

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université SAAD DAHLEB – Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département De Biologie

Mémoire de fin d'études

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

Filière Sciences Biologiques

Option : Microbiologie

Thème :

***Etude du pouvoir biotechnologique des
bactéries lactiques isolées de produits laitiers***

Présenté par :

☆ **Bedrouni Samia**

☆ **Belarbi Nawal**

Date de soutenance :

13 / 07/ 2021

Devant le jury :

- **Mme Ait Saadi N**
- **Mme Boudjema N**
- **Mme Benhouna I**

MCB / USDB

MCA/ USDB

MCB/ USDB

Présidente

Examinatrice

Promotrice

Promotion: 2020/2021

Dédicaces

Ce mémoire présente plus que de simples travaux. Ce mémoire est la finalité de cinq longues années d'études.

C'est un moment de plaisir de dédier cet œuvre à:

Ma chère maman Taouled kheira,

Que nulle dédicace ne puisse exprimer mes sincères sentiments, pour ta patience illimitée, ton encouragement contenu, ton aide, en témoignage de mon profond amour et respect pour tes grands sacrifices.

Je souhaite que tu restes toujours près de moi et que DIEU te protège et te donne bonne santé.

Mon seul frère Mohamed et Mes belles chères sœurs

Yasmina, Amel, Fella, Siham et avec, en signe d'amour, de reconnaissance et de gratitude pour le dévouement et les sacrifices dont vous avez fait toujours preuves à mon égard

A la joie de la famille, le petit poussin Israa Bahia, je t'aime beaucoup

*A la mémoire de ma chère grand-mère **Cherifa**, et mon grand père **baba Tahar**
'Qu'Allah les accorde sa miséricorde'*

A mon mari

A toutes mes amies ;

Yasmine, Lina, Leila, Rania, kaouther, Marwa, Souna et ses deux fils Maryam et Jaber.

A ceux qui ont eu le privilège de passer des moments inoubliables à l'université mes fidèles amies : Randa, Aalima, Fati, Hafsa, Ichraha, l'adorable Nahla et la famille Dalton sans oublier Zola, Samah, Hadil et Ferial, je vous aime très fort 'Que Dieu vous bénisse'

Très particulièrement à celui qui a toujours été mon soutien et n'a pas lésiné sur les conseils et m'a donné de l'espoir et m'a motivé à persévérer ; ma source d'endurance inspirante et idéale, ma sœur et mon amie Meryam Imelhayen

'Que Dieu t'accorde la réussite dans ton parcours doctoral et dans ta vie '

Louange à Allah, par la grâce de qui les bonnes œuvres sont accomplies.

Nawal



Dédicaces

Je dédie ce modeste travail qui est le fruit de plusieurs années d'étude à :

***Ma mère et mon père** qui ont sacrifié de tout cher pour que je puisse poursuivre mes études.*

*Mon frère **Chems Eddine** et mes sœurs **Nada** et **Marwa** pour leur soutien et leur aide permanents.*

*Mes amies : **El fertas Asma, Bounaim Khadija Wanissa, Chabane Rommaissa, Cherifi Anissa, Aftis Ouidad, Lettreuch Sihem, Nkulu Kalobwe Martine** et mon binôme **Belarbi Nawal**.*

*Ma petite princesse **Roya***

*A tous les membres de la famille **BEDROUNI** chacun en son nom.*

A toutes les personnes que j'aime et qui m'aiment.

Samia



Remerciement

*Avant tout nous remercions **ALLAH**, le tout puissant, de nous avoir donné, le courage, la force, la santé et la persistance.*

*Nous adressons nos vifs remerciements à notre Encadreur **Mme. Benhouna. I**, de nous avoir proposé ce thème, pour ses orientations et son suivi durant toute la période de la réalisation de ce travail.*

*Nous tenons à remercier vivement **Mme Ait Saadi** de nous avoir fait un immense honneur de présider le jury.*

*Nos vives remerciements s'adressent également à **Mme Boudjema N**, d'avoir évalué et examiner ce travail.*

*Nous remercions tous **nos enseignants**, pour leur patience et tous les efforts et leurs conseils pendant nos études.*

Nos très spéciaux remerciements reviennent à nos Parents, et aux familles:

Belarbi et Bedrouni.

Merci à tous !

Table des matières

ملخص	1
Résumé:	2
Abstract.....	3
Liste des abréviations.....	4
Liste des figures.....	6
Liste des tableaux.....	7
Introduction	8

Synthèse bibliographique

Chapitre I: Les bactéries lactiques	11
I.1. Généralités :	11
I.2. Classification des bactéries lactiques :	12
I.2.1. Lactobacillus :	13
I.2.2. Leuconostoc :	14
I.2.3. Streptococcus :	15
I.2.4. Enterococcus :	15
I.2.5. Lactococcus :	16
I.2.6. Weissella :	16
I.3. Intérêts technologiques des bactéries lactiques :	17
I.3.1. Activité acidifiante :	17
I.3.2. Activité protéolytique :	18
I.3.3. Pouvoir lipolytique :	20
I.3.4. Activité aromatisante :	21
I.3.5. Pouvoir texturant :	21
I.3.6. Activité antibactérienne :	22
Chapitre II: Exploitation des bactéries lactiques	23
II.1. Intérêt des bactéries lactiques dans l'industrie alimentaire :	23
II.2. Intérêt des bactéries lactiques dans le domaine de la santé :	28
II.2.1. Application des probiotiques :	28
II.2.2. Application des bactériocines :	31

Etude expérimentale

I. Provenance des bactéries utilisées:.....	34
I.1. Bactéries lactiques :.....	34
I.2. Les souches pathogènes :.....	35
II. Revivification des souches :.....	35
III. Vérification de la pureté des souches :.....	35
III.1. Étude macroscopique :.....	35
III.2. Étude microscopique:.....	36
III.3. Test de catalase :.....	36
IV. Etude des caractéristiques technologiques des bactéries lactiques :.....	36
IV.1. Mise en évidence de l'activité protéolytique :.....	36
IV.2. Mise en évidence de l'activité lipolytique :.....	36
IV.3. Mise en évidence du pouvoir aromatisant :.....	37
IV.4. Mise en évidence de l'activité acidifiante et coagulante :.....	37
IV.5. Mise en évidence du pouvoir texturant (production des exopolysaccharides):.....	37
IV.6. Mise en évidence de l'Activité antibactérienne :.....	38
IV.7. La résistance aux antibiotiques :.....	38
IV.8. Conservation des souches :.....	39
IV.8.1. Conservation à court terme :.....	39
IV.8.2. Conservation à long terme :.....	39

Résultats

I. Vérification de la pureté des souches :.....	41
I.1. Caractérisation macroscopique et microscopique :.....	41
II. Etude morphologique :.....	41
II.1. Les bactéries lactiques sur milieu liquide :.....	42
II.1.1. Examen microscopiques (coloration de Gram) :.....	42
II.1.2. Réaction de catalase :.....	42
III. Evaluation des aptitudes technologiques chez les souches lactique :.....	44
III.1. Pouvoir protéolytique :.....	44
III. 2. Activité lipolytique :.....	45

III.3. Pouvoir aromatisant :	47
III.4. Activité acidifiante et coagulante :	47
III.5. Production des EPS :	49
III.6. Activité antimicrobienne :	49
III.7. Résistance aux antibiotiques :	51

Discussion

I.Evaluation des aptitudes technologiques chez les souches lactique :	54
I.1. Pouvoir protéolytique :	54
I.2. Pouvoir lipolytique :	55
I.3. Activité antimicrobienne :	55
I.3.1. L'Activité antibactérienne vis-à-vis <i>Escherichia coli</i> :	56
I.3.2. L'Activité antibactérienne vis-à-vis <i>Klebsiella pneumoniae</i> :	56
I.3.3. L'Activité antibactérienne vis-à-vis <i>Pseudomonas aeruginosa</i> :	57
I.3.4. L'Activité antibactérienne vis-à-vis <i>Staphylococcus aureus</i> :	57
I.3.5. L'Activité antibactérienne vis-à-vis <i>Listeria monocytogenes</i> :	58
I.4. Résistance aux antibiotiques :	59
Conclusion.....	60
Références bibliographiques.....	62

Annexes

ملخص

البكتيريا اللبنية هي بكتيريا موجبة الجرام ، تظهر على شكل عقد أو عصيات ، وتتمثل وظيفتها الرئيسية في تخمير السكريات وتحويلها إلى حمض اللاكتيك. تُستخدم هذه البكتيريا في جميع أنحاء العالم ، ولا سيما في منتجات الألبان المخمرة الزبادي ، الجبن والزبدة ... الخ).

يهدف العمل الحالي إلى تسليط الضوء على الخصائص التكنولوجية في تسع سلالات من البكتيريا اللبنية المعزولة من منتجات الألبان المختلفة (حليب البقر وحليب الإبل والزبدة التقليدية والجبن التقليدي) ، وهي: القوة المحللة للبروتين ومحلل الدهون ، إنتاج الأسيتوين والسكريات الخارجية ، والنشاط المضاد للبكتيريا ومقاومة المضادات الحيوية.

توضح النتائج التي تم الحصول عليها أن سلالة LC3 لها أكبر نشاط تحلل للبروتين بقطر 27 مم بتركيز 5 ٪ تليها سلالة W1 بقطر 26 مم وقد لوحظ أضعف نشاط للتحلل البروتيني بواسطة سلالة W2 بقطر 19 مم.

توصلنا إلى أن نشاط تحلل الدهون في السلالات مثير للاهتمام حيث لوحظ أكبر نشاط لتحلل الدهون في سلالة LB2 بقطر 31 مم. تليها سلالة W2 التي يبلغ قطرها 23.5 مم. كما أن اضعف نشاط لوحظ من قبل سلالة LB1 بمساحة 9 مم.

فيما يتعلق بإنتاج الأسيتوين من السلالات ، تظهر نتائجنا أن *Weissella confusa* هي السلالة الوحيدة القادرة على إنتاج الأسيتوين.

بعد ذلك ، جربنا قدرة سلالاتنا على إنتاج عديدات السكاريد الخارجية ، وهي ميزة مطلوبة بشدة في صناعات الزبادي والجبن ، وقد ثبت أن سلالاتنا جميعها قادرة على إنتاج عديدات السكاريد الخارجية.

أخيراً ، تمت دراسة النشاط المضاد للميكروبات للبكتيريا ضد السلالات المسببة للأمراض المختلفة ، حيث تشير النتائج إلى أن جميع سلالات حمض اللاكتيك لها تأثير مثبط ضد السلالات الممرضة الخمسة المستخدمة بالإضافة إلى ملاحظة حساسية السلالات لأي مجموعة من المضادات الحيوية المستخدمة. هذا يمنحهم الملائمة للاستخدام في صناعة المواد الغذائية.

هذه الخصائص التكنولوجية التي يمكن استغلالها في صناعات الألبان تمنح هذه السلالات وخاصة سلالة *Weissella confusa* أهمية خاصة.

الكلمات المفتاحية :

البكتيريا اللبنية نشاط تحلل البروتين نشاط تحلل الدهون ، إنتاج الأسيتوين ، تثبيط البكتيريا الممرضة

Résumé:

Les bactéries lactiques sont des bactéries à gram positif, présentées sous forme de coques ou de bâtonnets, et ayant pour principale fonction de fermenter les sucres en acide lactique. Ces bactéries sont utilisées dans le monde entier, en particulier dans les laitages fermentés (yaourt, fromage, beurre,...).

Le présent travail vise à la mise en évidence des aptitudes technologiques chez neuf souches de bactéries lactiques isolées à partir de différents produits laitiers (lait de vache, lait de chamelle, beurre traditionnel et de fromage traditionnel), à savoir: Le pouvoir protéolytique, et lipolytique; la production d'acétoïne et d'exopolysaccharides, l'activité antibactérienne et la résistance aux antibiotiques.

Les résultats obtenus démontrent que la souche LC3 a la plus grande activité protéolytique avec un diamètre de 27 mm à une concentration de 5% suivi par la souche W1 avec un diamètre de 26 mm. L'activité protéolytique la plus faible a été notée par la souche W2 avec une zone de 19 mm.

L'activité lipolytique des souches s'est révélée intéressante où on a constaté la plus grande activité lipolytique chez la souche LB2 avec un diamètre de 31 mm suivi par la souche W2 avec un diamètre de 23,5 mm. L'activité lipolytique la plus faible a été notée par la souche LB1 avec une zone de 9 mm.

Pour ce qui est de la production d'acétoïne des souches nos résultats démontrent que W1 est la seule souche capable de produire de l'acétoïne.

Par la suite, nous avons expérimenté la capacité de nos souches à produire des exopolysaccharides un caractère très recherché en industries du yaourt et de la fromagerie, nos souches se sont avérées toutes capables de produire des exopolysaccharides.

En dernier, l'activité antimicrobienne des bactéries été étudié envers divers souches pathogènes, où les résultats indiquent que toutes les souches des bactéries lactiques possèdent un effet inhibiteur contre les cinq souches pathogènes utilisées ainsi qu'une sensibilité des souches est observée pour toute la gamme d'antibiotiques utilisé ce qu'il leur confère l'aptitude à être utilisé en industrie alimentaire.

Ces propriétés technologiques pouvant être exploitées en industries laitière confèrent a ces souches et plus particulièrement à la souche *Weissella confusa* une importance particulière.

Mots clés : bactéries lactiques, aptitudes technologiques, pouvoir lipolytique, pouvoir protéolytique, activité antimicrobienne, production d'acétoïne.

Abstract

Lactic acid bacteria are gram-positive bacteria, presented in the form of shells or rods, and whose main function is to ferment sugars into lactic acid. These bacteria are used all over the world, in particular in fermented dairy products (yogurt, cheese, butter, etc.).

The present work aims to highlight the technological aptitudes in nine strains of lactic acid bacteria isolated from different dairy products (cow's milk, camel's milk, traditional butter and traditional cheese), namely : The proteolytic power, and lipolytic ; production of acetoin and exopolysaccharides, antibacterial activity and resistance to antibiotics.

The results obtained demonstrate that the strain LC3 has the greatest proteolytic activity with a diameter of 27 mm at a concentration of 5% followed by the strain W1 with a diameter of 26 mm. The lowest proteolytic activity was noted by the W2 strain with an area of 19 mm.

The lipolytic activity of the strains was found to be interesting or the greatest lipolytic activity was observed in the LB2 strain with a diameter of 31 mm followed by the W2 strain with a diameter of 23.5 mm. The weakest was noted by the strain LC3 with an area of 12.5 mm.

Regarding the production of acetoin from the strains, our results show that W1 is the only strain capable of producing acetoin.

Subsequently, we experimented with the ability of our strains to produce exopolysaccharides, a character that is highly sought after in the yogurt and cheese industries, our strains have all been shown to be capable of producing exopolysaccharides.

Lastly, the antimicrobial activity of bacteria was studied against various pathogenic strains, where the results indicate that all lactic acid strains have an inhibitory effect against the five pathogenic strains used as well as a sensitivity of the strains is observed for any the range of antibiotics used this gives them the suitability for use in the food industry.

These technological properties which can be exploited in dairy industries confer on these strains and more particularly on the *Weissella confusa* strain a particular importance.

Key words: lactic acid bacteria, technological aptitudes, proteolytic activity, lipolytic activity, antibacterial activity, production of acetoin.

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique.

ARN : Acide ribonucléique.

ATCC: American Type Culture Collection.

BL: Bactérie lactique.

BN: Bouillon nutritif.

E.: *Escherichia coli*.

EPS: Exopolysaccharides.

GN: Gélose nutritive.

L.: *Listeria*.

Lb.: *Lactobacillus*.

Lc. *Leuconostoc*.

ml: millilitre.

MRS: Man Rogosa Sharpe.

MSE: Mayeux Sandine et Elliker.

NaOH : Hydroxyde de sodium.

PCA : Plate Count Agar

PH : Potentiel d'hydrogène.

PCR: Polymerase chain reaction.

S. aureus : *Staphylococcus aureus*.

St.: *Streptococcus*.

Sp: espèces.

Sub sp: sous espèces.

T°: Température.

V : volume.

VP : Voges proskauer.

W. : *Weissella*

% : pourcentage.

°C : degré Celsius.

μl : Microlitre

Liste des figures

Figure 1: L'arbre phylogénétique des bactéries lactiques	12
Figure 2: Schéma de conservation à longue durée des bactéries lactiques purifiées.	39
Figure 3: Observation macroscopique des colonies de la souche LB2 cultivée sur milieu solide MRS.	41
Figure 4: La croissance des souches lactiques sur milieu MRS liquide.	42
Figure 5: Observation au microscope optique de la forme des cellules et leur mode d'association de la souche <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (A) et la souche <i>Weissella confusa</i> (B) (G x100).	42
Figure 6: Résultat négatif du test de la catalase.....	43
Figure 7: Activité protéolytique des souches lactiques sur milieu PCA + 3% de lait écrémé.	44
Figure 8: Mise en évidence de l'activité lipolytique des souches sur milieu MRS + 3% d'huile d'olive	46
Figure 9 : Production de l'acétoïne par les bactéries lactique.....	47
Figure 10 : Coagulums visuels apparus sur la face intérieure des tubes de verre de quelques souches lactique après 24h d'incubation.	48
Figure 11 : Valeurs de PH du lait écrémé inoculés avec des souches lactiques après 24h d'incubation à 30°C.	48
Figure 12 : Aspect des colonies de la souche W4 sur milieu MSE.	49
Figure 13 : Interaction entre les souches lactiques et les souches pathogènes (1/2).	50
Figure 14 : Interaction entre les souches lactiques et les souches pathogènes (2/2).	50
Figure 15 : Quelques résultats de l'activité antimicrobienne des souches lactiques isolées vis-à-vis des souches pathogènes testés.	51
Figure 16: Antibiogramme des souches lactiques.	51

Liste des tableaux

Tableau I: Provenance et identification des souches utilisées dans ce travail	34
Tableau II: Resultats de l'observation microscopiques et de test catalase des souches lactiques.....	43
Tableau III: Diamètres de protéolyse des souches lactiques testées (en mm).....	45
Tableau IV: Mise en évidence de l'activité lipolytique des souches lactiques.....	46
Tableau V: Résultats du test de sensibilité aux antibiotiques des souches lactiques (S): sensible.....	52

Introduction

Les bactéries lactiques sont utilisées depuis plusieurs siècles comme des agents protecteurs dans les aliments fermentés. Ces bactéries ont un rôle dans la préservation des aliments, la préservation d'empoisonnement, l'augmentation de la valeur nutritive et l'amélioration de la qualité organoleptique des aliments. Les espèces de bactéries lactiques sont présentés dans une grande variété des aliments : le lait fermenté, les yaourts, les fromages et les produits carnés fermentés **(Bolottin et al, 2001 ; Mami A, 2013)**.

