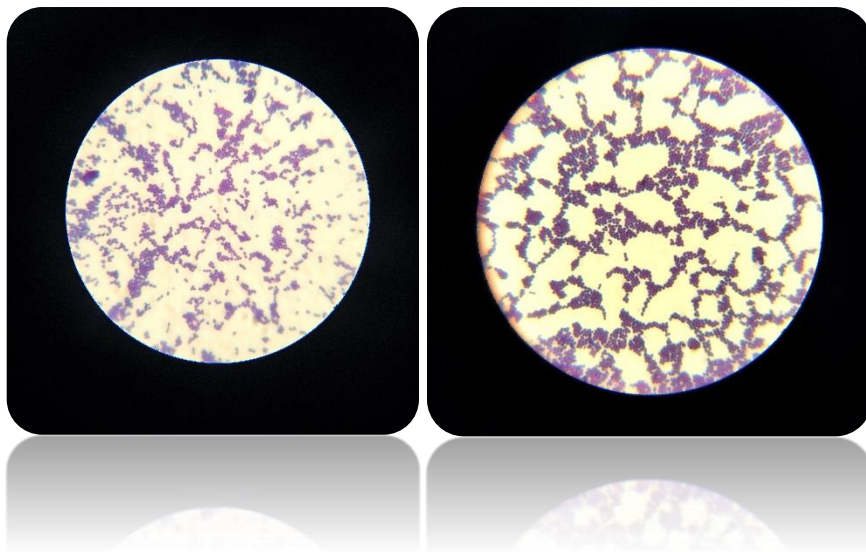


Figure 4 : Observation microscopique des Cocci à Gram + sous microscope photonique, grossissement 1250x.

5.2 Caractéristique biochimique :

5.2.1 Test de catalase :

Pour le test catalase nous avons noté l'absence d'effet d'effervescence qui accompagne le dégagement du gaz d'O₂ chez la totalité des isolats, donc une catalase négative.

5.2.2 Profil fermentaire :

Le test du profil fermentaire sur les 20 isolats a démontré que l'intégralité des isolats n'ont pas produit de gaz après 72h d'incubation. Par conséquent, on peut dire que nos isolats sont homofermentaires.

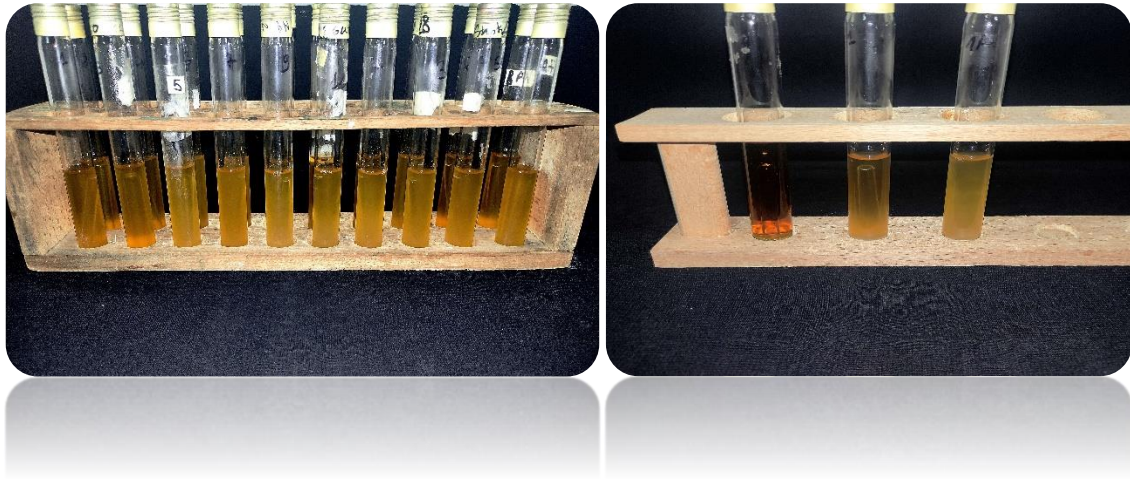


Figure 5 : les résultats du test du profil fermentaire des isolats (gauche) et la comparaison avec un témoin (droite).

5.2.3 Test de bile esculine :

Pour le test de bile esculine, nous avons remarqué après 24h d'incubation que les 20 isolats ont tous causé un noircissement dans le milieu, ce qui indique que nos isolats hydrolysent l'esculine.



Figure 6: résultats positifs du test de bile esculine.

5.2.4 Résultat du test de résistance a pH 9,6 :

Pour le test de résistance chez les 20 isolats, nous avons noté après 48h la formation d'un trouble homogène dans le bouillon MRS à pH 9,6 chez la totalité des tubes des isolats.

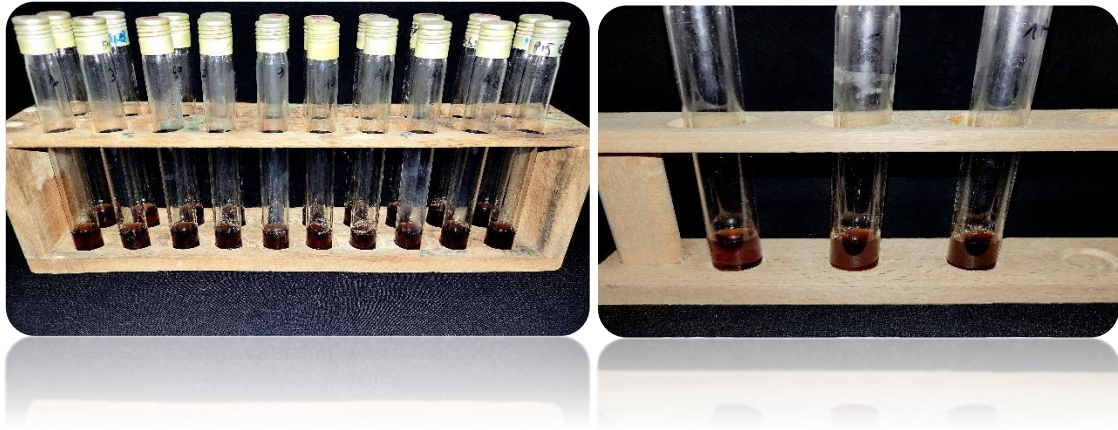


Figure 7 : résultats du test de résistance au pH 9,6 (gauche) et une comparaison avec le témoin (droite).