Elles forment un groupe de bactéries bénéfiques pour l'homme, leur apports bénéfiques consistent à l'amélioration de la qualité des produits fermentés en y développant certaines caractéristiques organoleptiques, sans altérer ni le goût ni l'odeur, et 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 diacetyl et les bactériocines **(Dortu et Thonart, 2009;Voraes et al, 2010 ; L. Adjimiet H. Bouftouha, 2015)**.

Ces bactéries contribuent aussi par leurs activités enzymatiques variées, a la production de composés volatils qui participent au développement de l'arôme, de la saveur, et de la texture de plusieurs produits laitiers. Certaines bactéries lactiques produisent des exo polysaccharides qui jouent un rôle important dans le développement de la texture de plusieurs produits laitiers **(Labaoui et al, 2005)**.

Actuellement, on définit les ferments lactiques comme étant des cultures pures ou des mélanges de bactéries lactiques sélectionnées et utilisées pour la fabrication de produits fermentés comme les yaourts, et les fromages **(Leroy et De Vuyst., 2004 ; Mäyrä-Mäkinen et Bigret, 2004)**.

Dans ces conditions, il apparait intéressant et utile de collecter et de sélectionner de nouvelles souches de bactéries lactiques, issues de différents biotopes naturels, afin d'en exploiter ces propriétés technologiques dans divers domaines (agroalimentaire, pharmaceutique, vétérinaire ...etc).

L'objectif de notre travail consiste à mettre en évidence quelques aptitudes technologiques, notamment le pouvoir protéolytique, lipolytique, la production d'acétoïne et d'exo polysaccharides, et l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques.

Synthèse bibliographique

Chapitre I: Les bactéries lactiques

I.1. Généralités :

Les bactéries lactiques (BL) sont des cellules procaryotes à Gram positif, qui produisent de l'acide lactique et qui partagent les caractéristiques suivantes: elles sont généralement immobiles, asporulantes, apigmentées, catalase négative, anaérobies mais aérotolérantes, à métabolisme fermentaire strict, et capables de croître à des températures comprises entre 10°C et 45°C avec une tolérance élevée pour un faible PH. Pour croître, elles ont besoin de sources de carbone organique (glucides fermentescibles).

De nombreuses BL ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés ou les peptides, les vitamines et les acides gras (**Russell et Gould, 2012 ; Mokoena, 2017**).

Les BL peuvent s'adapter à de nombreuses conditions environnementales afin de survivre, puisqu'elles colonisent de nombreuses matrices alimentaires telles que le lait, la viande, les légumes et les céréales. Elles appartiennent aussi à la flore de l'appareil digestif et vaginal humain. Pour que cette colonisation se produise, les besoins nutritionnels complexes doivent être prévus, y compris les sucres fermentescibles et plusieurs autres composants essentiels pour assurer et/ou améliorer leur métabolisme et ainsi produire un nombre important de métabolites avec de larges applications dans les aliments et l'industries pharmaceutiques (**Mazzoli et al., 2014**).

Les BL sont classées en deux groupes selon leurs voies métaboliques:

- **Homofermentaires**, où l'acide lactique est le principal produit final.
- **Hétérofermentaires**, qui produit d'autres produits finis tels que l'acide acétique, dioxyde de carbone (CO₂) ou composés aromatiques, en plus de l'acide lactique (**Tropcheva et al, 2014**

Elles ont une activité antagoniste dirigée particulièrement contre les espèces à gram positif génétiquement apparentées aussi contre certaines bactéries à gram négatif y compris des bactéries pathogènes et/ou altération alimentaire (**Gong et al, 2010 ; Ghodhbane et al, 2014 ; Pieniz et al, 2014 ; Verma et al, 2014**).

Les bactéries lactiques sont capables de produire de nombreux composés aromatiques tels que : l' α -acétolactate, l'acétaldéhyde, le diacétyle, l'acétoïne et 2,3-butanediol, l'éthanol, l'acétate, le formiate, ...etc. principalement à partir du lactose, du citrate, des acides aminés et des matières grasses (Cholet, 2006). La production des composés aromatiques participe à l'amélioration des propriétés organoleptiques des aliments en provoquant des changements de texture et d'arôme (MOKDAD. F, 2020).

I.2. Classification des bactéries lactiques :

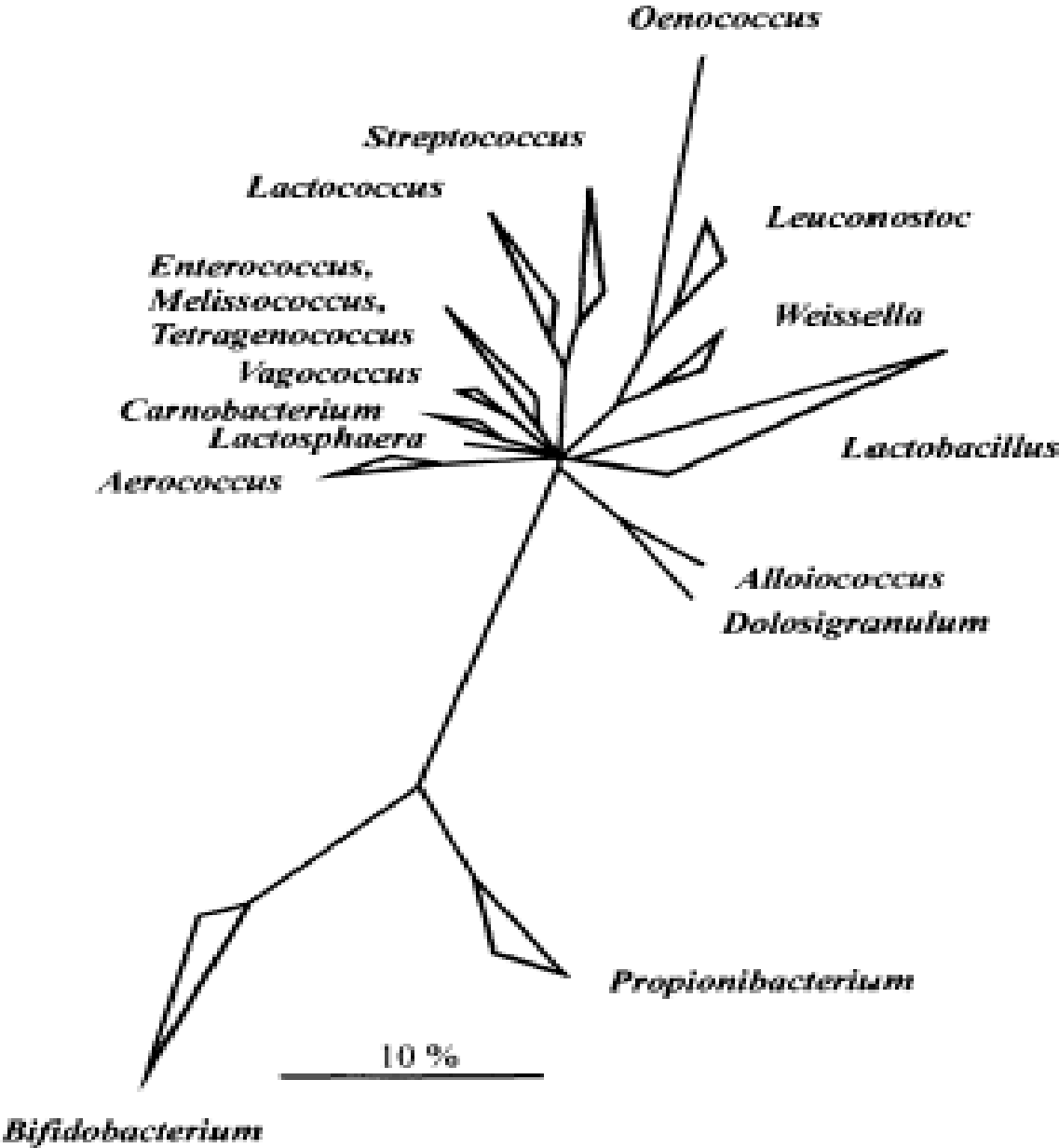


Figure 1: L'arbre phylogénétique des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques se trouvent dans deux embranchements distincts : Firmicutes et Actinobacteria. L'embranchement des Firmicutes renferme les genres les plus importants : *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* et *Weissella* qui appartiennent à l'ordre des Lactobacillales, caractérisé par une faible teneur en GC (31 - 49%). L'embranchement des Actinobacteria renferme le genre *Bifidobacterium*, qui est caractérisé par une teneur élevée en GC (58-61 %). Les BL sont considérées comme un groupe « en expansion rapide » vu le nombre important de nouvelles espèces. Elles sont groupées en six familles et 40 genres : Aerococcaceae (7 genres) ; Carnobacteriaceae (16 genres) ; Enterococcaceae (7 genres) ; Lactobacillaceae (3 genres) ; Leuconostocaceae (4 genres) ; Streptococcaceae (3 genres) (**Holzappel & Wood, 2014; MOKDAD. F, 2020**).

Traditionnellement, les bactéries lactiques ont été classées sur la base des propriétés phénotypiques: la morphologie, le mode de fermentation du glucose, la croissance à différentes températures, l'isomère de l'acide lactique produit et la fermentation des différents hydrates de carbone. Mais, certaines espèces ne sont pas faciles à distinguer par des caractéristiques phénotypiques (**Gevers, 2002**). Par conséquent, Les méthodes de typage moléculaire telles que l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE), la réaction de polymérisation en chaîne utilisant des éléments répétés (rep-PCR), ainsi que la méthode de (RFLP) sont extrêmement précieux pour la caractérisation et la détection des bactéries lactiques. Actuellement, avec les technologies de la PCR et du séquençage automatique de l'ADN du gène de l'ARNr 16S, l'identification des espèces est devenue une pratique plus simple et rapide ce qui permet identification plus cohérente et précise de souches individuelles (**Holzappel & Wood, 2014 ;MOKDAD. F, 2020**).

1.2.1. *Lactobacillus* :

Les bactéries du genre *Lactobacillus* ont des aspects variés allant du bacille long et fin au coccobacille en passant par la forme bâtonnet court ou légèrement flexueux. Ils sont Gram positif, non sporulés, fréquemment associés en chaînettes et habituellement immobiles. Les lactobacilles se montrent généralement plus résistants au stress acide que les lactocoques (**Siegmund et al, 2000 ; AMMOURI. K et REKIK. S 2019**).

La multiplicité des niches écologiques des lactobacilles se reflète dans la diversité et de l'hétérogène phylogénie du genre. Le genre comprend plus d'une centaine d'espèces différentes (**Lahtinen et al, 2012**).

Les lactobacilles ont été utilisés comme mesure préventive dans la lutte contre l'intolérance au lactose et inhiber la croissance des micro-organismes pathogènes nuisibles à l'aide d'une réduction du pH de l'intestin. Certaines souches sont capables de produire des bactériocines et d'autres produits métaboliques comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), le dioxyde de carbone (CO₂) et de diacetyl (**Elfahri, 2012**).

Le genre *Lactobacillus* a été subdivisé par Orla-jensen en trois groupes et cette classification est encore utilisée en milieu industriel (**Tamime, 2002 ; Guiraud et Rosec, 2004**).

- Groupe I « *Thermobacterium* » : comprend les lactobacilles homofermentaires thermophiles qui se développent à 45°C. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation (lait, yaourt, fromage) sont *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. acidophilus*. (**Tamime, 2002 ; Guiraud et Rosec, 2004**).
- Groupe II « *Streptobacterium* » : regroupe les lactobacilles homofermentaires mésophiles et peuvent être occasionnellement hétéro-fermentaires en fonction du substrat. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation sont *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. sake* et *Lb. plantarum*. (**Tamime, 2002 ; Guiraud et Rosec, 2004**).
- Groupe III « *Betabacterium* » : regroupe des lactobacilles hétéro-fermentaires. Il comporte les espèces *Lb. fermentum*, *Lb. brevis* et *Lb. Sanfransisco* (**Tamime., 2002 ; Guiraud et Rosec., 2004 ; MOKDAD. F, 2020**).

I.2.2. *Leuconostoc* :

Les *leuconostoc* sont des microorganismes procaryotes, mésophile, saprophytes, asporulés, habituellement non mobiles, dépourvus d'oxydase et de catalase, à Gram positif, appartenant à la famille des Leuconostoccaceae, anaérobie facultatif avec une forme ovoïde, associées en paires ou en chaînes courtes, elles colonisent des écosystèmes très variés tel que les végétaux et les animaux (**Hannachi, 2008**).

Leur température optimale de croissance se situe entre 25 °C et 30 °C. Les *Leuconostoc* sont caractérisées par un métabolisme hétérofermentaire, ils produisent de l'acide lactique, du CO₂ et de l'éthanol (HO, 2008).

De plus, la production des EPS à partir de saccharose favorise apparemment l'activité antimicrobienne in vitro contre les bactéries pathogènes et peut donc affecter positivement l'adhésion intestinale des bactéries probiotiques. Les effets bénéfiques des *L. mesenteroides* en font des bons candidats pour leur incorporation dans les produits fonctionnels (Benmechernene et al., 2013 ; De Paula et al., 2015 ; Diana et al., 2015 ; Giles Gómez et al., 2016 ; MOKDAD. F, 2020).

Les souches de *Leuconostoc* dites citrate-positives, nécessitent la présence de la citrate perméase, enzyme responsable du transport de citrate vers l'intérieur de la cellule, et une citratéylase. Les leuconostocs peuvent produire le diacétyle, le principal composé aromatique recherché dans les produits laitiers, l'acétoïne, le 2,3-butanediol, l'éthanol et l'acétate. Cependant, les leuconostocs utilisent le citrate très rapidement, alors qu'elles ne produisent le diacétyle et l'acétoïne que tardivement, jusqu'à acidification du milieu (Hemme & Foucaud Scheunemann, 2004 ; MOKDAD. F, 2020).

I.2.3. Streptococcus :

Des microorganismes appartenant à la famille de Streptococcaceae, ils ont une forme ovoïde, sphérique ou quelque fois allongées en fuseaux en paires ou en chaînettes de moins de 2µm de diamètre. Ce sont des bactéries à Gram positif, catalase négative, anaérobie facultative, sont toujours ou presque immobiles ils se distinguent par leur capacité de croître à 45°C.

Les streptocoques sont nutritionnellement fastidieux avec une demande de variabilité nutritionnelle (Diallo 2010 ; Rabah, 2010).

I.2.4. Enterococcus :

Appartient à la famille des Enterococcaceae, comporte actuellement 40 espèces. Ce sont des bactéries à Gram positif, aéro-anaérobies, généralement catalase négative, non sporulées qui se présentent sous forme de coques isolés ou arrangés en paires ou en chaînettes, homofermentaires, et cultivant avec un optimum thermique de 35 °C, à pH 9, 6.

Les espèces *E. faecalis*, *E. faecium* et *E. durans* sont de médiocres agents acidifiants et protéolytiques du lait, *E. faecalis* présentant les plus fortes activités.

Certaines souches d'*Enterococcus faecium* possèdent un effet favorable sur la croissance des animaux par compétition avec les germes pathogènes **(Fisher et Phillips, 2009; Silva et al, 2012; Bendimerad, 2013; Isnard, 2017)**

I.2.5. *Lactococcus* :

Les lactocoques appartiennent à la famille des *Streptococcaceae*, sont des cocci en paires ou en chaînes, de longueur variable de 0,5 à 1 µm de diamètre, à Gram positif **(Lazreg, 2017)**. Ce sont des bactéries aéro-anaérobie facultatifs, immobiles, mésophiles, homofermentaires, ne produisant que de l'acide lactique L (+). Seuls *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis biovar* et *Lactococcus diacetylactis* produisent le diacétyle. Leur température optimale de croissance est proche de 30°C, capables de se développer à 10°C, mais pas à 45°C. En technologie laitière, les lactocoques jouent un rôle d'agent acidifiant « bio conservateur » **(Tchamba, 2007)**.

I.2.6. *Weissella* :

Les cellules de ce genre sont en forme de bâtonnet courts ou coccoïdes, non mobiles, séparées par paires ou en courtes chaînes. Possédant un métabolisme hétérofermentaire, et produisent généralement à partir du glucose de l'acide lactique de forme (DL). Les *Weissella* poussent à 15°C mais certaines d'entre elles supportent une température de 45°C **(Björkroth et Holzappel, 2006 ; Fusco et al, 2015)**.

Weissella impliquées dans de telles fermentations traditionnelles, des souches de *Weissella* spécifiques sont également considérées comme probiotiques potentiels comme la souche *W. cibaria*.