5.2.5 Résultat de dégradation d'arginine :

Pour le test de dégradation d'arginine sur milieu Moeller + arginine, nous avons obtenu des résultats après 24h d'incubation. On note que 13 isolats ont provoqué un changement dans la couleur du milieu, passant du violet au le jaune, tandis que 7 isolats n'ont présenté aucun changement dans le milieu.

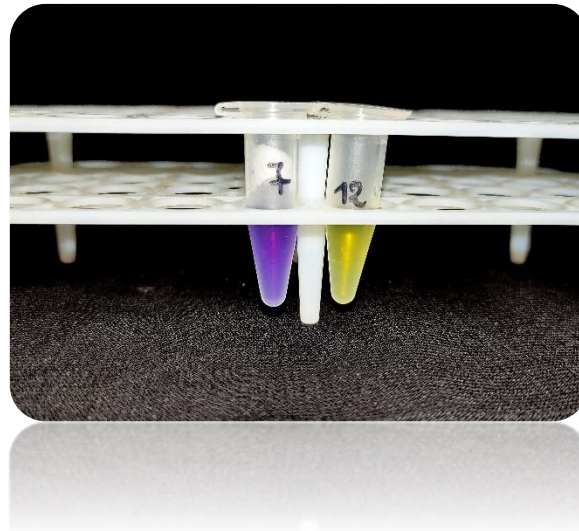


Figure 8 : résultat de la dégradation d'arginine négatif (gauche) et positif (droite).

5.3 Pré-identification des isolats :

Pour la pré-identification des isolats, nous avons regroupé tous les tests d'identification phénotypique, on peut dire que nos isolats appartiennent probablement au genre : *Enterococcus*.

Les galeries Api 20^E ont été utilisées pour pré-confirmer certains tests, comme le test de dégradation d'arginine, mais en raison du manque de certains tests, la galerie 20^E s'est avérée inutile pour l'identification des BL.



Figure 9: Résultats des galeries api 20E pour les isolats 11 et 8A.

Le tableau ci-dessous regroupe l'ensemble des résultats des tests de pré-identification effectués :

Tableau II : Récapitulatif des tests d'identification des 20 isolats.

Isolats	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1A	2A	3A	4A	5A	6A	7A	8A	
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Effet d'effervescence	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Production de gaz	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
L'hydrolyse de l'esculine	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Résistance au pH 9.6	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Dégradation de l'arginine	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)

5.4 Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des isolats lactiques :

5.4.1 L'activité antimicrobienne directe (Spot Agar Test) :

Pour l'activité antimicrobienne directe réalisée sur les 20 isolats, en utilisant l'ATB amoxicilline comme témoin positif, nous avons observé après 24h et 48h la formation d'halos d'inhibition avec des diamètres diminutives (entre 06 et 19 mm) pour la totalité des isolats + les témoins contre les souches pathogènes *Listeria monocytogène*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella sp.* Cependant, aucun halo d'inhibition n'a été observé pour *Pseudomonas aeruginosa*, comme le montre le tableau III.

Du tableau III : on peut dire que nos isolats présentent une activité antibactérienne directe faible à modérée. Les isolats 8A, 10, 02, 11 ont montré les diamètres les plus importants contre *Listeria monocytogène*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella sp.* respectivement.

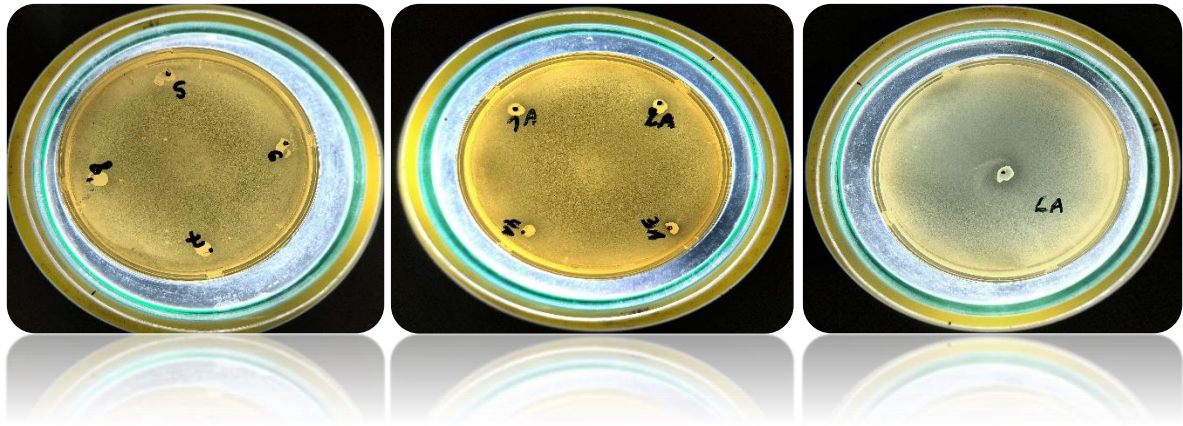


Figure 10 : Activité antimicrobienne directe des souches (de gauche à droite *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogène*, *Escherichia coli*)

Tableau III : Résultats de l'activité antimicrobienne directe des 20 isolats + amoxicilline contre les 5 souches pathogènes.

Isolats		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1A	2A	3A	4A	5A	6A	7A	8A
S. pathogènes	Temoin (mm)																				
E. coli (mm)	19	9	11	12	9	9	13	15	11	7	18	10	10	11	17	6	14	11	11	11	12
Staphylococcus (mm)	18	9	16	8	8	14	11	7	16	12	12	9	11	10	10	14	9	11	9	9	10
Listeria (mm)	11	10	11	9	9	17	16	13	13	9	9	8	9	8	8	7	7	12	10	15	22
Pseudomonas (mm)	10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Klibsiella (mm)	11	13	12	11	11	12	9	10	11	14	12	18	15	8	12	7	17	10	17	17	13

5.4.2 L'activité antimicrobienne Indirecte (Méthode par puits) :

Pour enrichir notre travail, nous avons utilisé certains isolats (isolats : 24, 25, 26, 27 et 34) fournis par notre collègue, qui présentent des caractéristiques biochimiques différentes et qui ont montré les plus grands diamètres lors de l'activité antimicrobienne directe. Nous avons les purifié et les isolé du même échantillon de lait.

Parmi nos 20 isolats, nous avons pris les 4 isolats avec le plus grand diamètre dans l'activité antimicrobienne directe pour chacune des souches pathogènes (isolats : 08, 10, 11, 8A).

Pour l'activité antimicrobienne indirecte, nous avons utilisé 09 isolats (08, 10, 11, 8A, 24, 25, 26, 27, 34) et l'ATB gentamicine comme témoin positif. Après 24 et 48 heures, les résultats de la lecture ont montré l'absence de formation d'halo d'inhibition autour des puits.

Pour les témoins, nous avons observé la formation d'halo : 28 mm pour *Escherichia coli* et *Klebsiella sp.*, 24 mm pour *Pseudomonas aeruginosa*, 23 mm pour *Staphylococcus aureus* et 19 mm pour *Listeria monocytogène*.

Sur la base de ces résultats, on peut dire que nos isolats ne présentent aucune activité antibactérienne indirecte qui repose sur les bactériocines.

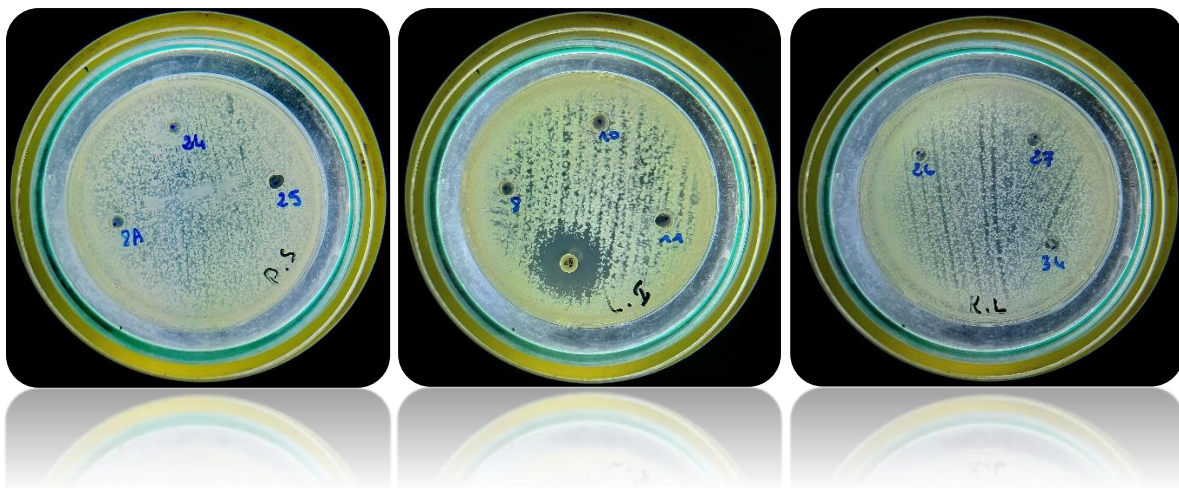


Figure 11: Activité antimicrobienne indirecte (de gauche à droite : *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogène*, *Klebsiella sp.*)

6 Discussion :

Notre étude consiste à étudier le pouvoir antimicrobien des isolats purifiés et isolés à partir d'un échantillon de lait chamelle.

Les bactéries lactiques isolées sont des bactéries à Gram positif, généralement immobiles, sporulées, catalase négatives, oxydase négatives, généralement nitrate réductase négative et ce sont des bactéries anaérobies facultatives (**Hogg, 2005**).

6.1 Identification phénotypique :

L'examen macroscopique révèle des petites colonies arrondis, bombées et lisses de couleur blanchâtre, translucides ou opaques, ayant un contour régulier.

L'examen microscopique a prouvé que toutes les souches étaient Gram +. L'observation au microscope a démontré que nos souches sont principalement des coques ou des coccobacilles, ce qui correspond aux mêmes résultats obtenus par **Benhoua, (2019)**, sauf pour la souche S1 qui présente une forme bacille.

6.2 Caractéristiques Biochimiques :

6.2.1 Test de catalase :

Les 20 isolats sont catalase négatives, ce qui signifie que les bactéries lactiques isolées ne possèdent pas l'enzyme catalase pour dégrader l'H₂O₂. Ces résultats correspondent aux mêmes résultats obtenus par (**Benhoua ,2019**).

6.2.2 Test du profil fermentaire :

Le test a révélé que nos 20 isolats suivent une voie de fermentation homofermentaire, ce qui signifie que lors de la fermentation des sucres nos isolats produit principalement que de l'acide lactique comme produit finale. Contrairement aux bactéries hétérofermentaires qui produisent, en plus de l'acide lactique, d'autres éléments tels que l'acétate, l'éthanol...etc. Ces résultats diffèrent des résultats obtenus par (**Benhoua ,2019**).

6.2.3 Test de résistance au pH 9,6 :

Selon le tableau IV, nos 20 isolats sont capables de résister, survivre et croître dans un milieu alcalin, c'est démontré par le trouble homogène dans les tubes à bouillon MRS avec pH 9,6. On parle ici d'alcalotolérance, qui est due à des adaptations spécifiques et à des mécanismes permettant de réguler le pH interne (**Bentoura; 2018**).

On note des résultats opposés au résultat de **Benhoua, (2019)** qui ne présente aucune croissance dans les 28 souches.

6.2.4 Test de bile esculine :

Selon le tableau III, on remarque que la totalité de nos isolats sont capables de dégrader l'esculine, qui est un glucoside présent dans le milieu en esculétine. L'esculétine formée peut réagir avec les ions de fer 3, ce qui provoque un noircissement du milieu.

Ce test nous permet de mieux identifier les genres des BL. La dégradation est généralement significative du genre *Entérocoque*, tandis que l'absence de la dégradation probablement signifie les genres *Lactocoque*, *Leuconostoc* et *Weissella*.

On note un résultat radicalement différent aux résultats de **Benhoua, (2019)**. 27 des 28 souches ne dégradent pas l'esculine, sauf pour la souche S1 qui présente un résultat positif.