En plus de 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. Ces polymères font l'objet d'une attention accrue pour leurs applications potentielles en tant que prébiotiques et pour une large gamme d'applications industrielles, principalement pour la boulangerie et pour la

production de boissons fonctionnelles fermentées telles que le kéfir et celles à base de céréales telles que le Rejuvalac.

I.3. Intérêts technologiques des bactéries lactiques :

I.3.1. Activité acidifiante :

La fonction acidifiante constitue la propriété métabolique la plus recherchée des bactéries lactiques utilisées dans les industries alimentaires. Elle se manifeste par l'hydrolyse de lactose grâce à la bêta-galactosidase pour produire le glucose et le galactose. Généralement le glucose provenant de cette hydrolyse sera fermenté pour produire des composés acides, du gaz carbonique ou de l'alcool. Cette production de composés acides va entraîner une baisse de pH. Cette dernière peut induire des odeurs et des goûts particuliers. De plus, l'acidification limite les risques de développement de flore pathogène au cours de la croissance **(Dib, 2015 ; Boullouf, 2016)**.

Le catabolisme fermentaire des hexoses conduit chez les LAB à un fort abaissement du pH extracellulaire et la production en grand quantité d'acide lactique. Le processus d'acidification fortement associé à la croissance bactérienne, se traduit par l'accumulation d'acide lactique dans le milieu. Ainsi les hexoses autre que le glucose, telles que le mannose le galactose et fructose sont ainsi fermentés pour produire des odeurs et des goûts particuliers recherchés dans les produits alimentaire en particulier dans les fromages **(Monnet et al., 2008 ; Visintin et al., 2016)**. L'acidification du lait permet en outre la coagulation du lait, l'augmentation de la synérèse du caillé, le développement des propriétés rhéologique du produit final et l'inhibition de la croissance des autres microorganismes en particulier les bactéries pathogènes **(Huang et al., 2004 ; Sumarsih et al, 2012)**.

Les laits fermentés sont des produits laitiers obtenus par la fermentation du lait, lesquels peuvent avoir été fabriqués à base de produits obtenus à partir de lait avec ou sans modification de composition, par l'action de micro-organismes appropriés et résultant de la diminution du pH avec ou sans coagulation. Le plus connu des laits fermentés est le yaourt **(Savadogo et Traore, 2011 ; Allouache et al, 2017)**.

I.3.2. Activité protéolytique :

La protéolyse se définit comme étant l'hydrolyse des protéines et des peptides en acides aminés **(UPADHYAY et al, 2004 ; HALZOUN. F, 2015)**.

Les bactéries lactiques possèdent des protéinases et des peptidases nécessaires à la dégradation des protéines du lait en peptides et acides aminés, ceux-ci peuvent alors être transformés en alcools et en acides, Cette activité protéolytique intervient de ce fait dans les caractéristiques du produit final. Technologiquement, l'activité protéolytique constitue un caractère très important qui fait des bactéries lactique les seuls agents microbiens d'affinage de la majorité des fromages **(Mahi, 2010)**, De nombreuses protéases sont synthétisées par les bactéries lactiques qui peuvent être des aminopeptidases, dipeptidases ou tripeptidases, situées au niveau de la membrane plasmique ou dans le cytoplasme **(Bennama, 2012)**.

La protéolyse de caséine se manifeste en changeant le goût et la texture finale et cela est probablement lié à une certaine lyse des cellules qui libèrent les enzymes protéolytiques internes **(Hemme, 2012)**. La protéolyse est l'événement biochimique le plus complexe et peut-être le plus important pendant la maturation de la plupart des variétés de fromage **(MOKDAD ,2020)**.

En termes de technologie fromagère on distingue deux types d'activités protéolytiques : La protéolyse primaire (protéinase) permet l'hydrolyse précoce des caséines du lait et les polypeptides due aux microorganismes présent lors de la fabrication et également aux enzymes contenues naturellement dans le lait ou apportées volontairement. La protéolyse secondaire correspond aux activités peptidasiques permettent l'hydrolyse des peptides en acides aminés libres. Elle essentiellement conduit par des bactéries lactiques dans les fromages à pâte cuite et les champignons dans le type pâte molle. Ces microorganismes sont équipées d'une large gamme de peptidases, aminopeptidases di et tripeptidases contribuent fortement à la dégradation des peptides issus de la protéolyse primaire **(González ,2010)**.

Le système protéolytique joue un rôle clé dans la fermentation du lait et permet l'obtention d'acides aminés à partir des caséines, les protéines les plus abondantes dans le lait.

Les bactéries lactiques provoquent une augmentation des protéines solubles dans le milieu et l'apparition de peptides et d'acides aminés qui outre le fait qu'ils stimulent la croissance des microorganismes, interviennent dans la formation de certains composés aromatiques (**Savijoki et al., 2006 ; F. Bounouala, 2019**). Ce microorganisme est responsable d'une activité protéolytique qui est le phénomène dominant lors de l'affinage et qui contribue dans l'apparition des courts peptides et acides aminés, précurseurs de nombreuses molécules riches en arômes et en saveurs.

Or la dégradation de la caséine durant ce processus participe également à la modification de la texture et la flaveur des fromages. A ce stade les aminopeptidases ont l'activité la plus forte en hydrolysant pratiquement la totalité des courts peptides hydrophobes responsables de l'apparition du goût des fromages (**Desmazeaud, 1998 ; F. Bounouala, 2019**). Une fraction de ces peptides est susceptible d'exercer des effets désirables chez le consommateur après l'ingestion de ce lait fermenté. Ces peptides sont désignés peptides fonctionnels ou encore peptides bioactifs. Il y a quatre domaines principaux dans lesquels l'effet observé lors de la consommation des produits laitiers, peut être attribué à ces peptides, qui sont respectivement, le système digestif, les défenses de l'organisme, le système cardio-vasculaire et le système nerveux (**Tomé, 1998 ; F. Bounouala, 2019**).

Certains *Lactobacillus*, notamment *Lb. curvatus* et *Lb. Plantarum* sont dotés des enzymes leucine et valine amino-peptidases, contribuant ainsi à la formation de la flaveur du produit par les acides aminés et les petits peptides produits.

De nombreux travaux ont été réalisés pour l'élaboration des gammes de produits hypoallergéniques à base de lait de vache qui représentent une part importante dans les allergies alimentaires, en augmentant l'hydrolyse des protéines du lait de vache en utilisant les systèmes protéolytiques des bactéries lactiques.

De plus, durant la fabrication de fromage, la protéolyse de la caséine joue un rôle central, les acides aminés résultants sont les principaux précurseurs d'arôme comme les alcools, aldéhydes, acides, esters et les composés soufrés (**Smit et al, 2005 ; F. Bounouala, 2019**).

I.3.3. Pouvoir lipolytique :

La lipolyse est définie comme l'hydrolyse des lipides en acides gras libres (**DEETH, 2011 ; HALZOUN. F, 2015**). Les activités lipolytiques des micro-organismes sont importantes pendant les étapes de maturation de certains produits alimentaires, et ces activités contribuent généralement au développement de différentes saveurs (**Béal et al, 2008**).

Les propriétés lipolytiques des bactéries lactiques sont généralement faibles et varient d'une espèce à l'autre. En effet, il a été démontré que les lactobacilles et *Streptococcus thermophilus* présentent des activités lipolytiques faibles à comparer par les lactocoques qui eux sont considérés plus lipolytiques (**Béal et al, 2008**). D'une manière générale, on distingue les estérases qui hydrolysent les esters formés avec les acides gras à courtes chaînes; les lipases qui sont actives sur des substrats émulsifiés contenant des acides gras à longues chaînes; ces enzymes sont impliquées aussi dans l'hydrolyse de mono; di et triglycérides. On retrouve aussi les licéthinasés qui hydrolysent le complexe licétine-viteline avec l'action des protéases (**Béal et al, 2008 ; Serhan et al, 2009**).

La propriété lipolytique peut cependant présenter un intérêt pour certaines applications fromagères (**Béal et al, 2008**). Les activités de l'estérase sont détectées chez les *leuconostocs*. L'éthanol ; comme étant le produit caractéristique de l'hétérofermentation des *leuconostocs* ; c'est l'alcool le plus courant dans le fromage. Il est également un précurseur obligatoire d'un grand nombre d'esters éthyliques. La biosynthèse de l'ester est probablement plus due à l'alcoololyse (hydrolyse par l'éthanol) qu'à l'estérification (l'estérase). Ces esters sont connus par leur goût fruité qui forme une partie de l'arôme de nombreux fromages mous et semi-durs. Cependant, ces esters pourraient être un défaut si leur présence est à des concentrations trop élevées (**Liu et al, 2014**).

La lipolyse est un processus critique dans certaines variétés de fromages, car elle favorise le ramollissement de la pâte et rend la texture plus douce, comme dans les fromages bleus, pâte dure italienne, fromage de type suisse (**Farahani et al, 2017**), fromage Scamorza et le fromage Pecorino (**Balthazar et al, 2017**). Ainsi, la sélection de LAB avec les deux activités peut être intéressante pour le développement de cultures starter pour les fromages de brebis régionaux et pour la caractérisation de l'origine de ces produits laitiers.

I.3.4. Activité aromatisante :

La production de composés aromatiques est liée à l'activité microbienne, plusieurs espèces de bactéries lactiques sont capables de synthétiser, à partir du citrate notamment, divers composés tels que le diacétyle, l'acétoïne, l'acétate, principaux composés responsables de l'arôme des produits laitiers fermentés. Le diacétyle est le principal composé qui participe à l'arôme de très nombreux produits laitiers qui est issu du métabolisme du citrate par différentes espèces de bactéries lactiques. D'autres travaux ont montrés la capacité de certaines bactéries lactiques à convertir les acides aminés en molécules aromatiques (**Hammi, 2016 ; Belkheir, 2017**).

L'acétoïne est l'un des molécules aromatiques du catabolisme des acides aminés (acide aspartique), comme il peut avoir comme origine la dégradation totale ou partielle de l'acide citrique pendant la fermentation lactique (**Hadef, 2012**).

I.3.5. Pouvoir texturant :

La capacité des bactéries lactiques à synthétiser des exopolysaccharides (EPS) joue un rôle important pour la consistance et la rhéologie des produits transformés (**Welman et Maddox., 2003 ; Ruas- Madiedo et al, 2002**).

Ces composés polymères sont généralement considérés comme des agents épaississants naturels en industrie alimentaire. Les *Lb. Delbrueckii sp. bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* produisant des EPS sont utilisés en tant que starters fonctionnels la fabrication des yaourts, ceci afin d'améliorer la texture, et augmenter la viscosité des produits finis (**Durlu Özkaya et al, 2007 ; Aatayakul et al, 2006**).

L'utilisation des EPS est très prometteuse pour la structure et la viscosité des produits laitiers fermentés (**Ruas-madiedo et al, 2005**).

Les bactéries lactiques ont souvent été utilisées en co-cultures pour initier et/ou améliorer la fermentation de nombreux aliments comme la choucroute, les saucisses ou les olives vertes, grâce à leurs propriétés d'acidification et de production de polysaccharides (**Settanni&Corsetti, 2008**).

I.3.6. Activité antibactérienne :

Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques peuvent être associées à de nombreux éléments. Elles résultent de l'effet combiné de différents facteurs biologiques provenant de leurs activités métaboliques (**Hadj. A, 2015**).

Parmi ces substances qui ont un effet antibactérien :

- **Les acides organiques** : (acide lactique, acétique et propionique) exercent par leur nature la diminution du pH qui a un important effet antimicrobien. En effet, l'acide acétique possède une forte activité antibactérienne et un large spectre d'inhibition vis-à-vis des bactéries, des levures et des moisissures.
- **Le dioxyde de carbone** : joue aussi un double rôle antimicrobien : par sa propre activité antibactérienne et par la création de conditions d'anaérobiose.
- **Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)** : provoque parfois une auto inhibition des bactéries qui le produisent mais aussi inhibe la croissance d'autres microorganismes qui se trouve dans le milieu.
- **Les bactériocines** : sont des substances de nature protéique produites par certaines bactéries lactiques, exercent une action antibactérienne contre des souches distinctes des souches productrices et contre certains pathogènes, jouant ainsi un rôle primordial dans la bioconservation des aliments (**Ammar et Irid, 2009**).

Chapitre II: Exploitation des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques (LAB) sont largement utilisées dans la production commerciale d'aliments fermentés ; qui, en plus de produire des saveurs, des odeurs, des changements de texture et de nutrition dans les aliments, sont également connus pour leur effet antagoniste contre les bactéries pathogènes. **(Souza et al., 2017)**.

II.1. Intérêt des bactéries lactiques dans l'industrie alimentaire :

Les aliments fermentés pourraient avoir un rôle central à jouer dans notre diète alimentaire car ils existent depuis des millénaires, localement et à l'échelle internationale. Ces aliments « vivants », façonnés par des micro-organismes, ont des caractéristiques microbiologiques, biochimiques et physico-chimiques très différentes de la matière première dont ils sont issus **(Lortal et al, 2020)**.

Les bactéries lactiques présentent des activités métaboliques très diversifiées et une capacité d'adaptation à différents environnements. Cette diversité leur donne un grand intérêt industriel d'où leur large spectre d'application dans de nombreux domaines alimentaires, pharmaceutiques, agricultures, vétérinaires ...etc. **(Streit et al, 2007)**.

L'utilisation des bactéries lactiques en industrie alimentaire est déterminée par leurs propriétés technologiques. Celles-ci recouvrent les propriétés suivantes : activité acidifiante, et enzymatiques (activité protéolytique, peptidasique et lipolytique), production de métabolites d'intérêt telle que la peroxyde d'hydrogène, les acides organiques et les bactériocines **(Belyagoub., 2014)**. De plus, ces bactéries contribuent à la texture (production des EPS), la saveur des aliments et à la production de composés aromatiques qui participent aux qualités organoleptiques des fromages par exemple **(Ennadir et al, 2014)**.

D'autres qualités ont depuis été associées aux bactéries lactiques lorsqu'elles sont associées aux produits alimentaires comme l'augmentation des valeurs nutritionnels des aliments, la réduction de la formation de produits toxiques et la propriété de probiotique. **(Ennadir et al, 2014)**.

Dans l'industrie alimentaire, ces microorganismes permettent la conversion d'une grande variété de matières premières, conduisant ainsi à de nombreux produits : les laits

fermentés, les fromages, les olives fermentés et certains vins. **(Axelsson, 2004 ; Streit et al, 2007).**

L'industrie laitière reste toujours, le plus grand utilisateur de bactéries lactiques sous forme de ferments lactiques commerciaux .Par exemple En fromagerie, les lactobacilles sont généralement utilisés pour la préparation de pâtes dures ou semi-dures typiques des fromages suisses et italiens **(Axelsson, 2004 ; Streit et al, 2007).**

Elles sont utilisées pour le pouvoir à fermenter le lactose et par conséquent leurs capacités d'acidification. Cette propriété permet d'améliorer les qualités organoleptiques des aliments qui dépendent aussi des autres propriétés microbiennes telles que le métabolisme du citrate, le catabolisme des acides aminés, la protéolyse, la lipolyse et la production des exo polysaccharides (EPS) **(Zhang & Cai, 2014).** Les BL homofermentaires sont couramment utilisés dans les cultures de démarrage et leur fonction est de favoriser une acidification rapide des produits alimentaires. Les BL hétérofermentaire, d'autre part, sont des agents cultures non starter, principalement destinés à une qualité sensorielle **(Gatti et al, 2014; Guarrasi et al, 2017).** Les BL sont utilisées comme des agents de protection et de stabilisation des produits alimentaires. L'effet conservateur exercé par BL est principalement dû à la production de composés bénéfiques, aromatiques et antimicrobiens, y compris des acides organiques tels que l'acide lactique qui entraînent une baisse des pH, du peroxyde d'hydrogène, du dioxyde de carbone, du diacétyle, de l'acétaldéhyde, des exo polysaccharides, des vitamines, reutéline et bactériocines **(Nuraida, 2015).** De même, les BL doivent être capables de résister aux contraintes technologiques pendant la préparation des formules probiotiques pour maintenir des comptes viables élevés. Après la consommation, les BL probiotiques doivent aussi survivre aux conditions difficiles dans le tractus gastro-intestinal **(Franz et al, 2011).**

Dans le domaine de la fermentation alimentaire, ces cultures de micro-organismes, correctement sélectionnées et ajoutées à la matière première afin d'accélérer et d'orienter le processus de fermentation. **(Sandine et Thunell 2018 ; Russo et al.2016 ; Mattia Pia Arena et al, 2018).**

De nombreux LAB sont couramment utilisés comme démarreurs microbiens dans plusieurs aliments fermentés à base de matrices telles que les légumes, la viande, les céréales et le lait **(Sandine et Thunell 2018 ; Russo et al, 2016 ; Mattia Pia Arena et al, 2018)**

(Par exemple, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* et *L. acidophilus* utilisés comme cultures de départ dans la production de yogourt) (**Chlebowska-Śmigiel et al., 2019 ; Pinto et al., 2020 ; Selvakumar Vijayalakshmi et al, 2020**), améliorant le goût, la saveur, la texture et les qualités diététiques, ce qui offre de plus grands avantages pour la santé. Dans ces produits, les microorganismes de démarrage, en plus de contribuer à transformer la matière première en un produit plus appétant, synthétisent plusieurs métabolites, tels que l'acide lactique, l'acide acétique, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyle, les bactériocines, qui agissent comme des conservateurs naturels. Ainsi, une plus grande capacité d'acidification et / ou la capacité de produire de plus grandes quantités de bactériocines font partie des critères selon lesquels les bactéries de démarrage sont sélectionnées. Les cultures de démarrage produisant des bactériocines peuvent non seulement contribuer à la sécurité sanitaire des aliments, en inhibant les microorganismes pathogènes d'origine alimentaire, mais également empêcher la croissance de bactéries autochtones indésirables qui produisent un mauvais goût. Certaines cultures LAB peuvent être particulièrement capables de produire des composés antimicrobiens mais peuvent être incapables de réaliser de manière satisfaisante la fermentation souhaitée de ce produit alimentaire particulier. Ces cultures pourraient être ajoutées pendant ou après le processus de fermentation uniquement pour augmenter la durée de conservation du produit alimentaire (**Bravo et al.2009 ; Silva et al.2018 ; O'Sullivan et al.2003 ; Mattia Pia Arena, 2018**).