6.2.5 Test de dégradation d'arginine :

Selon le tableau V, il a été révélé que 13 de nos isolats ont la capacité de dégrader l'arginine, tandis que 07 n'ont présenté aucune dégradation. C'est dû à la capacité des 13 isolats à utiliser l'acide aminé arginine comme source d'énergie par l'enzyme arginine-dihydrolase, qui catalyse la dégradation de l'arginine en ammoniac (**Bentoura, 2018**).

La capacité de d l'arginine est démontrée par le virage de couleur du milieu, passant du violet au jaune. Ce virage est dû à la présence d'ammoniac.

On note que nos résultats diffèrent de ceux de **Benhoua, (2019)**, qui ne présente aucune dégradation d'arginine, sauf pour 05 souches sur 28 (souches S5, S6, S7, S8, S9).

6.3 Identification des Isolats :

D'après les résultats des tests précédents, il est fort probable que les genres de nos isolats soient des *Enterocoques*. Ces conclusions sont basées sur le fait que nos isolats sont des bactéries homofermentaires, alcalotolérantes, avec une croissance dans le milieu BEA en dégradant l'esculine qui cause un noircissement du milieu.

6.4 Activité antimicrobienne :

Divers mécanismes sont impliqués dans l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques (BL). Ces mécanismes incluent la production de substances antimicrobiennes telles que les bactériocines, qui sont des protéines inhibitrices de la croissance des autres bactéries. De plus, l'acidification du milieu, la compétition pour les nutriments, et d'autres mécanismes peuvent également contribuer à cette activité. Il est important de noter que ces mécanismes peuvent agir de manière synergique ou individuelle pour inhiber la croissance des souches pathogènes. **(Benyoucef, 2018)**

Le caractère antagonique des bactéries lactiques envers les bactéries potentiellement pathogènes, en particulier celles présentes dans les environnements laitiers, est très recherché et crucial dans la bioconservation alimentaire. L'activité antagonisme de l'inhibition de la croissance des bactéries pathogènes se manifeste par l'apparition des halots d'inhibition **(Fleming et al., 1975)**.

6.4.1 L'activité antimicrobienne direct :

- **L'Activité antimicrobienne vis-à-vis *Escherichia coli* :**

Les isolats purifiés lors de notre travail ont démontré leurs efficacité contre la bactérie pathogène par la présence des zone d'inhibition, ces zones varient grandement dans leur taille, allant de 06 à 18 mm. L'isolat 10 présente le plus grand diamètre, avec 18 mm, tandis que l'isolat 3A présente le diamètre plus diminutive avec un diamètre de 6 mm. De cela, on peut déterminer que l'isolat 10 est le plus efficace contre *Esherichia coli*. Nos résultats sont similaires, voire un peu supérieur, aux résultats **Boudersa et Nekkaa, 2017**, qui présentaient des BL avec des diamètres de 08 à 13 mm.

- **L'Activité antimicrobienne vis-à-vis *Staphylococcus aureus* :**

Nos résultats témoignent une activité antimicrobienne positive avec des zones d'inhibition qui varient de 08 à 16 mm. Les isolats 03 et 04 ayant le la zone la plus petite avec 08 mm et les isolats 02 et 08 ayant la zone la plus importante avec 16 mm de diamètre. On peut dire que les isolats 02 et 08 sont les plus efficaces contre *Staphylococcus aureus*.

Ces résultats sont similaires à ceux de **Boudersa et Nekkaa, (2017)**, qui présentent des valeurs qui varient entre 09 et 11 mm.

- **L'Activité antimicrobienne vis-à-vis *Listeria monocytogène*:**

De nos résultats, on peut déduire que nos isolats présentent une activité antimicrobienne positive, avec nos isolats présente des halos d'inhibition qui varie entre 07 et 22 mm. Les isolats 3A et 4A présentent le diamètre le plus petit, tandis que l'isolat 8A présente le diamètre le plus grand avec 22 mm. On peut dire que 8A est la plus efficace contre *Listeria monocytogène*.

On note que nos résultats sont similaires aux résultats de **Boudersa et Nekkaa, (2017)**, qui montrent des zones d'inhibition variant entre 10 et 25 mm, avec les souches *Weissella 01* et *Leuconostoc 02* qui présentent des diamètres de 25 et 20 mm respectivement.

- **L'Activité antimicrobienne vis-à-vis *Pseudomonas aeruginosa* :**

Nos résultats ne témoignent aucune activité antimicrobienne vis-à-vis de *Pseudomonas Aeruginosa*. Le manque de diamètre d'inhibition autour des spots peut signifier plusieurs choses : *Pseudomonas aeruginosa* peut présenter des mécanismes de résistance aux outils d'inhibition produites par les BL, ou que la charge de la bactérie pathogène est plus importante que la charge des BL.

On note que nos résultats sont différent de ceux trouver chez **Bedrouni et Belarbi, (2021)**. Leur résultat varie entre 12 et 20 mm, avec les souches *Lactobacille 01*, *Weissella 04* et *Leuconostoc 02* comme les plus efficaces, avec 20 mm de diamètres. De ceci, on peut dire que les 03 souches sont plus efficaces que nos Entérocoque.

- **L'Activité antimicrobienne vis-à-vis *Klebsiella sp.* :**

Nos résultats témoignent des résultats positifs vis-à-vis de l'activité antimicrobienne directe contre *Klebsiella sp.*, avec des zones d'inhibition qui varie entre 07 et 17 mm. L'isolat 3A présente un diamètre de 07 mm, tandis que les isolats 4A, 6A, 7A ont un diamètre de 17 mm.

De ce fait, on peut conclure que les isolats les plus efficaces contre *Klebsiella sp.* sont les isolats 4A, 6A et 7A.

On note que nos résultats se rapprochent des résultats de **Bedrouni et Belarbi, (2021)**, qui ont travaillé sur diverses souches de BL, dont les *Leuconostoc* qui présente des diamètres entre 16 et 19 mm. On peut dire que les *Leuconostoc* sont plus efficace que les *Entérocoque* contre *Klebsiella sp.*.

▪ Conclusion et perspective :

Les bactéries lactiques sont parmi les bactéries à Gram-positif les plus étudiées, ayant un effet bénéfique sur la santé en inhibant le développement d'autres microorganismes indésirables ou pathogènes. Elles jouent un rôle important dans l'amélioration de la digestion, le maintien de l'équilibre de la flore intestinale et de l'équilibre acido-basique au niveau du côlon. Elles sont largement utilisées en industrie agroalimentaire grâce à leur rôle dans la fermentation et la conservation des aliments par production de plusieurs facteurs inhibiteurs.

Les résultats obtenus au cours de ce travail nous permettent de conclure que l'identification phénotypique (par les tests biochimiques et physiologique) indique que nos souches appartiennent au genre *Entérocoques*.

L'objectif de cette étude est d'apporter une contribution à la caractérisation et la détermination du pouvoir antibactérien des bactéries lactiques. Nous avons testé 20 souche isolées du lait de chamelle à partir des cultures jeunes en phase exponentielle contre cinq bactéries pathogènes ATCC : (*listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella sp.*). La détection de l'activité antimicrobienne est basée sur la diffusion de l'agent antimicrobien dans des milieux de culture solides pour inhiber la croissance des microorganismes indicateurs sensibles.

Les résultats de l'activité antimicrobienne ont montré que les vingt souches ont le pouvoir d'inhibition de pathogènes, précisément (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogene* et *Klebsiella sp.*), avec un meilleur spectre d'inhibition marqué contre *Klebsiella sp.*, tandis que nos souches ne sont pas des producteurs de bactériocines.

À la suite de ce modeste travail, nous envisageons les perspectives suivantes :

- Étude de l'activité antimicrobienne de l'ensemble des bactériocines identifiées contre un panel plus large de microorganismes (bactéries et champignons).
- Évaluation de pouvoir antimicrobien de nos isolats.
- Étude des propriétés technologiques (la protéolyse, la lipolyse, le pouvoir acidifiant, aromatisant, texturant, etc.).
- Identification moléculaire est très essentielle pour mieux identifier les isolats.

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

« A »

- **Ababsa, A. (2012).** Recherche de bactériocines produites par les bactéries lactiques du lait, thèse de magister, université Ferhat Abbas Sétif.
- **Ahmed-Gaid, K. (2018).** Valorisation de sous-produits d'abattoir en vue de leur utilisation comme substrats pour la formulation de milieux de culture pour certains lactobacilles, thèse de doctorat, université Badji Mokhtar Annaba.
- **ALLOUACHE K. et SMAOUN.O. (2017).** Caractérisation de souches locales de bactéries lactiques isolées à partir de quelques produits laitiers artisanaux et mise au point d'un produit type "Raib". Mémoire de master en Science de la nature et de la vie. Bejaia: Université A. MIRA – Bejaia p 5, 6, 7.

« B »

- **Bali, V., Panesar, P. S., Bera, M. B., et Kennedy, J. F. (2016).** Bacteriocins: recent trends and potential applications. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(5), 817-834.
- **Bedrouni S. et Belarbi N., (2021).** Etude du pouvoir biotechnologiques des bactéries lactiques isolées de produits laitiers. Mémoire de Master, Université SAAD DAHLEB – Blida 1, p 54-57.
- **BEKHOUCHE, F. (2006).** Bactéries lactiques du lait cru de vache et Microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes : 1. Isolement et Identification biochimique. 2. Evaluation et Optimisation de la production d'enzyme polygalacturonase. Thèse doctorat Génie alimentaire non publiée, Université de Constantine, Constantine.
- **BELARBI, F. (2011).** Isolement et sélection des souches de bactéries lactiques productrices des métabolites antibactériennes. Thèse magister microbiologie non publiée, Université d'Oran, Oran.
- **Benguella, N. (2015).** Recherche de bactériocines produites par les bactéries lactiques isolées du lait de chamelle. Mémoire de Master, Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, 58p.
- **Benhoua I. (2019).** Recherche et exploitation des exopolysaccharides produits par les bactéries lactiques et leur application. Thèse de doctorat. Université Ahmed Ben Bela Oran.

- **BENMOUNA, Z. (2012).** Bactériocine des bactéries lactiques: étude biochimique et génétique. Thèse magister en biotechnologie non publiée, Université d'Oran, Oran.
- **Bentoura S., 2018.** L'étude des propriétés technologiques et antagonistes des bactéries lactiques isolées à partir du lait cru de chamelle « *Camelus dromedarius* » vis-à-vis de certains contaminants pathogènes pour une utilisation en industrie alimentaire. Thèse de doctorat en sciences et qualité des aliments; Ecole Nationale Supérieure Agronomique - El Harrach - Alger.
- **Bentoura S., 2018.** L'étude des propriétés technologiques et antagonistes des bactéries lactiques isolées à partir du lait cru de chamelle « *Camelus dromedarius* » vis-à-vis de certains contaminants pathogènes pour une utilisation en industrie alimentaire. Thèse de doctorat en sciences et qualité des aliments; Ecole Nationale Supérieure Agronomique - El Harrach - Alger.
- **Benyoucef Amel. (2018).** Etude de propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques produisant des substances antibactériennes. Thèse de doctorat... Université Ahmed Ben Bela Oran.
- **BERRADIA A. (2016).** Isolement, purification et identification des bactéries lactiques à partir de lait cru de chèvre. Mémoire de master en biologie. Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. p 11, 16.
- **Björkroth, J., & Holzappel, W. (2006).** Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. *The prokaryotes*, 4, 267-319.
- **Boudersa et Nekkaa, (2017).** Etude de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques isolées à partir d'un produit laitier fermenté : le yaourt brassé. Mémoire de Master, Université des Frères Mentouri Constantine, p 41.
- **Boumedién, k. (2013).** Recherche des bactéries lactiques productrices des bactériocines et l'étude de leur effet sur des bactéries néfastes, thèse de magister, université de Tlemcen.
- **Bouzaid M, Chatoui R, Latrache H, Hassib H. (2016).** Activité antimicrobienne des souches de bactéries lactiques isolées de viande hachée de dromadaire et de lait cru de vache (Maroc). *Review Microbiology Industrial. Santé et Environnement.* 10 (1) : 1-12.
- **Buron-Moles, G., Chailyan, A., Dolejs, I., Forster, J., and Mikš, M.H. (2019).** Uncovering carbohydrate metabolism through a genotype-phenotype association study

of 56 lactic acid bacteria genomes. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(7), 3135-3152.