En outre, les LAB sont également exploités pour augmenter la valeur nutritionnelle des aliments fermentés, par exemple dans le yogourt, en profitant de leur capacité à produire des substances essentielles telles que le folate et la riboflavine (**Da Silva et al.2016**).

Certaines espèces de LAB est plus particulièrement *Enterococcus faecium* joue un rôle fondamental dans la fabrication et l'affinage d'un fromage traditionnel européen originaire des pays méditerranéens en ajoutant un goût et une saveur uniques. Ceci est peut-être dû à son activité protéolytique et à son aptitude à l'hydrolyse de la graisse de lait (lipolyse). En plus de son rôle dans la fabrication du fromage, ce genre agit comme une conservation contre divers agents pathogènes d'origine alimentaire en produisant des peptides microbiens (**R. Rahmeh, 2020**).

Les bactéries lactiques (LAB) est plus précisément les lactobacilles, sécrètent des matières solubles pendant la croissance bactérienne ou après leur lyse avec une activité fonctionnelle diversifiée. Certaines de ces substances, notamment les bactériocines, les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, les acides gras, le dioxyde de carbone et le diacétylène, offrent une activité antimicrobienne **(Moradi et al, 2019a ; Aidin Shafipour Yordshahi et al, 2020)**. Ces produits sont largement connus sous le nom de postbiotiques ou surnageants acellulaires (CFS) **(Aguilar Toalá et al, 2018 ; Aidin Shafipour Yordshahi et al, 2020)**.

Ces caractéristiques des LAB ont suscité beaucoup d'intérêt pour leur utilisation en tant que bio conservateur. De nombreuses études ont montré que l'application directe de LAB, ou même simplement de leur surnageant acellulaire, inhibe les bactéries indésirables dans la poitrine de poulet, le bœuf, le pain et le fromage ce qui augmente la sécurité alimentaire et la durée de conservation. De plus, ils produisent des composés aromatiques, des exo polysaccharides et plusieurs enzymes **(Boulares et al, 2012 ; Jose et al, 2015 ; Hatice Yazgan et al, 2020)**.

De plus, l'ajout de cultures LAB, ou de leurs surnageants acellulaires, présentant une activité antifongique, a été proposé pour plusieurs applications de l'industrie alimentaire, y compris les productions laitières et céréalières, le processus de maltage et le stockage des fruits et légumes **(Axel et al.2015 ; Oliveira et al.2015 ; Cheong et al.2014 ; Crowley et al.2012 ; Russo et al.2017 ; Mattia Pia Arena et al, 2018)**.

Dans les grains de blé de brasserie, des traitements avec des souches de *Lactobacillus sakei*, *Pediococcus acidilactici* et *Pediococcus pentosaceus* ont été montrés pour favoriser la production de mycotoxines de Fusarium et le développement de *F. culmorum* et *F. poae*. Cette réduction était liée à des mécanismes probables de liaison des mycotoxines b et / ou à leur détoxification par LAB **(Juodeikiene et al.2018 ; Mattia Pia Arena et al, 2018)**.

La capacité antagoniste et bioprotectrice des LAB est attribuée à la compétition pour les nutriments (colonisation) et à l'antibiose en raison de leur capacité à synthétiser différents composés antimicrobiens, y compris les acides organiques, les bactériocines, le peroxyde d'hydrogène et les acides gras hydroxylés **(Jacobo López-Seijas et al, 2019)** par exemple la capacité de certaines souches à inhiber le développement de l'espèce *S. epidermidis*, responsable de l'augmentation des amines biogènes de certains vins **(Jacobo**

López-Seijas et al,2019) et la capacité de certaines espèces du genre Lactobacille pour préparer des démarreurs malolactiques(**Jacobo López-Seijas et al,2019**).

Il est généralement admis que les probiotiques contribuent à l'homéostasie intestinale par l'amélioration des fonctions digestives, l'exclusion ou inhibition des pathogènes et le renforcement de la fonction barrière de l'intestin (**Fuller, 1991**) (**MOKDAD Feyza Halima, 2020**).

Les bactériocines représentent un groupe de composés antimicrobiens produits par le LAB, c'est-à-dire les substances de masse moléculaire élevée, comprend des molécules protéiques (**Sidooski et al.2018 ; Mattia Pia et al, 2018**).

Le LAB producteur de bactériocines peut être ajouté à des produits non fermentés, dans le but de les protéger pendant leur durée de conservation. Dans ces cas, les cultures utilisées sont appelées bactéries protectrices productrices de bactériocine et elles sont ajoutées en tant qu'ingrédient alimentaire dans la fabrication des aliments (**Woraprayote et al.2016 ; Mattia Pia Arena et al, 2018**).

Il a été démontré que les bactériocines utilisées en combinaison avec d'autres méthodes de conservation, telles que les additifs chimiques (par exemple, EDTA, le lactate de sodium et le diacétate de potassium), le chauffage et les traitements à haute pression, améliorent l'action de bioconservation (**Egan et al.2016 ; Mattia Pia Arena et al, 2018**).

À ce jour, la nisine et la pédiocine sont les seules bactériocines commercialisées comme conservateurs alimentaires (**Simha et al, 2012 ; Favaro et al.2015 ; Mattia Pia Arena et al, 2018**). Ils ont une large application dans la bioconservation en raison de leur capacité à prolonger la durée de conservation des produits alimentaires (**Mokoena, 2017 ; Shin et al, 2016 ; Dibyajit Lahiri et al, 2020**).

Parmi les LAB, *Lactococcus lactis sub sp. Lactis*. particulièrement utilisé pour la conservation des aliments en raison de sa capacité à produire de la nisine, la bactériocine la mieux caractérisée, classée GRAS (généralement reconnue comme sûre) par la FDA (Food and Drug Administration). La nisine est appliquée dans le monde entier dans les produits laitiers (**Silva et al, 2018 ; Laura Settler-Ramírez, 2020**).

II.2. Intérêt des bactéries lactiques dans le domaine de la santé :

II.2.1. Application des probiotiques :

Les probiotiques sont définis comme des micro-organismes vivant qui lorsqu'ils sont ingérés en quantité appropriés ont un effet bénéfique sur la santé de l'hôte.ils contiennent uniquement les microorganismes non pathogènes. De nombreux microorganismes sont considérés comme probiotiques, parmi eux des bactéries lactiques telles que *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Lb. acidophilus*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. casei*, et *Streptococcus thermophilus* (*Sc. thermophilus*).*Lb. bulgaricus* et *Sc. Thermophilus* sont les premières souches bactériennes qui ont été utilisées pour la fabrication de yaourt. **(Makhloufi., 2012).**

Leur utilisation est due aux effets nutritionnels et thérapeutiques de ces bactéries car elles enrichissent le milieu où elles se trouvent en vitamines (B et K), acides aminés, composés organiques (acide lactique et acétique), enzymes (lactase) et bactériocines responsables de l'inhibition des bactéries pathogènes **(SOOMRO et al, 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 **(Yanyan et al, 2014)**. Ensuite les utiliser dans un procédé semi industriel pour obtenir d'autre 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 divers maladies chroniques **(Lairini et al, 2014)**.

Les bénéfices potentiels des probiotiques vont de la suppression de l'activité de certains pathogènes à l'amélioration de l'utilisation du lactose, de la réduction du cholestérol sanguin et du niveau de substances carcinogènes, l'inactivation de composés toxiques ainsi que la stimulation du système immunitaire; donc ces micro-organismes sont bénéfiques pour la santé de l'hôte **(NINANE et al, 2009)**.

De plus, ils sont également utilisés dans l'industrie chimique (production d'acide lactique), dans le domaine médical (notamment pour le traitement de dysfonctionnements intestinaux) et dans l'industrie des additifs alimentaires (production d'exo polysaccharides).

Elles sont aussi utilisées pour la production de bactériocines et des protéines thérapeutiques **(Rodriguez et al, 2003)**.

Chez l'homme, les probiotiques peuvent interagir avec le tissu lymphoïde associé à l'intestin (GALT) et moduler la réponse immunitaire aux blessures et aux organismes pathogènes **(Bonnardel et al.2015 ; Diener2016 ; Mattia Pia Arena et al, 2018)**.

Ainsi, des composants spécifiques de la cellule probiotique sont essentiels pour la modulation immunitaire et, plus tôt, pour la capacité d'adhésion à la muqueuse intestinale, indispensable pour créer un contact intime entre les bactéries et l'intestin **(Santarmaki et al, 2017 ; Mattia Pia Arena et al, 2018)**.

Les probiotiques réduisent le risque de certaines maladies infectieuses agissant directement contre l'agent étiologique de la maladie ou modulant indirectement la réponse immunitaire de l'hôte et modifiant la microflore intestinale afin de prévenir la colonisation des agents pathogènes **(Cavera et al.2015 ; Mattia Pia Arena et al, 2018)**.

Les multiples actions du probiotique dans le tractus oro-gastro-intestinal comprennent la production de métabolites qui modifient l'environnement acide et redox et inhibent la colonisation pathogène, l'amélioration de la fonction de barrière intestinale et la production de mucine, et la compétition pour les nutriments et les sites d'adhésion contre les pathogènes. De plus, la production de composés antimicrobiens qui interviennent directement pour réduire la croissance des ennemis et la stimulation de la réponse du système immunitaire sont deux mécanismes principaux capables de contraster l'apparition d'infections et de maladies **(Arqués et al.2015 ; Arena et al.2016, 2014 ; Yahfoufietal, 2018 ; Mattia Pia Arena et al, 2018)**.

Il existe de nombreuses preuves que les bactéries probiotiques produisant des vitamines pourraient avoir des effets anti-inflammatoires qui pourraient être considérés comme des traitements d'appoint pour réduire certains des effets secondaires indésirables causés par les traitements primaires **(Moreno de Le Blanc et al, 2018 ; Mattia Pia et al, 2018)**.

Les probiotiques pourraient également être une alternative appropriée ou un co-traitement des infections urogénitales dans le but de réduire l'utilisation d'antibiotiques et d'éviter le développement croissant de résistances. Dans lequel la colonisation probiotique

détermine une réduction du pH puis une inhibition de la vaginose bactérienne, des infections des voies urinaires, de la candidose vulvo-vaginale et du papillomavirus humain (HPV) **(Hanson et al.2016 ; Mattia Pia Arena et al, 2018)**.

L'utilisation du probiotique *L. rhamnosus* s'est avérée efficace dans la prévention des infections des muqueuses par le pathogène fongique *Candida albicans*, probablement en raison d'une réduction de son adhérence, de son invasion et de son extension hypale dans les sites vaginaux et oraux **(Mailänder Sánchez et al, 2017 ; Mattia Pia Arena et al, 2018)**.

Olaya Galán et al. **(2016)** ont suggéré que quatre métabolites produits par des bactéries probiotiques étaient capables de réduire la quantité de protéine intracellulaire NSP4, qui est produite par le rotavirus pendant l'infection.

La consommation de probiotiques a également été associée à une amélioration de l'incidence des infections respiratoires virales telles que celles causées par le rhinovirus **(Turner et al.2017 ; Mattia Pia Arena et al, 2018)**.

Des cellules des souches de *L. plantarum*, ainsi que leurs dérivés, se sont révélées antagonistes de l'entérovirus, qui peut infecter différents tissus humains et provoquer une fonction anormale ou la destruction de divers organes et cellules **(Mattia Pia Arena et al, 2018)**. L'effet antiviral de *L. reuteri* contre les entérovirus et Entérovirus est obtenu grâce à une interaction physique directe entre les particules bactériennes et virales, qui entrave l'entrée du virus dans les cellules hôtes **(Ang et al.2016 ; Mattia Pia Arena et al, 2018)**.

En tant que probiotiques, ils peuvent être utilisés comme composants de compléments nutritionnels pour les personnes âgées et pour la prévention de l'**hypercholestérolémie (Oh, Daliri et Oh, 2018 ; Selvakumar Vijayalakshmi et al, 2020)**. En outre, ils peuvent aider à maintenir la flore normale du tractus gastro-intestinal humain en réduisant la présence d'agents pathogènes et en stimulant la croissance de micro-organismes bénéfiques, ainsi qu'en améliorant le système immunitaire humain et l'état de la peau, et en prévenant le développement de la grippe et froid **(Chlebowska-Smigielet et al, 2017 ; Chlebowska-Śmigiel et al, 2019 ; Selvakumar Vijayalakshmi et al, 2020)**.

Les probiotiques jouent un rôle dans la prévention du cancer du côlon par : la stimulation du système immunitaire, la production de composés antimutagéniques, la

modulation des enzymes fécales carcinogéniques, la dégradation des carcinogènes, et l'élimination des bactéries impliquées dans la production de carcinogènes.

Diverses souches de LAB ont été identifiées pour produire de nombreux agents antimicrobiens contre certains microorganismes pathogènes. Cet effet antimicrobien a souvent été attribué à deux modèles **(Xing Wang et al, 2020)**. Premièrement, le LAB peut produire de l'acide organique par fermentation, ce qui diminue le pH environnemental et empêche la survie de certaines bactéries pathogènes qui ne tolèrent pas les conditions acides **(Xing Wang et al, 2020)**. L'acide organique produit par LAB peut inhiber les bactéries Gram-négatives en pénétrant la membrane cellulaire, affectant ainsi sa fonction, acidifiant le cytoplasme et inhibition des enzymes sensibles aux acides. Deuxièmement, les LAB produisent de la bactériocine, une substance polypeptidique qui inhibe la croissance de certains agents pathogènes d'origine alimentaire et de bactéries nocives, telles qu'*Escherichia coli*, *Staphylococcus* et *Salmonella* **(Xing Wang et al, 2020)**.

En outre, grâce à leur activité d'hydrolase des sels biliaires (BSH), il a été rapporté que le LAB abaisse le taux de cholestérol sérique chez l'homme **(Boricha et al, 2019 ; Selvakumar Vijayalakshmi et al, 2020)**.

Le LAB peut avoir une activité antagoniste contre les champignons filamenteux et, bien que les mécanismes réels par lesquels ils opposent le développement fongique ne soient toujours pas clairs, il semble associé à l'acidification cytoplasmique et à l'échec des forces motrices des protons **(Reis et al.2012 ; Russo et al.2017 ; Mattia Pia Arena et al, 2018)**.

II.2.2. Application des bactériocines :

L'émergence et la dissémination rapides d'espèces bactériennes résistantes continuent de se produire à l'échelle mondiale, menaçant la longévité des antibiotiques dans le secteur médical et agroalimentaire. Les bactéries lactiques inhibent le développement de certains microorganismes grâce à la synthèse de molécules antibactériennes parmi lesquelles se trouvent les bactériocines. Les bactériocines, toxines peptidiques produites par les bactéries, offrent un potentiel prometteur comme substituts ou conjugués aux composés biopréservateurs et thérapeutiques actuels. Ces peptides non toxiques présentent une puissance significative contre certaines bactéries (y compris les espèces multirésistantes),

tandis que les souches productrices restent insensibles aux peptides bactéricides (**Meade et al, 2020**). Ces bactériocines sont des divers groupes de peptides antimicrobiens et sont une caractéristique importante dans la sélection de souches probiotiques (**Malik et al, 2012**).

Ces dernières décennies, les bactériocines compte tenu de leur innocuité, ont connu plusieurs applications dans l'agroalimentaire et en médecine.

La bio conservation consiste en une augmentation de la durée de vie et une amélioration de la sécurité sanitaire des produits alimentaires en utilisant des microorganismes et/ou leurs métabolites (**Ross et al, 2002**). C'est grâce aux propriétés antimicrobiennes des métabolites qu'elles synthétisent (éthanol, peroxyde d'hydrogène, diacétyl, composés antifongiques, acides phényl-lactiques, antibiotiques et bactériocines), que les bactéries lactiques sont reconnues comme de bons agents de conservation des produits alimentaires (**Robertson et al, 2003**). De plus, les bactériocines ne sont pas toxiques pour les cellules eucaryotes et perdent leur activité en présence des protéases présentes dans le tractus intestinal, d'où l'intérêt accru porté à leurs applications dans la conservation des aliments (**Charlesworth et Burns, 2015**)

Dans le domaine médical ; l'émergence de la résistance aux antibiotiques conventionnels ces dernières années a orienté la recherche vers l'étude de nouveaux agents antimicrobiens tels que les bactériocines. On peut distinguer les applications potentielles suivantes : Traitements d'infections cutanées : On utilise la mersacidine, la lacticine3147, l'épidermine et la gallidermine (**Sass et al, 2008; Sutyak et al, 2008**) Traitements de la gingivite : La nisine et la BLIS K12TM (**Tagg, 2004**). Traitements de la mastite : Administrée par voie intra-mammaire chez les vaches, la nisine A inhibe la prolifération des souches de *Staphylococcus et Streptococcus* à l'origine de cette infection (**Bradley, 2002; Cotter et al, 2005**). Traitements de l'otite : On utilise dans son traitement la nisine ; La bactériocine ST4SA (**Knoetze et al, 2008**). Traitements d'infections systémiques : la piscicoline 126, l'abp-118, la divercine V41 et la nisine sont les bactériocines recommandées (**Dicks et al, 2011**).