« C »

- **Chandan, R. C., Gandhi, A., & Shah, N. P. (2017).** Chapter 1 - Yogurt: Historical Background, Health Benefits, and Global Trade. In: Shah, N. P. (Ed.), *Yogurt in Health and Disease Prevention* (pp. 3-29): Academic Press.
- **CHEKHCHOUKH M, SOUCI N, et ZITOUNI A. (2016).** Intérêt technologique des bactéries lactiques du lait de chamelle. Diplôme de Magister Science de la nature et de la vie. Université M'hamed Bougara de Boumerdès. p 8, 9.
- **Chentouf, H. (2015).** Effet des substances antimicrobiennes produites par *Leuconostoc mesenteroides* isolées à partir du lait cru de chamelle d'Algérie sur la croissance de *Listeria monocytogenes* dans les produits alimentaires (Thèse de doctorat, Université d'Oran1-Ahmed Ben Bella).
- **Cherier, D. (2017).** Caractérisation biochimique et structurale de bactériocines ciblant le métabolisme du peptidoglycane bactérien, alternative potentielle aux antibiotiques (Doctoral dissertation, Université Paris-Saclay).
- **Chikindas, M. L., Weeks, R., Drider, D., Chistyakov, V. A., et Dicks, L. M. (2018).** Functions and emerging applications of bacteriocins. *Current opinion in biotechnology*, 49, 23-28.

« D »

- **De Freire Bastos, M. D. C., Coelho, M. L. V., et Da Silva Santos, O. C. (2015).** Resistance to bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Microbiology*, 161(4), 683-700.
- **Delcenserie, V., China, B., Gavini, F., Beerens, H., & Daube, G. (2002).** Proposition pour un nouveau standard indicateur de la contamination d'origine fécale dans les aliments: le genre *Bifidobacterium*. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 146, 279-294.
- **Devriese, L., Baele, M., & Butaye, P. (2006).** The genus *Enterococcus*: taxonomy. *Prokaryotes*, 4, 163-174.
- **Dillenseger, H. (2019).** Les bactériocines: en alternative aux traitements antibiotiques (Thèse de doctorat, Université de Bordeaux).

- **Djadouni, F. (2013).** Evolution de l'activité antimicrobienne des isolats des bactéries lactiques et détermination des spectres d'action de leurs biopeptides vis-à-vis des germes d'altération. (Thèse de doctorat, Université d'Oran).
- **Djelloul, D, S. (2021).** Isolement et identification des bactéries antagonistes vis-à-vis des souches pathogènes multirésistantes (Thèse de doctorat, Université de Djilali liabes de Sidi bel Abbas).
- **Dortu, C. and Thonart, P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et Biotechnol. Agron. Soc. Environ 13: 143-154.
- **Drider D, Fimland G, Héchard Y, Mc Mullen L M, Prevost H .2006.** The continuing story of class II bacteriocin. Microbiology and Molecular Biology Reviews 70: 564-582.

« E »

- **Egan, K., Field, D., Rea, M. C., Ross, R. P., Hill, C., et Cotter, P. D. (2016).** Bacteriocins: novel solutions to age old spore-related problems. Frontiers in microbiology, 7, 461

« F »

- **Favaro, L., Penna, A. L. B. & Todorov, S. D. (2015).** Bacteriocinogenic LAB from cheeses— application in biopreservation? Trends in Food Science & Technology, 41, 37-48.
- **Federighi M. (2005).** Bactériologie Alimentaire, Edition ECONMICA, 2eme édition, p 28.
- **Fleming, H.P, etchells, J.L, et Costilow. R.N. (1975).** Microbiol Inhibition by an isolate of *Pediococcus* from brines. Applied Microbiologie. vol.30, N°.6.p.10401042.
- **François Chamba-Jean. (2008).** Applications fromagères. In Georges Corrieu. Luquet F-M. Bactéries lactiques de la génétique aux ferments. Edition Tec & Doc, Lavoisier. Paris, pp. 788-815.
- **Fusco, V., Quero, G. M., Cho, G.-S., Kabisch, J., Meske, D., Neve, H., Bockelmann, W., et al. (2015).** The genus Weissella: taxonomy, ecology and biotechnological potential. Frontiers in Microbiology, 6, 155.
- **González-Pérez, C. J., Aispuro-Hernández, E., Vargas-Arispuro, I., et Martínez-Téllez, M. A. (2018).** Induction of bacteriocins from lactic acid bacteria; a strategy to

improve the safety of fresh fruits and vegetables. *Agricultural Research Technology Open Access Journal*, 14(4).

« H »

- **HAMMI I. (2017).** Isolement et Caractérisation de bactériocines produites par des souches de bactéries lactiques isolées à partir de produits fermentés marocains et de différentes variétés de fromages français. *Chimie analytique. Université de Strasbourg. Français.* p 10.
- **Hammi, I. (2016).** Isolement et caractérisation de bactériocines produites par des souches de bactéries lactiques isolées à partir de produits fermentés marocains et de différentes variétés de fromages français. Thèse de Doctorat, Université Sidi Mohamed Ben Abdallah, 132 p.
- **Hanchi, H., Mottawea, W., Khaled, S., & Hammami, R. (2018).** The Genus *Enterococcus*: Between Probiotic Potential and Safety Concerns—An Update. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1791.
- **Heita, L. (2014).** Antimicrobial activity profile of traditional fermented milk starter cultures from North-Eastern Namibia (Thèse de doctorat, Université de Namibia).
- **Holzappel W H, Wood B J. (2014).** Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy. (Ed), John Wiley & Sons.

« I »

- **Ibrahim, O. O. (2019).** Classification of antimicrobial peptides bacteriocins, and the nature of some bacteriocins with potential applications in food safety and biopharmaceuticals. *EC Microbiology*, 15, 591-608.
- **Issa, A. T., & Tahergorabi, R. (2019).** Milk Bacteria and Gastrointestinal Tract: Microbial Composition of Milk. In: Watson, R. & Preedy, V. (Eds.), *Dietary Interventions in Gastrointestinal Diseases* (pp. 265-275): Academic Press, Elsevier.

« J »

- **Jang, J., Kim, B., Lee, J., Kim, J., Jeong, G., & Han, H. (2002).** Identification of *Weissella* species by the genus-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis. *FEMS Microbiology Letters*, 212(1), 29-34.

« K »

- **Khodja, B. (2018).** Caractérisation phénotypique et moléculaire des souches de bactéries lactiques productrices de bactériocine (Thèse de doctorat, Université de Djillali liabes de Sidi bel Abbes).

« L »

- **Lairini, S., Beqqali, N., Bouslamti, R., Belkhou, R., Zerrouq, F. (2014).** Isolement des bactéries lactiques à partir des produits laitiers traditionnels Marocains et formulation d'un lait fermenté proche du Kéfir, Afrique SCIENCE, 10(4), 267-277.
- **Langa, S., Martín-Cabrejas, I., Montiel, R., Landete, J. M., Medina, M., et Arqués, J. L. (2014).** Combined antimicrobial activity of reuterin and diacetyl against foodborne pathogens. Journal of dairy science, 97(10), 6116-6121.
- **LAZREG, L. (2017).** Bactériocine d'entérocoques isolée de lait cru et beurre de l'ouest algérien, Oran. Doctorat : 193.
- **LEONARD, I. (2013).** Evaluation du potentiel bioprotecteur de bactéries lactiques confinées dans une matrice polymérique. Thèse doctorat Sciences de l'Alimentation non publiée, Université de Bourgogne, France.

« M »

- **MAHI M. (2010).** Etude technologique des bactéries lactiques isolées à partir de lait de brebis. Diplôme de Magister Science de la nature et de la vie. Oran: Université d'Oran Ahmed ben bela, p 38, 40, 41, 42.
- **Mekri, M. (2016).** Effet de synergie des bactériocines issues des bactéries lactiques et pseudo lactiques et des huiles essentielles d'*Inula viscosa* contre les germes pathogènes (Thèse de doctorat, Université de Djilali liabes de Sidi bel Abbes).
- **Menad, N. (2018).** Effet antagoniste des bactéries lactiques isolées à partir du lait de vache vis-à-vis de *Salmonella* sp (Thèse de doctorat, Université de Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem).
- **Mercha, I., Lakram, N., Kabbour, M. R., Bouksaim, M., et Zkhiri, F. (2020).** Probiotic and technological features of *Enterococcus* and *Weissella* isolates from camel milk characterised by an Argane feeding regimen. Archives of Microbiology, 202(8), 2207-2219.

- **MERZOUK Y. (2015).** Optimisation des conditions de fermentation et de préservation du lait cru de chamelle par les bactéries lactiques adaptées aux conditions de stress. Thèse de doctorat science de la nature et de la vie. Oran: Université d'Oran Ahmed ben bela, p 10, 11, 14, 15, 20, 34, 35.
- **MIR, S. A. & MASOODI, F. A. (2018).** Use of organic acids for preservation and safety of traditional meat products. *Journal of Food Safety*, 38, e12514.
- **Mokdad, F. H., Benmechernene, Z., Benyoucef, A., Russo, N. (2020).** Characterization of bioactive *Leuconostoc mesenteroides* producing bacteriocin strains isolated from camel's and goat's Algerian raw milks. *Il Ponte*, 76(3/1), 32-61.
- **Mokoena, M. P. (2017).** Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. *Molecules*, 22(8), 1255.
- **Moraes, M.P., Perin, L.M., Ortolani, M.B.T., Yamazi, A.K., Viçosa, G.N. and Nero, L.A. (2010).** Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic." *Food Sci.Technol* 43: 1320-1324.

« N »

- **Nair, M. S., Amalaradjou, M. A., et Venkitanarayanan, K. (2017).** Antivirulence properties of probiotics in combating microbial pathogenesis. *Advances in applied microbiology*, 98, 1-29.
- **Nes, I. F., Kjos, M., et Diep, D. B. (2011).** Antimicrobial components of lactic acid bacteria. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects* (4th Ed). Chemical Rubber Company Press, Boca Raton, FL, 66(1), 285-329.
- **Novel G. (1993).** Les bactéries lactiques. In Leveau JY et Bouix M (ed.), *Microbiologie industrielle, les micro-organismes d'intérêt industriel*. 170-3310

« O »

- **Orla-jansen, S. H (1919)** the lactic acid bacteria in biology of microorganisms on grapes, in must and in wine. *Konig H. ET Frohlich J. (2009) Springer Ed, allemagne*, p3-29.

« R »

- **REIS, J., PAULA, A., CASAROTTI, S. & PENNA, A. (2012).** Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications. *Food Engineering Reviews*, 4, 124-140.
- **Rodriguez, E., Arques, J. L., Nunez, M., Gaya, P., et Medina, M. (2005).** Combined effect of high-pressure treatments and bacteriocin-producing lactic acid bacteria on inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 in raw-milk cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 3399-3404.
- **Rusch V. (2002).** Probiotics and definitions: a short overview. *Herborn Litterae*.

« S »

- **SADJI.H, 2019.** L'effet du pouvoir inhibiteur des bactéries lactiques autochtones isolés du blé fermenté vis-à-vis *Lactobacillus plantarum* et des bactéries pathogènes de références. Diplôme de Masterde Université Abdelhamid IBn Badis Mostaganem.en Algérie.
- **Salminen, S., Wright, A. V., Ouwehand, A. (2004).** Lactic acid bacteria. microbiological and functional aspects. Marcel Dekker. Inc., U.S.A.
- **SIBOUKEUR O. 2007.** Etude du lait camelin collecté localement : caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques ; aptitudes à la coagulation. Thèse de Doctorat en sciences Agronomiques. Institut national agronomique ELHarrachAlger (Algérie).
- **Sidhu, P. K., et Nehra, K. (2019).** Bacteriocin-nanoconjugates as emerging compounds for enhancing antimicrobial activity of bacteriocins. *Journal of King Saud UniversityScience*, 31(4), 758-767
- **Simons, A., Alhanout, K., et Duval, R. E. (2020).** Bacteriocins, antimicrobial peptides from bacterial origin: overview of their biology and their impact against multidrug-resistant bacteria. *Microorganisms*, 8(5), 639.
- **Singh, V. P. (2018).** Recent approaches in food bio-preservation-a review. *Open veterinary journal*, 8(1), 104-111.
- **Stiles ME, Holzapfel WH.1997.**Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy.*Int, J. Food Microbiol* ; 36 :1-29.