Etude expérimentale

Ce travail a été réalisé dans la station expérimentale au laboratoire de microbiologie de la Faculté de Science de la Nature et de la Vie, université Saad Dahleb, Blida 1, sous la direction et l'orientation du Mme Benhoua durant la période allant du mois d'avril au mois de juin 2021. L'objectif de notre travail consiste à mettre en évidence quelques aptitudes technologiques, notamment le pouvoir protéolytique, lipolytique, la production d'acétoïne et d'exopolysaccharides, et l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques.

I. Provenance des bactéries utilisées:

I.1. Bactéries lactiques :

Les neufs (09) souches des bactéries lactiques sélectionnées pour l'étude de leurs pouvoir technologique proviennent du travail de la thèse de Mme Benhoua. Ces souches ont été isolées de différents produits laitiers, purifiées et identifier par voie moléculaire PCR, elles sont notées par des codes selon le tableau ci- dessous (**Tableau I**).

Tableau I: Provenance et identification des souches utilisées dans ce travail

Code de souche	Origine de la souche	Séquençage de l'ADNr 16S
LB1	Lait de chamelle (Naama)	<i>Lactobacillus plantarum</i>
LB2	Lait de vache (Oran)	<i>Lactobacillus plantarum</i>
LC1	Lait de chamelle (Bechar)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
LC 2	Lait de chamelle (Naama)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
LC3	Beurre traditionnel (Oran)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
LC4	Lait de vache (Oran)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
W1	Lait de vache (Oran)	<i>Weissella confusa</i>
W2	Beurre traditionnel	<i>Weissella confusa</i>
W3	Formage traditionnel (klila)	<i>Weissella confusa</i>

I.2. Les souches pathogènes :

Les souches bactériennes pathogènes utilisées dans nos expérimentations proviennent du laboratoire d'hygiène de Tipaza. *Pseudomonas aeruginosa* CNR ISPA PS20, *E .coli* ATCC9525, *Staphylococcus aureus* ATCC 19095, *Listeria monocytogenes* ATCC 9525, *Klebsiella pneumoniae*.

II. Revivification des souches :

Les souches de bactéries lactiques ont été revivifiées par repiquage dans de bouillon MRS et incubation à 30 °C pendant 48 h. Par la suite, ensemencée par des stries dans des boites Pétri contenant la gélose MRS (pH 6,8). Les cultures sont incubées à une période de 48 heures à 30°C.

III. Vérification de la pureté des souches :

La pureté des souches a été confirmée par l'observation de l'aspect des colonies sur gélose MRS, la coloration de Gram ainsi que par la réaction de catalase.

Pour les souches pathogènes, la revivification a été faite dans de bouillon nutritif puis une incubation à 37°C pendant 24heures. Après incubation, les cultures sont ensemencées dans des boites Pétri contenant de la gélose nutritive et l'incubation se fait pendant 24 h à une température de 37 ° C.

La pureté des souches pathogènes a été vérifiée par l'aspect des colonies sur gélose, coloration de Gram et la réaction de catalase.

III.1. Étude macroscopique :

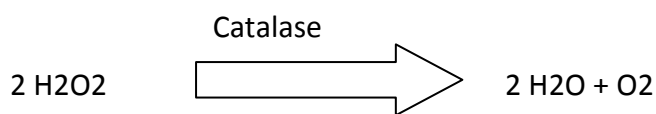
Une observation macroscopique permet de décrire l'aspect des colonies obtenues sur milieu solide (taille, pigmentation, contour, aspect, viscosité). L'observation macroscopique est faite après 24heures d'incubation à 30°C sur gélose MRS pour les bactéries lactiques et gélose nutritif à 37 °C pour les bactéries pathogènes.

III.2. Étude microscopique:

L'observation microscopique au grossissement (G x1250) permet de classer les bactéries selon leur Gram, leur morphologie cellulaire, leur mode d'association (**Joffin et Leyral, 1996**).

III.3. 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 mettre en contact une colonie de la bactérie à tester en présence d'une goutte d'eau oxygénée. Un dégagement gazeux abondant (dû à un dégagement de dioxygène) sous forme de mousse traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de l'enzyme à tester (**Belyagoubi, 2014; Kassas, 2017**).

IV. Etude des caractéristiques technologiques des bactéries lactiques :

IV.1. Mise en évidence de l'activité protéolytique :

L'activité protéolytique des bactéries lactiques est mise en évidence sur milieu PCA additionné à 1%, 3% et 5% (v/v) de lait écrémé (**Moslehisad et al, 2013**). Les bactéries à tester, issues des cultures jeunes, ont été ensemencées par touche à la surface à l'aide d'une anse de platine. Après séchage, les boîtes sont incubées à 30 °C pendant 48 h, l'activité protéolytique de ces bactéries se manifeste par l'apparition d'un halo clair autour des colonies (**Sonar et Halami, 2014**).

IV.2. Mise en évidence de l'activité lipolytique :

L'activité lipolytique a été recherchée sur milieu MRS tamponné à pH 7,0 et additionné de 1%, 3% ou 5% de tween 20 (source lipidique artificielle) ou d'huile d'olive

(source lipidique naturelle) **(Guiraud et Galzy, 1980)**. Le milieu est opacifié par le carbonate de calcium CaCO_3 à raison de 0,5% afin de bien visualiser l'éventuelle présence de cette activité. Les bactéries à tester, issues d'une culture jeune, ont été ensemencées par touches à la surface de ces milieux de cultures à l'aide d'une anse de platine. Après incubation à 30 °C pendant 48 h, l'activité lipolytique de ces bactéries se manifeste par une clarification des touches **(Jini et al, 2011)**.

IV.3. Mise en évidence du pouvoir aromatisant :

Ce test permet de mettre en évidence la présence de l'acétyl-méthyl-carbonil ou acétoïne, un caractère d'intérêt taxonomique mais également industriel puisque le diacetyl (précurseur de l'acétoïne) est considéré comme une substance aromatique importante dans la saveur des produits laitiers, beurre et fromage **(Mokdad, 2020)**.

La capacité des souches à produire des composés aromatiques au cours de processus de fermentation est mise en évidence sur milieu Clark et Lubs. Chaque tube contenant 2ml du milieu Clark et Lubs et/ou dans des tubes contenant 10 ml du lait écrémé est inoculé par une culture jeune de 18h de la souche lactique à tester. Après incubation pendant 24h à 37°C, les réactifs de Vogues-Proskauer VPI (Na OH à 16% d'alcool) et VP II (alph-naphtol à 6% d'alcool) sont ajoutés sur les cultures (V/V) et le mélange est maintenu pendant 10min avant de lire la réaction **(Avril et al, 1992, Hedef, 2012)**. La présence d'arôme est révélée par l'apparition d'un anneau rouge **(Hedef, 2012)**.

IV.4. Mise en évidence de l'activité acidifiante et coagulante :

Des tubes contenant 10 ml de lait écrémé reconstitué ont été inoculés avec des souches lactiques (100 v/v) et incubés à 30°C. Le pH a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre après 24 h **(Garriga et al, 1996)**. La capacité des souches à coaguler le lait écrémé reconstitué a été évaluée par l'apparition d'un coagulum visuel sur la face intérieure du tube de verre, après l'avoir fait tourner manuellement.

IV.5. Mise en évidence du pouvoir texturant (production des exopolysaccharides):

La capacité des souches à produire des EPS est mise en évidence sur un milieu solide MSE. Les souches productrices sont caractérisées par la formation de colonies larges,

visqueuses et gluantes. Ce test est aussi considéré comme clé d'indentification permettant la différenciation entre les souches productrices et non productrice des EPS.

Les souches à tester sont ensemencées en stries sur gélose MSE déjà coulée et solidifiée. Après incubation à 30°C pendant 24 à 48h, la production des exopolysaccharides se manifeste par l'apparition de colonies larges et gluantes **(Leveau et al, 1991)**.

IV.6. Mise en évidence de l'Activité antibactérienne :

La capacité des bactéries lactiques à inhiber la croissance des bactéries indésirables en produisant des substances antimicrobiennes a été déterminée par la méthode directe de détection. Les bactéries tests de référence utilisées pour les interactions microbiennes étaient : *Staphylococcus aureus* (ATCC 19095) et *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Klebsiella pneumoniae*(ATCC), *Pseudomonas aeruginosa* (CNR ISPA PS20), et *Listeria monocetogenes* (ATCC 9525).

Méthode directe

L'activité antimicrobienne des souches a été évaluée sur milieu solide selon la méthode de Barefoot et Klaenhammer **(1983)**. Le milieu MRS standard et le milieu MRS tamponné à un pH 7 ont été ensemencés en touche par les souches lactiques. Après 24 h d'incubation à 30 °C, une couche d'MH semi solide, ensemencée séparément par des souches pathogènes a été coulée à la surface. Les boites ont été ensuite ré-incubées pour 24 h à 48 h supplémentaires. Les souches présentant une zone claire tout autour de la touche ont été considérées comme productrices de substances antimicrobiennes.

IV.7. La résistance aux antibiotiques :

Pour réaliser ce test, un antibiogramme en milieu semi solide est réalisé, chaque souche, d'une culture jeune de 18h d'incubation à 30°C, est ensemencée en surface de la gélose MRS semi solide, déjà coulée et solidifiée. Chaque souche est testée vis-à-vis de quatre (4) disques d'antibiotiques respectivement : Acide fusidique, Amoxyciline, Erythromicine et Gentamicine, ces derniers sont déposés à la surface des boites ensemencées par les souches lactiques. Après incubation à 30°C pendant 24h, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés **(Leroy et al, 2007)**.

IV.8. Conservation des souches :

IV.8.1. Conservation à court terme :

La conservation à court terme des isolats purifiés est effectuée par ensemencement des souches pures sur gélose MRS inclinée à l'aide d'une anse en platine stérile. Après incubation à 30°C pendant 18h, Les tubes sont maintenus à 4°C et le renouvellement des souches se fait par repiquage toutes les trois à quatre semaines (**Saidi et al, 2002**).

IV.8.2. Conservation à long terme :

A partir des jeunes cultures de 18h sur milieu liquide, les cellules sont récupérées par centrifugation à 4000 tr / min pendant 10 min. Une fois le surnageant éliminé, on ajoute le milieu de culture de conservation (lait écrémé 70% et 30% de glycérol) sur le culot. Les cultures sont conservées en « Eppendorfs » à - 20 °C. La figure 01 montre le protocole de conservation à longue durée (**Badis et al, 2004**). Les cultures peuvent être conservées plusieurs mois.

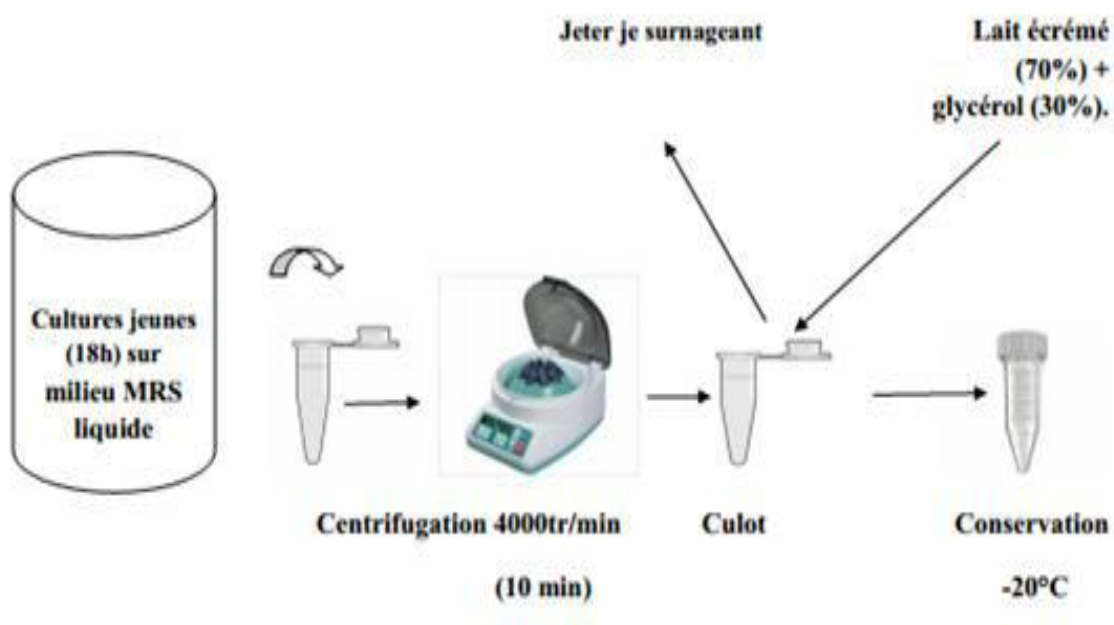


Figure 2: Schéma de conservation à longue durée des bactéries lactiques purifiées.

Résultats

Les bactéries lactiques présentent des activités métaboliques assez diversifiées et une capacité d'adaptation à différents environnements. Cette diversité est responsable de leur large gamme d'applications à l'échelle industrielle ou ils sont surtout utilisés comme culture starter ils provoquent une acidification rapide de la matière première par la production d'acides organiques, principalement d'acide lactique. En plus de leur production d'acide acétique, d'éthanol, de composés aromatiques, de bactériocines, d'exopolysaccharides. Ils améliorent ainsi la durée de conservation et la sécurité microbienne, améliorent la texture et contribuent au profil sensoriel agréable du produit final.

I. Vérification de la pureté des souches :

I.1. Caractérisation macroscopique et microscopique :

L'aspect macroscopique des souches sélectionnées a révélé des petites colonies arrondis, bombées et lisses de couleur blanchâtre, ayant un contour régulier. (La fig. 2 représente l'aspect macroscopique des souches LB2 et sur milieu MRS).

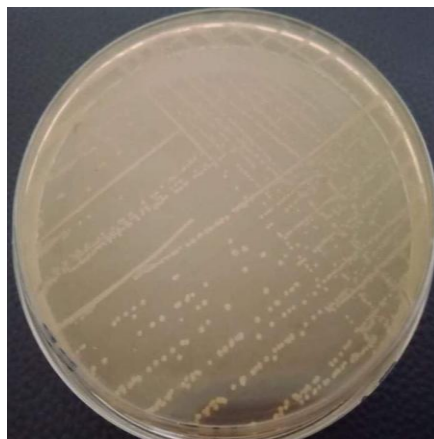


Figure 3: Observation macroscopique des colonies de la souche LB2 cultivée sur milieu solide MRS.

II. Etude morphologique :

Les bactéries lactiques isolées sur le milieu MRS ont subi des observations macroscopiques et microscopiques avec quelques tests biochimiques.

II.1. Les bactéries lactiques sur milieu liquide :

La croissance des bactéries apparaît sous forme de trouble homogène dans le milieu MRS liquide (**Figure 03**)



Figure 4: La croissance des souches lactiques sur milieu MRS liquide.

II.1.1. Examen microscopiques (coloration de Gram) :

L'observation microscopique a révélé une forme de cellules en Cocci ou bacilles. Les coques sont disposées en paires ou en petites chaînettes alors que les bacilles étaient des bacilles pas trop longs. La figure 4 représente l'observation microscopique de quelques souches retenues.

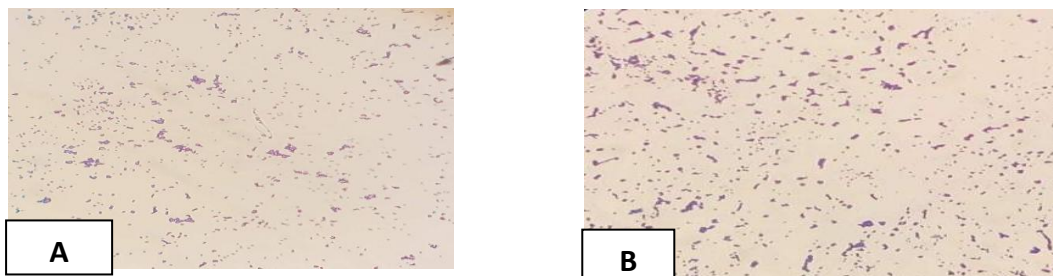


Figure 5: Observation au microscope optique de la forme des cellules et leur mode d'association de la souche *Leuconostoc mesenteroides* (A) et la souche *Weissella confusa* (B) (G x100).

II.1.2. Réaction de catalase :

Dans le test de catalase on a révélé l'absence de dégagement de gaz (O_2) ce qui nous confirme que ces isolats lactiques étaient catalase négatif. Les résultats pour ce test sont montrés dans **la figure 06**.

L'analyse de ces résultats démontre que toutes les souches appartiennent au groupe des bactéries à Gram positif et catalase négative, caractéristique des bactéries lactiques.

L'absence des bulles d'air après le dépôt d'une goutte de l'eau oxygénée sur les colonies cibles montre que toutes les souches sont catalase négative (figure 05), la souche *E. coli* a été utilisée comme témoin positif pour vérifier le H₂O₂ utilisé

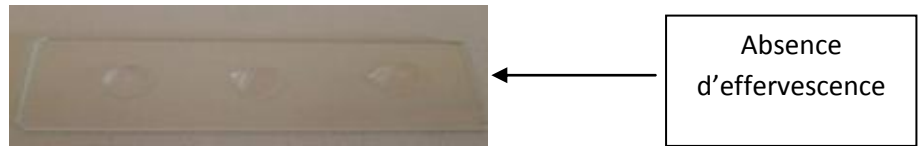


Figure 6: Résultat négatif du test de la catalase

La coloration de Gram a confirmé que les souches sont Gram positif et le test de catalase était négatif. Ces caractéristiques confirment l'appartenance des souches aux bactéries lactiques. Les résultats de la caractérisation microscopique sont réunis dans le tableau suivant.