« T »

- **Taale, E., Savadogo, A., Zongo, C., Tapsoba, F., Karou, S. D., et Traore, A. S. (2016).** Les peptides antimicrobiens d'origine microbienne: cas des bactériocines. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 10(1), 384-399.
- **Tailliez, P., Quiberoni, A., Rezaiki, L., El Karoui, M., Biswas, I., and Gruss, A. (2001)** Distinctive features of homologous recombination in an 'old' microorganism, *Lactococcus lactis*. *Res Microbiol.*152: 131-139.
- **Tamime, A.Y. (2002).** Microbiology of starter cultures. In: *Dairy microbiology handbook* (Robinson R.K.). 3e Ed., John Wiley and Sons, Inc., New York. 261-366
- **Tenea, G. N., et Yépez, L. (2016).** Bioactive compounds of lactic acid bacteria. Case study: Evaluation of antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactobacillus isolated from native ecological niches of Ecuador. *Probiotics and prebiotics in Human Nutrition and Health*, 149-167.
- **Tosukhowong, A., Nakayama, J., Mizunoe, Y., Sugimoto, S., Fukuda, D., & Sonomoto, K. (2005).** Reconstitution and function of Tetragenococcus halophila chaperonin 60 tetradecamer. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99(1), 30-37.
- **TUMBARSKI, Y., LANTE, A.&KRASTANOV, A. (2018).** Immobilization of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria and Possibilities for Application in Food Biopreservation. *The Open Biotechnology Journal*, 12,25-32.

« W »

- **WANGO H J., FARAH Z. and PUHAN Z. 1998.** Composition of Milk from 3 Camels (*Camelus dromedarius*) Breeds in Kenya during Lactation. *Milchwissenschaft*, 53, 136-139

« Y »

- **Yan yan, H., Mintez, L. (2014).** Use of extracellular extracts of lactic acid bacteria and bifidobacteria for the inhibition of dermatological pathogen *Staphylococcus aureus*, *Dermatologica Sinica*, 32,141-147.
- **Yang, S. C., Lin, C. H., Sung, C. T., et Fang, J. Y. (2014).** Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in microbiology*, 5, 241.

- **Yehia, H. M., Ghanem, S., Elobeid, T., Mosilhey, S. H., & Savvaidis, I. N. (2017).** In vitro characterization of a vancomycin-resistant strain of *Leuconostoc lactis* isolated from chicken carcasses and its activity against some foodborne pathogens. *African Journal of Food Science*, 11(10), 337-345.

« **Z** »

- **Zhitnitsky, D., Rose, J., et Lewinson, O. (2017).** The highly synergistic, broad spectrum,• antibacterial activity of organic acids and transition metals. *Scientific reports*, 7(1), 1-13.

ANNEXES

❖ **Annexe I : Composition des milieux de culture (pour 1 litre d'eau distillée)**

Milieu MRS (Man Rogosa et Sharpe)

- ❖ Peptone 10g
- ❖ Extrait de viande 10g
- ❖ Extrait de levure 5g
- ❖ Glucose 20g
- ❖ Tween 80 1mL
- ❖ Phosphate dipotassique 2g
- ❖ Acétate de sodium 5g
- ❖ Citrate de sodium 2g
- ❖ Sulfate de magnésium 0,2g
- ❖ Sulfate de manganèse 0,05g
- ❖ Agar (gélose) 15g
- ❖ pH 6,5.

Autoclaver à 121 °C/10mn

Milieu nutritif

- ❖ Extrait de viande 1g
- ❖ Peptone 15g
- ❖ Chlorure de sodium 5g
- ❖ Agar (gélose) 15g
- ❖ pH=7,2

Autoclaver à 121 °C/10mn

Milieu Mueller-Hinton

- ❖ Infusion de viande de bœuf 300ml
- ❖ Peptone de caséine 17,5g

- ❖ Amidon de maïs 1,5g
- ❖ Agar 10,0g
- ❖ pH= 7,4

Milieu Bile Agar Esculine

- ❖ Tryptone 17,0g
- ❖ Peptone pepsique de viande 3,0g
- ❖ Extrait de levure 5,0g
- ❖ Bile de bœuf déshydratée 10,0g
- ❖ Azide de sodium 0,25 g
- ❖ Esculine 1,0g
- ❖ Citrate ferrique ammoniacal 0,5g
- ❖ Citrate de sodium 1,0g
- ❖ Chlorure de sodium 5,0g
- ❖ Agar 13,0g
- ❖ pH = 7,1

Milieu Moeller + Arginine

- ❖ Extrait de levure 3g
- ❖ L-arginine (monochlorhydrate) 5 g
- ❖ Glucose 1g
- ❖ Bromocrésol pourpre 0,16mg
- ❖ Éthanol 1 mL
- ❖ Chlorure de sodium..... 5 g
- ❖ pH = 6,8

❖ Annexe II : Matériels utilisés dans cette étude.

Appareillage :

- Agitateur électrique muni d'une plaque chauffante,

- Autoclave,
- Bain marie,
- Balance,
- Centrifugeuse,
- Compteur des colonies,
- Etuve,
- Hotte,
- Micropipette,
- Microscope optique,
- pH-mètre,
- Réfrigérateur,
- Spectrophotomètre,
- Vortex électrique,

Réactifs, colorants et autres :

- L'eau oxygéné,
- Eau physiologique,
- Fuchsine,
- Huile à immersion,
- Huile de parafine
- Lugol,
- NaOH,
- Violet de Gentiane,
- VP1 et VP2,
- TDA,
- Kovac,

Autre matériel :

- Bec-benzène.
- Boîtes de Pétri.

- Tubes à essai.
- Lames.
- Lamelles.
- Anse de platine.
- Pipettes Pasteur.
- Portoirs.
- Flacons stériles.
- Ecouvillon stérile.
- Cloche de Durham.
- Eppendorfs.
- Becher 100 à 1000 ML.
- Membrane millipores.

❖ **Annexe III** : photo des appareils utiliser dans cette étude