Tableau II: Résultats de l'observation microscopiques et de test catalase des souches lactiques.

Souches	Température de croissance	Gram	Forme	Catalase
LB1	30°C	+	Coccobacille	-
W2	30°C	+	Coccobacille	-
LB2	30°C	+	Cocci	-
W1	30°C	+	Cocci	-
LC1	30°C	+	Cocci	-
LC3	30°C	+	Cocci	-
LC2	30°C	+	Cocci	-
W3	30°C	+	Cocci	-
LC4	30°C	+	Cocci	-

(+) : positif, (-) : négatif

III. Evaluation des aptitudes technologiques chez les souches lactiques :

III.1. Pouvoir protéolytique :

Il s'agit d'une caractéristique technologique importante recherchée chez les bactéries lactiques puisqu'elle leur confère la capacité de croître efficacement dans le lait d'un point de vue nutritionnelle en contribuant dans l'apparition des qualités organoleptiques des produits **(Saidi Yasmine, 2020)**.

L'activité protéolytique des souches a été recherchée sur gélose au lait. Après incubation, cette propriété s'est manifestée par l'apparition d'un halo clair autour des souches ensemencées en touches à la surface de la gélose. D'après les résultats **(Tableau III)**, toutes les souches testées **(Fig. 06)** ont exprimé une activité protéolytique qui a évolué avec l'augmentation de pourcentage des protéines du lait (1%, 3% et 5%).

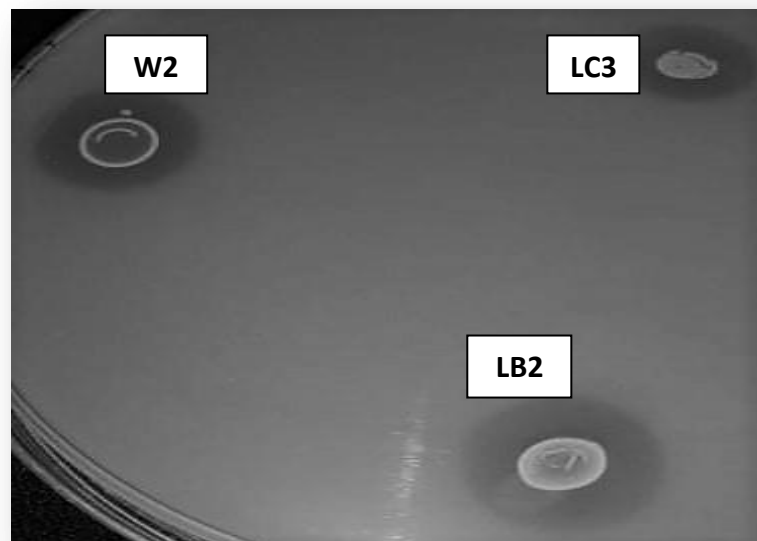


Figure 7: Activité protéolytique des souches lactiques sur milieu PCA + 3% de lait écrémé.

Tableau III: Diamètres de protéolyse des souches lactiques testées (en mm)

Souches	Diamètres des halos (mm)		
	1%	3%	5%
LB1	19	19	22
W2	15	18	19
LB2	18	18,5	22
W1	14	19,5	26
LC1	19	19	21
LC3	16,5	19	27
LC2	16,5	19,5	23
W3	19	19	22
LC4	18	18	22

III. 2. Activité lipolytique :

La lipolyse génère des acides gras libres et il est nécessaire d'avoir une forte concentration de ces composés pour produire un effet perceptible sur la saveur du produit **(Holl et al, 2005 ; Zarour Kenza, 2018)**. Le métabolisme des acides gras libres génère de nombreux composés responsables de l'arôme et de la texture tels que les esters, les lactones, les méthyl cétones, les alcools et les acides **(Toldrá et al, 2001 ; Zarour Kenza, 2018)**.

La mise en évidence de l'activité lipolytique chez les souches lactiques a été réalisée sur milieu MRS additionné de 1%, 3% et 5% de tween 20 et de l'huile d'olive, séparément. Après incubation, ce caractère technologique s'est manifesté par l'apparition d'un halo plus ou moins opaque autour des souchesensemencées en touches à la surface de la gélose.

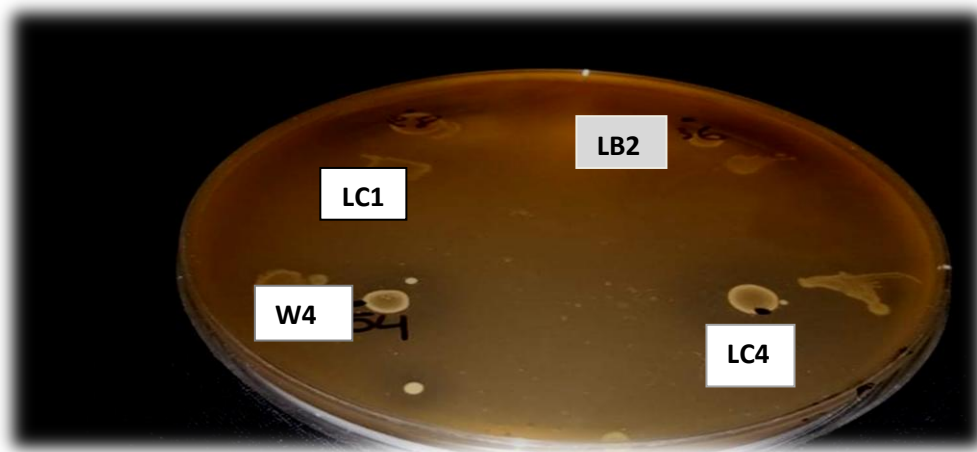


Figure 8: Mise en évidence de l'activité lipolytique des souches sur milieu MRS + 3% d'huile d'olive

Tableau IV: Mise en évidence de l'activité lipolytique des souches lactiques

Souches	Tween20 (diamètre par mm)			Huile d'olive (diamètre par mm)		
	1%	3%	5%	1%	3%	5%
LB1	9	16	17	19	20	-
W2	13	13	14.5	20	20	-
LB2	13.5	14	31	18	21	-
W1	14	15	23.5	19	21	-
LC1	11	12	18	20	23	-
LC3	13	15	16	21	21	-
LC2	9	13	20	16	18	-
W3	12	12	17	20	21	-
LC4	13	13	15.5	17	20	-

III.3. Pouvoir aromatisant :

La production de composés d'arômes est une fonctionnalité technologique importante lors de l'élaboration des produits laitiers fermentés. Le développement d'arôme dans le lait résulte aussi des activités métaboliques des bactéries lactiques (glycolyse, lipolyse et protéolyse) (Marilley Et Casey, 2004).

Les résultats obtenus sont représentés dans la **figure 08**. D'après les résultats nous remarquons que la souche W1 est capable produire l'acétoïne d'où un anneau rouge clair a apparu dans le milieu Clark et Lubs ; cela indique sa capacité à produire des substances aromatisantes.

Les souches restantes sont incapables de produire l'acétoïne d'où l'absence d'anneau rouge dans le milieu.



Figure 9 : Production de l'acétoïne par les bactéries lactique

III.4. Activité acidifiante et coagulante :

La coagulation correspond à une déstabilisation des micelles de caséines qui flocculent puis se soudent pour former un gel emprisonnant des éléments solubles du lait. La coagulation peut se réaliser par l'acidification, par l'action d'un enzyme ou encore par l'action combinée des deux (VIGNOLA, 2002).

Après 24h d'incubation à 30°C des coagulums visuels ont été observés sur la face intérieure des tubes de verre de toutes les souches lactiques testées, avec un bon pouvoir coagulant marqué chez les trois souches LB1, LB2 et LC1 (**Fig. 10**).

Le pH a été mesuré comme il est mentionné dans la figure 10, nous avons noté que la souche LC1 a une bonne activité acidifiante avec un PH de 4,2.

Les valeurs de PH des souches restantes sont indiquées dans la figure ci-dessous.
(Figure 11).



Figure 10 : Coagulums visuels apparus sur la face intérieure des tubes de verre de quelques souches lactique après 24h d’incubation.

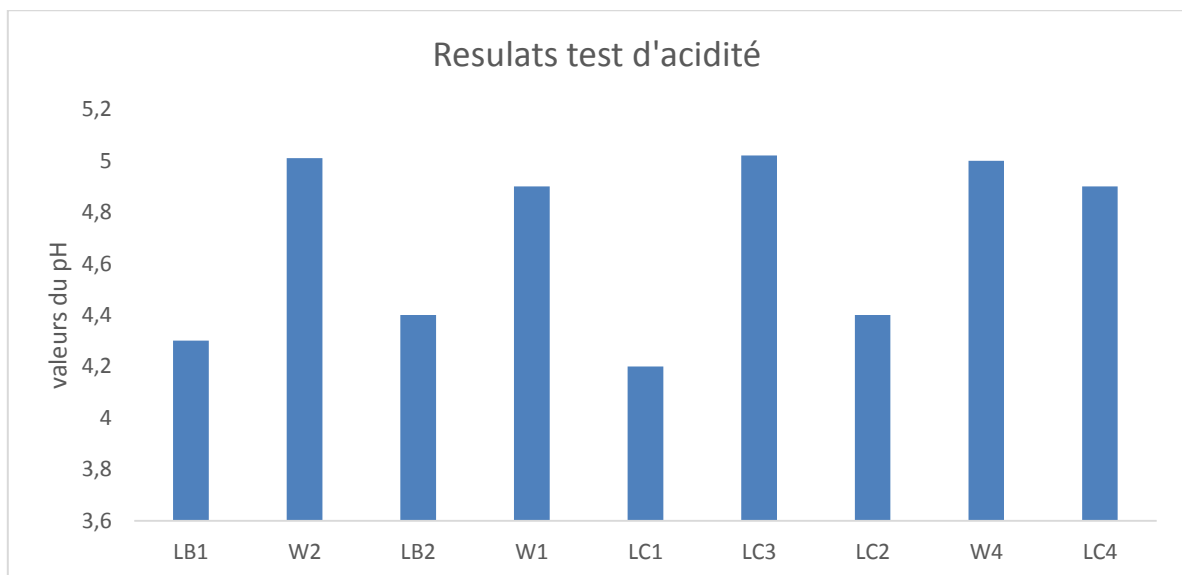


Figure 11 : Valeurs de PH du lait écrémé inoculés avec des souches lactiques après 24h d’incubation à 30°C.

III.5. Production des EPS :

Les neuf souches étaient capables de produire les EPS à partir du saccharose. Tandis que, donnant des colonies visqueuses sur milieu MSE (**Fig.12**).



Figure 12 : Aspect des colonies de la souche W4 sur milieu MSE.

III.6. Activité antimicrobienne :

Dans le but d'évaluer la capacité de nos souches à produire des substances antimicrobiennes, elles ont été testées pour leurs activités inhibitrices vis-à-vis les souches indicatrices : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Listeria monocytogenes*, par la méthode directe. L'ampleur relative des inhibitions observées dans la méthode directe a été appréciée par la mesure des diamètres des halos d'inhibitions, obtenus autour des touches et des puits.

Les résultats des interactions bactériennes par méthode directe entre les souches inhibitrices (bactéries lactiques) et les souches indicatrices (bactéries pathogènes) témoignent que toutes les souches lactiques possèdent la capacité d'inhiber la croissance des bactéries pathogènes avec des diamètres qui varie en fonction de la bactérie indicatrice et en fonction de la bactérie lactique.

La mesure du spectre d'inhibition démontre que les souches sélectionnées ont presque la même performance en matière d'inhibition de la croissance des bactéries indicatrices (spectre d'inhibition de 10 - 27 mm), où elles ont révélé leurs capacités à inhiber la croissance des cinq souches indicatrices, avec un léger avantage pour la souche LC2 qui a témoigné des spectres d'inhibitions les plus élevés que ceux des autres d'environ 2 mm, où on a noté un spectre d'inhibition de 26 mm contre la souche *E. coli* et *Staphylococcus aureus* suivi par celui contre *Listeria* (25 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (20 mm) et 16 mm contre *Listeria*. le spectre d'inhibition le plus faible a été constaté contre la souche *Pseudomonas aeruginosa* par LC4 qui témoigne également d'une bonne activité antimicrobienne. Les figures 12 et 13 représentent les diamètres des spectres d'inhibitions des souches envers les cinq souches pathogènes. Les diamètres des zones d'inhibition apparaissant autour de ces spots ont été mesurés ainsi leur moyennes et écart-types ont été calculés.

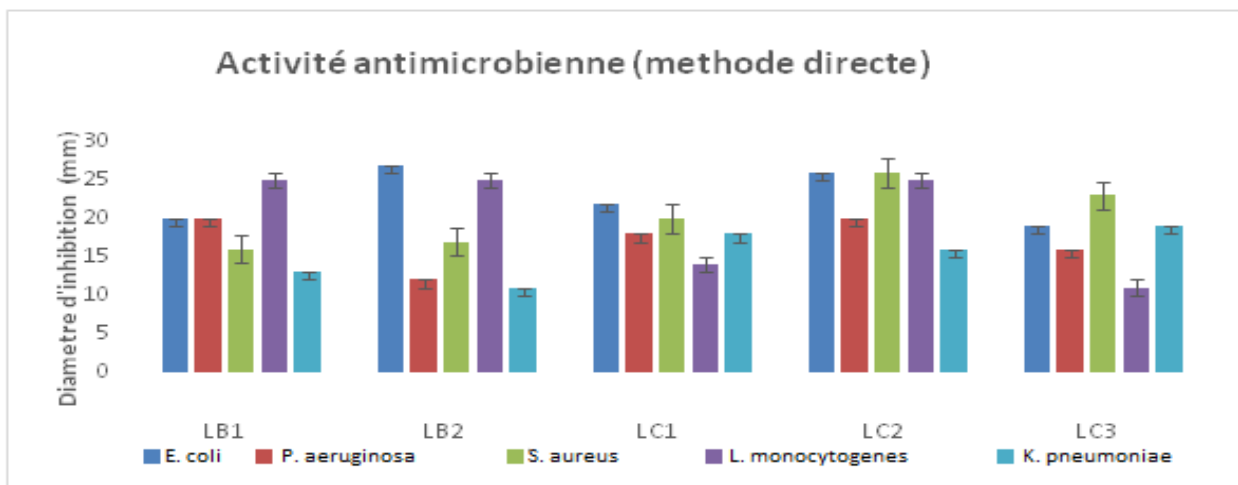


Figure 13 : Interaction entre les souches lactiques et les souches pathogènes (1/2).

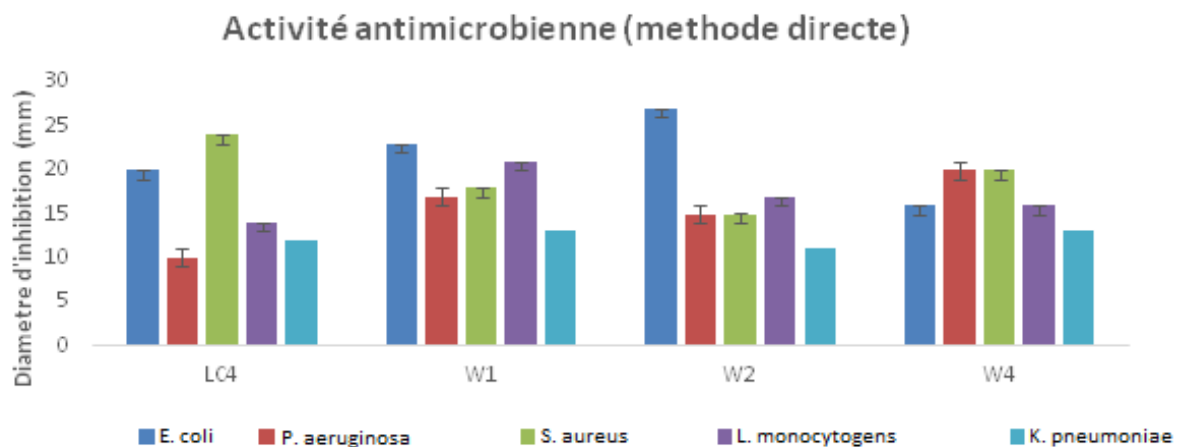


Figure 14 : Interaction entre les souches lactiques et les souches pathogènes (2/2).

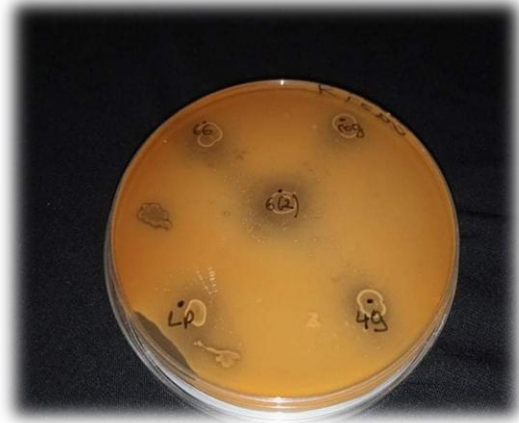
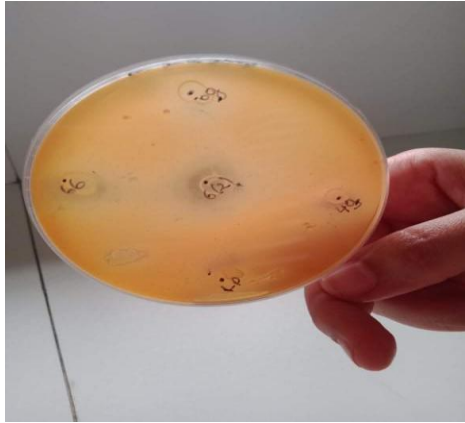


Figure 15 : Quelques résultats de l'activité antimicrobienne des souches lactiques isolées vis-à-vis des souches pathogènes testés.

III.7. Résistance aux antibiotiques :

La résistance et la sensibilité des souches aux antibiotiques représentent une préoccupation majeure pour les chercheurs car ces propriétés peuvent limiter les applications des cultures probiotiques. Les résultats de la résistance et la sensibilité des souches aux antibiotiques sont groupés dans la figure 15.

L'activité a été évaluée comme étant sensible, S (≥ 21 mm) ; intermédiaire, I (16-20 mm) et résistant, R (≤ 15 mm), comme décrit précédemment par (Liasi et al., 2009)

Nos résultats indiquent que toutes les souches étaient sensibles à tous les antibiotiques testés, à l'exception de la souche LC3 qui été résistante à la gentamycine avec un diamètre de (15mm). Cependant, les souches (LB1, LB2, LC1, LC2 et LC4) ont montré une résistance modérée à la gentamycine

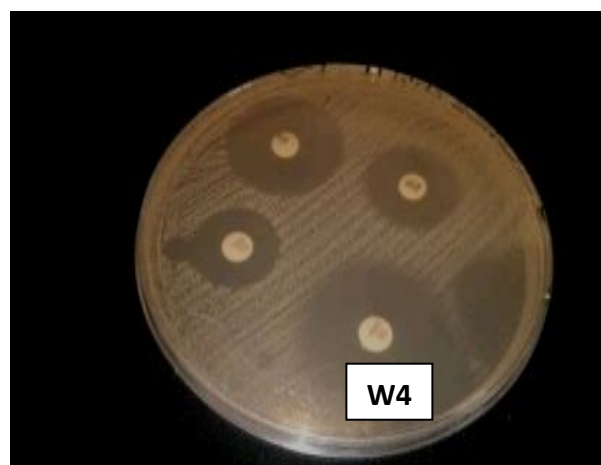
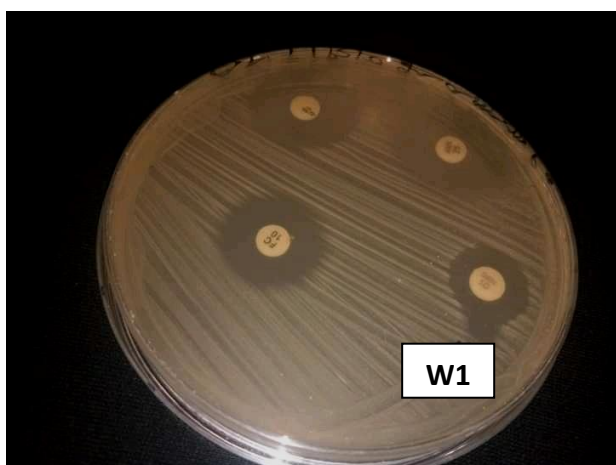


Figure 16: Antibiogramme des souches lactiques.

Tableau V: Résultats du test de sensibilité aux antibiotiques des souches lactiques (S): sensible.

Antibiotiques	Symbole	50g		49		L.P		66		28		36		6(2)		54		46	
Acide fusidique	A.F	22	S	20	S	22	S	18	S	20	S	22	S	22	S	20	S	21	S
Amoxiciline	AMX	30	S	22	S	29	S	23	S	30	S	30	S	30	S	30	S	30	S
Erythromycine	Erytr	28	S	25	S	28	S	20	S	26	S	28	S	28	S	28	S	28	S
Gentamicine	Gent	17	I	16	S	16	I	15	R	16	I	15	R	17	I	18	I	16	I

Discussion

Les BL sont utilisées à grande échelle dans l'industrie agroalimentaire. Elles permettent de contrôler le processus de production, en raison de leurs propriétés technologiques afin d'obtenir des produits présentant les caractéristiques organoleptiques souhaitées. Certaines BL ont la capacité de produire des composés ayant des propriétés antimicrobiennes y compris les bactériocines ce qui leur qualifie à être utilisé en industrie agroalimentaire en tant que culture bioprotectrices. De plus, l'industrie des aliments fonctionnels s'est concentrée sur l'isolement de nouvelles BL probiotiques ayant des propriétés bénéfiques pour la santé.

Notre étude consiste à vérifier la pureté de neuf souches lactiques déjà isolées et identifiées à partir des échantillons de lait de vache, de chamelle et de beurre traditionnelle. Afin d'évaluer leur potentiel probiotique.

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

L'examen microscopique des souches isolées à prouver que toutes les souches étaient Gram +, de plus, le test catalase étaient négatif pour toutes les souches.

Les résultats microscopiques de notre étude a révèlent la présence de différentes formes coque, et coccobacilles avec une présence majoritaire de coque, Nos résultats se rapprochent de ceux cités par plusieurs études menées dans le même contexte que le nôtre et réalisées sur des produits laitiers (**Benhoua, 2019**).

I. Evaluation des aptitudes technologiques chez les souches lactiques :

I.1. Pouvoir protéolytique :

La protéolyse se traduit par l'apparition d'un halo clair dû à la dégradation de la caséine. Une certaine variabilité a été détectée entre les souches, notant que les souches LC3 et W1 présentant les valeurs les plus élevées (27 mm et 26 mm, respectivement) alors que la souche W2 a présenté la capacité la plus faible de dégradation de caséine (19 mm). Selon **Vuillemard (1986)**, la souche est dite protéolytique si elle présente une zone de lyse de diamètre compris entre 5 et 15 mm. Par comparaison à cette donnée, nos souches

sont révélées protéolytiques dont les diamètres des zones de protéolyse étaient compris entre 19 et 27 mm ce qui est similaire aux résultats antérieures sur des isolats de bactéries lactiques (**Nieto-Arribas et al., 2010; Domingos-Lopes et al., 2017; Seixas et al., 2018**).

I.2. Pouvoir lipolytique :

D'après les résultats obtenus, toutes les souches ont présenté un halo autour de l'ensemencement, ce qui signifie que toutes les souches possèdent une activité lipolytique.

Les neuf souches dans le cas des trois pourcentages testés, ont pu dégrader les deux sources lipidiques (naturelle et artificielle) avec des diamètres entre 9 et 31 mm. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par (**Zarour et al, 2018**) qui ont constaté que la plupart des souches des bactéries lactiques ont une activité lipolytique.

I.3. Activité antimicrobienne :

Les résultats des interactions bactériennes par la méthode directe entre les souches inhibitrices (**bactéries lactiques**) et les souches indicatrices (**bactéries pathogènes**) témoignent que toutes les souches lactiques possèdent la capacité d'inhiber la croissance des bactéries pathogènes avec des diamètres qui varient en fonction de la bactérie indicatrice et en fonction de la bactérie lactique. Ce résultat confirme celui obtenu par **Bougeurra Asma, (2020)** et **Mokdade, (2020)** qui ont constaté que les isolats lactiques étaient actives contre toutes les bactéries indicatrices à gram (+) et à gram (-) et l'effet inhibiteur diffère d'une souche à une autre.

La mesure de spectre d'inhibition démontre que les souches sélectionnées ont presque la même performance en matière d'inhibition de la croissance des bactéries indicatrices (spectre d'inhibition de 10 – 27 mm), ou elles ont révélé leur capacité à inhiber la croissance des cinq souches indicatrices.

I.3.1. L'Activité antibactérienne vis-à-vis *Escherichia coli* :

Les figure 13 et 14 indiquent que les diamètres des zones d'inhibition sont importants pour la majorité des souches cependant, on constate que les diamètres les plus élevés sont notés par LB2 et LC2 avec un spectre d'inhibition de 27mm et 26 mm respectivement.

E. coli est une bactérie pathogène qui se distingue des souches commensales par l'acquisition de propriétés de virulence à l'égard de l'hôte. Ces propriétés de virulence leur permettent d'affranchir les mécanismes de défense de l'hôte afin de s'établir dans de nouvelles niches écologiques et d'exprimer leur pathogénicité. Selon les facteurs de virulence acquis et leur tropisme tissulaire, ces souches pathogènes peuvent être à l'origine d'infection du tractus digestif, de l'arbre respiratoire et du tractus urinaire, mais également de méningites et de septicémies (**Sylvie Miquel, 2012**). Chez l'animal, cette espèce provoque la maladie de colibacillose qui a des effets néfastes sur l'élevage et l'aviiculture précisément.

Nos résultats de l'inhibition d'*E. coli* sont similaires à ceux trouvés par **Mérmouri. L, (2018)** avec une zone d'inhibition entre (20 - 26 mm) et (16 - 17 mm) respectivement.

L'activité antagoniste vis-à-vis des souches pathogènes est due à la production de bactéries lactiques de substances antimicrobiennes ou des métabolites tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, éthanol, diacétyl, acétaldéhyde, acétoïne, dioxyde de carbone, la reutérine, la reutéricycline et les bactériocines (**Parisa Shokryazdan et al, 2014**)

I.3.2. L'Activité antibactérienne vis-à-vis *Klebsiella pneumoniae* :

Le résultat de l'activité antimicrobienne des souches lactiques vis-à-vis de *Klebsiella a montré que* les trois souches (LC3, LC1 et LC2) possèdent la plus importante activité inhibitrice avec spectres d'inhibition variant de 16 à et 19 mm, la meilleure activité est notée par la souche LC3 (19 mm de diamètre de zone d'inhibition) à l'égard de la souche *Klebsiella* qui est un genre comportant actuellement cinq espèces dont l'espèce type est *Klebsiella pneumoniae*, germe très répandu dans la nature (sol et eau), saprophyte des voies respiratoires supérieures et il est l'agent des surinfections respiratoires (**LAMNAOUER, 2002 ; ZERGOUNE Khouloud Eldjazair, 2019**).

Klebsiella pneumoniae est un pathogène à fort potentiel épidémique fréquemment impliqué dans des infections sévères. De nombreuses épidémies nosocomiales causées par

cette bactérie ont été décrites, notamment chez des patients hospitalisés dans des unités de soins intensifs adultes ou pédiatriques (**CARRÈR et NORDMANN, 2009 ; BOUKADIDA et al, 2002 ; ZERGOUNE Khouloud Eldjazair, 2019**).

Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par Boudjaib Sarah, 2013 avec des diamètres variant de 6 mm à 33 mm.

I.3.3.L'Activité antibactérienne vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* :

En ce qui concerne les résultats d'inhibition des souches lactiques à *Pseudomonas*, les diamètres des zones d'inhibition constatés varient entre 12 et 20 mm. Le spectre d'inhibition le plus important a été noté par les souches LB1, LC2 et W4 (20 mm de diamètre).

Pseudomonas aeruginosa est un bacille, Commensal du tube digestif mais peu abondant chez le sujet sain, il occasionne de nombreuses infections chez les sujets fragilisés (**ZERGOUNE Khouloud Eldjazair, 2019**). Les résultats obtenus sont similaires aux ceux obtenus par Mokdad, 2020 avec des diamètres variant de 15,44 mm à 19,99 mm.

I.3.4. L'Activité antibactérienne vis-à-vis *Staphylococcus aureus* :

D'après les résultats de test d'antagonisme on observe que toutes les souches lactiques ont une activité antibactérienne envers *Staphylococcus aureus*, dont l'intervalle des diamètres des zones d'inhibition entre 16 mm et 25 mm.

On remarque que les trois souches lactiques suivantes (LC3, LC4, LC2), montrent l'activité la plus importante avec un spectre d'inhibition se situant entre 23 et 25 mm.

Les souches lactiques testées sont actives vis-à-vis de cette souche pathogène *S. aureus* qui est une bactérie à Gram positif et qui peut survivre pendant une longue période sur tout type de surface et tous types d'habitats. Les mains sont probablement le vecteur principal de transmission du *S. aureus* (**Davido, 2010**).

Elle peut causer de nombreuses maladies chez l'Homme: infections de la peau et des tissus mous, endocardites, infection du système nerveux central, infections pulmonaires, muscles et squelette, tractus génito-urinaire (**Robert, 2013**).

Nos résultats sont très intéressants par rapport à celles trouvées par **Benmammar (2017)** qui a trouvé des zones d'inhibition entre 12 et 16 mm de diamètre.

En revanche, **Heikkila et al, (2003)** ont trouvé un effet antagoniste des bactéries isolé à partir de lait maternel plus faible dont les diamètres des zones d'inhibition entre 1 et 2 mm. De même, **Belhamra (2017)** a trouvé que *Staphylococcus aureus* est la plus sensible à l'action des bactéries lactiques avec un diamètre variant entre 30,5 à 43,5mm.

Ces inhibitions peuvent être dues à une variété de substances inhibitrices produites par les bactéries lactiques. D'après **Leonard (2013)**, l'effet bactéricide des souches lactiques peut être attribué à divers facteurs comme la compétition nutritionnelle et pour l'espace ainsi la production d'un ensemble de métabolites possédant des propriétés antimicrobiennes. Ces métabolites sont des acides organiques (principalement l'acide lactique), le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyle la reutérine et les bactériocines. Le métabolite antibactérien que produit toutes les bactéries lactiques est l'acide lactique ce métabolite modifie le pH de milieu et peut avoir une influence sur les bactéries pathogènes tel que *Staphylococcus aureus*. Selon **Jagoda suskovi et al, (2010)**, l'acide lactique provoque une détérioration par acidification, ainsi son effet inhibiteur dues principalement à sa forme, qui diffuse à travers la membrane cellulaire vers le cytosol et le rend plus acide et interfère avec les fonctions.

I.3.5. L'Activité antibactérienne vis-à-vis *Listeria monocytogenes* :

Selon les figures 12 et 13, les diamètres des zones d'inhibition des souches lactiques vis-à-vis *Listeria monocytogenes* varient entre 10 et 25 mm. On a enregistré le diamètre le plus important par la souche LP avec une zone d'inhibition de 25 mm suivi par les deux souches W1 et LC2 avec un diamètre de 20 mm.

Listeria monocytogenes est l'agent causal de la listériose humaine, une infection fatale d'origine alimentaire. Les manifestations cliniques varient des gastroentérites fébriles à des formes sévères invasives incluant les septicémies, méningites, rhombencéphalites, infections prénatals et avortements. Différemment des autres pathogènes des infections d'origines alimentaires, la listériose est associée à des cas de mortalité qui peuvent atteindre des valeurs de 20-30% (**ALLERBERGER. F et WAGNER. M, 2010 ; A. BOUBENDIR, 2011**). *L. monocytogenes* cause aussi des maladies chez les vaches laitières, incluant les avortements et les infections du système nerveux central (**KONGO M et al, 2006 ; A. BOUBENDIR, 2011**). Tous les membres du genre *Listeria* sont largement distribués dans la nature. On considère

que son biotope naturel est le sol, où elle se développe en saprophyte sur des végétaux en décomposition. Elle est principalement rencontrée dans les aliments végétaux crus et les produits à base de lait cru. Les animaux fermiers et leur environnement peuvent présenter une source importante de contamination alimentaire et d'infections pour les humains. Les *Listeria* en général et particulièrement *L. monocytogenes* sont aussi utilisés comme indicateurs d'hygiène dans toutes les étapes de la chaîne de transformation alimentaire **(BORNERT G, 2000 ; JEMMI. T et STEPHAN. R, 2006 ; A. BOUBENDIR, 2011).**

Les résultats obtenus, se concordent avec les résultats de Mokdad, 2020 qui a rapporté des diamètres variant de 16,37 à 20,28mm.

Ces résultats nous ont conduits à conclure que ces souches lactiques sont caractérisées comme productrices de substances antimicrobiennes capables d'inhiber la croissance des germes indésirables.

Par ailleurs, Les bactéries lactiques sont connues pour leur capacité à produire lors de leur croissance une multitude de composés antimicrobiens actifs dans le but d'inhiber la prolifération des microorganismes indésirables **(Dortu et Thonart, 2009 ; Bentoura Sellam. A, 2018).**

Parmi ces métabolites aux propriétés antimicrobiennes on parle des acides organiques qui acidifient le milieu des dérivés du métabolisme de l'oxygène (H₂O₂). Des substances naturelles de nature protéique douées d'une activité antagoniste à l'encontre d'un grand nombre de germes d'altération, leur permettant de se développer préférentiellement dans divers écosystèmes **(Titiek et al, 1996 : Aslam et Qazi, 2010 ; Bentoura Sellam. A, 2018).**

Ces résultats peuvent expliquer également la longue durée de conservation du lait de et son intérêt thérapeutique **(Hassan et al, 2008 ; Bentoura Sellam. A, 2018).**

I.4. Résistance aux antibiotiques :

Plusieurs études ont montré la résistance naturelle d'une gamme importante de bactéries lactiques aux antibiotiques **(Botes et al, 2008).** Il est nécessaire avant de lancer une culture probiotique de vérifier que les souches bactériennes impliquées ne contiennent pas des gènes de résistance aux antibiotiques qui risque d'être transférer a d'autres bactéries

(Ammor et Mayo, 2007 ; MOKDAD, 2020). Toutes les souches étaient sensibles à tous les antibiotiques testés, à l'exception de la souche LC3 qui été résistante à la gentamycine avec un diamètre de (15mm). Cependant, les souches (LB1, LB2, LC1, LC2 et LC4) ont montré une résistance modérée à la gentamycine. Nos résultats se rapprochent à ceux de **Mokdad et al., (2020).**

CONCLUSION

Les bactéries lactiques ont un intérêt primordial dans l'alimentation, il y'a au moins quatre milles ans que l'homme se sert de ces bactéries. Elles ont un intérêt industriel tout particulier, où elles sont utilisées pour améliorer les caractères organoleptiques de différents produits alimentaires (le gout, la saveur, la texture, l'arome de produits par exemple le lait fermenté, le yaourt, le fromage, le pain et les produits carnées...etc.), ainsi qu'elles jouent un rôle important dans l'entretien et l'amélioration de la santé de l'homme.

Au cours de cette étude, neuf souches lactiques ont fait l'objet d'une évaluation in vitro de leurs aptitudes technologiques à savoir: Le suivi de l'activité protéolytique, lipolytique, la croissance sur milieu hyper-saccharose (production d'EPS);le pouvoir antagoniste de ces souches lactique envers les microorganismes pathogènes qui sont impliqués dans divers infections appartiennent aux espèces suivantes : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria pneumoniae* et *Klebsiella monocetogenes* ; et enfin l'antibiogramme.

Toute les souches étudiées étaient performantes en production d'acide lactique, cette acidité produite stimule la coagulation du lait et même la conservation de nombreux aliments, présentent un pouvoir protéolytique très important surtout chez les souches LC3 et W1, hydrolyse des lipides avec un grand pouvoir chez la souche LB2 et W2 et une activité antimicrobienne très élevée vis-à-vis toutes les souches pathogènes considérés.

Les souches étudiées sont de bonnes candidates car elles montrent des comportements remarquables vis-à-vis de tous les tests réalisés lors de ce travail , donc elles doivent faire l'objet d'une étude plus poussée pour la caractérisation des différents critères de sélection des ferments lactiques pour pouvoir être destinées à l'utilisation comme cultures starters en industrie des aliments fermentées.

*Références
Bibliographiques*

A

- **Ammor M.S. Et Mayo B., 2007.** Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production. *Meat. Science.* 76 : 138-146.
- **Amatayakul T., Halmos A.L., Sherkat F. And Shah N.P., 2006.** Physical characteristics of yoghurts made using exopolysaccharide-producing starter cultures and varying casein to whey protein ratios. *International dairy journal.* vol. 16, 40-51.
- **Avril D. And Denis M. 1992.** Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie leeuwenhoek. J.* 70: 331-345.
- **Axelsson L.T. (2004).** Lactic acid bacteria : classification and physiologie. In *lactic acid bacteria – microbiologie and functional aspects*, edited by s. Salminen, s. Von wright, a. And ouwehand a. (eds), marcel dekker, inc.633. Pp 1-66.
- **AZHAR. M., HASAN .A., LUBNA. M.I. E. (2015).** Effect of lactic acid producing bacteria on some potential pathogens in sausage. *Assiut Vet. Med. J.* 61, 144.
- **Aidin Shafipour,** Yordshahi ; Mehran, Moradi ; Hossein, Tajik ; Rahim, Molaei. Design and preparation of antimicrobial meat wrapping nanopaper with bacterial cellulose and postbiotics of lactic acid bacteria. Elsevier [en ligne], 108561, 2020.

B

- **Béal C., Marin M., Fontaine E., Fonseca F. Et Obert J.P., 2008.** Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. In : *bacteries lactiques, de la genetique aux ferments (corrieu g.et luquet f.m.)*. Tec & doc, lavoisier. Paris. 661-765.
- **BELHAMRA, Z. (2017).** Croissance et survie des probiotiques en présence des édulcorants et des additifs alimentaires. *Biologie, Ferhat Abbas Sétif 1.* Doctorat: 147.
- **Belyagoubi L., 2014.** Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels algériens. Thèse de doctorat en biologie. université aboubakr belkaïd-tlemcen. 170p.

- **BENHOUNA Insaf Samira.** RECHERCHE ET EXPLOITATION DES EXOPOLYSACCHARIDES PRODUITS PAR LES BACTERIES LACTIQUES ET LEUR APPLICATION [en ligne]. Mémoire de doctorat : Microbiologie appliquée. Oran : Université Ahmed Ben Bella, 2016.
- **BENNAMA, R. (2012).** *Streptococcus thermophilus* : isolement et recherche systématique de souche indigènes productrices d'exopolysaccharides, Oran. Doctorat: 153.
- **Botes M., Van Reenen C.A. et Dicks L.M.T., 2008.** Evaluation of enterococcus mundtii st4sa and *Lactobacillus plantarum* 423 as probiotics by using a gastrointestinal model with infant milk formulations as substrate. Int. J. Food microbiol. 128 : 362-370.
- **BOULOUF, A. (2016).** Technologie Alimentaire, Etude du pouvoir technologique de quelques bactéries lactiques du fromage traditionnel « Bouhezza ». Technologie alimentaire, frères mentouri Constantine. Magister: 135.

D

- **Dayong, Ren ; Jianwei, Zhu ; Shengjie, Gong ; Hongyan, Liu ; Hansong, Yu.** Antimicrobial Characteristics of Lactic Acid Bacteria Isolated from Homemade Fermented Foods. Open Veterinary Journal [en ligne], 104-111, 2018.
- **DIB, W. (2015).** Caractéristique et rôle probiotique des bactéries lactiques isolées à partir du lait de chèvre : effet immunomodulateur chez la souris Balb/c, ORAN. Doctorat: 188.
- **Dibyajit, Lahiri ; Sudipta, Dash ; Somdeepa, Chakraborti , Rina, Rani Ray ; Amrita, Jasu ; Moupriya, Nag.** Production and purification of bacteriocin from *Leuconostoc lactis* SM 2 strain . Elsevier [en ligne], 101845, 2020.
- **Drici H. (2001).** Etude biochimique de la protéolyse chez *Lactococcus lactis* Subsp.diacetylactis et recherche du support génétique des protéases. Thèse de Magister: université d'Oran-sénia.

E

- **Eiseul, Kim ; Hae Choon, Chang ; Hae Yeong, Kim.** Complete Genome Sequence of *Lactobacillus plantarum* EM, A Putative Probiotic Strain with the Cholesterol Lowering Effect and Antimicrobial Activity. Springer Science + Business Media, LLC, part of Springer Nature [en ligne], 00284-020-02000-8, 2020.
- **ELFAHRI, K. (2012).** Release of bioactive peptides from milk proteins by *Lactobacillus* species, school of biomedical and health science. Doctorat: 133.
- **Ennadirj., Hassikou R., Al Askari G., Arahou M., Bouazza F., Amallah L., Amine S. A., Khedid K., (2014).** Caractérisation phénotypique et génotypique des bactéries lactiques isolées des farines de blé d'origine marocaine (Phenotypic and genotypic characterization of Lactic acid bacteria isolated from wheat flour from Morocco) .J. Mater. Environ. Sci.5(4). p1125 - 1132.

G

- **Guiraud J.P. Et Rosec J.P., 2004.** Pratique des normes en microbiologie alimentaire. Afnor. 237-251.

H

- **HADEF, S. (2012).** Évaluation des aptitudes technologique et probiotiques des bactéries lactiques locales, Kasdi merbah-ouargla. Magister: 135.
- **HAMMI, I. (2016).** Isolement et caractérisation de bactériocines produites par des souches de bactéries lactique isolées à partir de produits fermenté marocains et de différentes variétés de fromages français. Strasbourg et Sidi Mohamed Ben Abdallah. Doctorat: 149.
- **Hatice, Yazgan ; Esmeray, Kuley, Tülin ; Güven Gökmen ; Joe M. Regenstein; Fatih; Özogul.** The antimicrobial properties and biogenic amine production of lactic acid bacteria isolated from various fermented food products. Journal of Food processing and preservation [en ligne], 15085, 2020.

I

- **ISNARD, C. (2017).** « *Enterococcus sp*: entre pathogènes opportunistes et probiotiques », université de Caen Normandie, 299 p., Caen Normandie. Doctorat: 299.

J

- **Jacobo, López-Seijas ; Belén, García-Fraga ; Abigail, F da Silva ; Carmen, Sieiro.** Wine lactic acid bacteria with antimicrobial activity as potential biocontrol agents against *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici*. *Agronomy* [en ligne], 36310, 2020.
- **JAGODA .Suskovi., Jasna Beganovi., Lebo Pavunc. A., Habjani .K ., Mato. S. (2010).** Antimicrobial Activity – The Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria *Food Technol. Biotechnol.*, 48 (3), 296–307.

L

- **Labaooui H, Elmoualdi L, El Yahiaoui M Et Ouhssine M. (2005).** Sélection de souches des bactéries lactiques antibacterienne. *Bal doc dparm. Bordeaux*, 144, 237-250.
- **Larpent, J. P. & Larpent, G. M. (1990).** Mémento technique de microbiologie. Tec & Doc, Lavoisier, Paris. 471 p.
- **LAZREG, L. (2017).** Bactériocines d'entérocoques isolés de lait cru et beurre de l'ouest algérien, Oran. Doctorat: 193.
- **LEONARD, L. (2013),** Évaluation du potentiel bioprotecteur de bactéries lactiques confinées dans une matrice polymérique in *Procédés Alimentaires et Microbiologiques*, Bourgogne UMR. Doctorat : 318.
- **Leroy S., Lebert I., Chacornac J.P., Chevalier I. Et Talon R., 2007.** Identification et caractérisation de la flore d'intérêt technologique : bactéries lactiques et staphylocoques a coagulase négative. *Sci. Tec. V. Prod. Carnés.* 25(5) : 172.
- **Leroy F Et De Vuyst L, (2004).** Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Tre. food sci. Technol.* 15, 67-78.
- **Leveau J.Y., Boiux M. Et De Roissart H.B., 1991.** La flore lactique : technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro- alimentaires. 2ème ed., tec & doc, lavoisier. Paris. 3: 2-40.

M

- **Monnet V., Latrille E., Beal C. Et Corrieu G., 2008.** Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. In : bactéries lactiques de la génétique aux ferments (corrieu g. Et luquet f.m.). Tec & doc, lavoisier. Paris. 512-592.
- **MAHI, M. (2010).** Étude technologique des bactéries lactique isolées à partir du lait de Brebis. Oran. Magister: 107.
- **MAKHOULFI, K. M. (2012).** Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc mesenteroides* isolée du boza, pierre et marie curie – paris. Doctorat: 229.
- **Mattia, Pia Arena ;** Vittorio, Capozzi ; Pasquale, Russo ; Djamel, Drider ; Giuseppe, Spano ; Daniela Fiocco. Immunobiosis and probiosis: antimicrobial activity of lactic acid bacteria with a focus on their antiviral and antifungal properties. Cross Mark [en ligne], 9949–9958, 2018.
- **Mäyrä-Mäkinen A Et Bigret M. (2004).** Industrial use and production of lactic acid bacteria. In: lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects (salminen s., wright a.v. Et ouwehand a.). 3e ed., marcel dekker, inc. New york, 73-102.
- **MOKDAD Feyza Halima.** Influence des *leuconostocs* produisant des bactériocines sur les caractéristiques industrielles des produits laitiers [en ligne]. Mémoire de doctorat : Microbiologie appliquée. Oran : Université Ahmed Ben Bella, 2020.

O

- **O'SULLIVAN, L. A. b., R.P. Ross a, C. Hill b,c. (2002).** Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. Biochimie, 84, 593–604.

R

- **Rabiul,** Islam; Md. Nur, Hossain ; Md. Khasrul, Alam; Md. Ekhlas, Uddin; Mehadi Hasan, Rony ; Md. Abu Sayeed, Imran ; Md. Firoz, Alam. Activity of Lactic Acid Bacteria and Extraction of Bacteriocin Protein. Scientific Research Publishing [en ligne], 2156-8502, 2020.
- **RAM KUMAR, P. (2013).** Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from food samples: an in vitro study. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 3 (03). 85-93.

- **Remzi**, Cholakov ; Yulian, Tumbarski ; Velichka, Yanakieva ; Iliyan, Dobrev ; Yozkan, Salim ; Zapryana, Denkova. ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *LEUCONOSTOC LACTIS* STRAIN BT17, ISOLATED FROM A SPONTANEOUSLY FERMENTED CEREAL BEVERAGE (BOZA). Journal of Microbiologie, Biotechnologie and Food Sciences [en ligne], 7.1.47-49, 2017.
- **ROBERT D. (2013)**. *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) : généralités, antibiotiques actifs, résistances acquises, et implication en pathologie communautaire illustrée par l'exemple des infections acquises au cours de la pratique sportive Angers. Doctorat 127.
- **Rodriguez J.M., Martinez M.I., Horn N. Et Dodd H.M., 2003**. Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. Int. J. Food microbiol. 80 : 101-116.
- **Rahmeh** ; A. Akbar ; M. Kishk ; T. Al-Onaizi ; A. Al-Azmi ; A. Al-Shatti ; A. Shajan ; S. Al-Mutairi ; B. Akbar. Distribution and antimicrobial activity of lactic acid bacteria from raw camel milk. Elsevier [en ligne], 100560, 2019.
- **Ruas-Madiedo P., Hugenholtz J. And Zoon P., 2002**. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. International dairy journal. Vol. 12, 163-171.

S

- **SAVADOGO, A. (2004)**. Caractérisation biochimique et moléculaire des bactéries lactique productrice d'exopolysaccharide isolée à partir d'échantillons de lait fermenté du Burkina Faso, Ouagadougou. Doctorat: 143.
- **Serhan M., Cailliez-Grimal C., Borges F., Revol-Junelles A.M., Hosri C. Et Fanni J.,2009** .bacterial diversity of darfiyeh, a lebanese artisanal raw goat's milk cheese. Food microbiol.26 : 645-652.
- **Se Young**, Kwun ; Young Woo, Bae ; Jeong Ah, Yoon ; Eun Hee, Park ; Myoung Dong, Kim. Isolation of acid tolerant lactic acid bacteria and evaluation of aglucosidase inhibitory activity. The Korean Society of Food Science and Technology [en ligne], 10068-020-00760-4, 2020

- **Siegumfeldt H., Rechinger K.B. And Jakobsen M., 2000.** Dynamic changes of intracellular ph in individual lactic acid bacterium cells in response to a rapid drop in extracellular ph. Appl Environ Microbiol, 66: 2330-2335.
- **Streit F., Corrieu G. Et Béal C., 2007.** Acidification improves cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* cfl1. J. Biotechnol. 128 : 659-667.
- **Stellah, Byakika ; Ivan, Muzira ; Mukisa ; Robert, Mugabi ; Charles, Muyanja.** Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria Starters against Acid Tolerant, Antibiotic Resistant and Potentially Virulent *E. coli* Isolated from a Fermented Sorghum-Millet Beverage. Hindawi [en ligne], 7062, 2019.

T

- **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.

W

- **Welman A.D. And Maddox I.S., 2003.** Exopolysaccharides from lactic acid bacteria, perspectives and challenges. Trends in biotechnology. Vol. 21, 269-274.

X

- **Xing, Wang ; Weidong, Wang ; Haoxin, Lv ; Hua, Zhang ; Yuan, Liu ; Miao, Zhang ; Yanping, Wang ; Zhongfang, Tan.** Probiotic Potential and Wide-spectrum Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Infant Feces. Springer Science + Business Media, LLC, part of Springer Nature [en ligne], 12602-020-09658-3, 2020.

Z

- **ZAROOUR Kenza.** Etude de la diversité phénotypique, génotypique et aptitudes technologiques des souches de *Leuconostoc* isolées localement [en ligne]. Mémoire de doctorat : Microbiologie appliquée. Oran : Université Ahmed Ben Bella, 2018.

Annexes

Annexe 1 : composition des milieux de culture :

1/Bouillon nutritive 20 g/l

Ingrédients	Masse
Peptone	10 g
Extrait de viande	5g
Chlorure de sodium	5g
L'eau distillée	1l

PH=7, autoclavage 20 min à 121°C, à pression 200 kpa.

2/Gélose nutritive

Ingrédients	Masse
Peptone	10 g
Extrait de viande	5g
Chlorure de sodium	5g
Agar	5g
L'eau distillée	1l

PH=7, autoclavage 20 min à 121°C.

3/Gélose MRS 62 g / 1l

Ingrédients	Masse
Peptone	10 g
Extrait de viande	10g
Extrait de Levure	5g
-Glucose	20
-Phosphate dipotassique	2g
Acétate de sodium	5g
-Tween 80 (polysorbate 80)	1g
-Citrate d'ammonium	2g
-Sulfate de magnésium	0.2g
-Sulfate de manganèse	0.1g
-Agar	15g
-L'eau distillé	1l

PH = 6,8, autoclavage à 120°C.

4/Bouillon MRS

-27.5 g dans 500 ml PH=6.8, autoclavage 20 min à 121°C.

5/ Le milieu hyper saccharosé (MSE)

Ingrédients	Masse
Extrait de viande	10g
Extrait de Levure	5g
- Extrait de viande	10g
- Extrait de levure	3g
- Peptone	2,5g
- Saccharose	150g
- K ₂ HPO ₄	2g
- NaCl	1g
- MgSO ₄ , 7H ₂ O	0.2g
-Agar	15g
-L'eau distillé	1l

pH= 6,8

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min

6/Milieu Clark et Lubs

Ingrédients	Masse
- Peptone tryptique ou poly peptone	5 – 7 g
- Glucose	5g
- Phosphate dipotassique	5g
- L'eau distillée	1l

pH =7

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min

7/ Milieu PCA :

Ingrédients	Masse
- Peptone de caséine	5g
- Extrait de levure	2,5g
- Glucose	1g
- Agar	15g

PH = 7





Stérilisation par autoclavage à 121°C pendant 15 min

Annexe 2 : Matériels utilisés dans cette étude

Milieus de culture

- Milieu MRS (bouillon + gélose).
- Gélose nutritif.
- Bouillon nutritif.
- Milieu PCA.
- Milieu MSE.
- Milieu Clarck et Lubs.

Produits chimiques :

- Eau distillée.
- Eau physiologique.
- Huile d'immersion.
- Huile de paraffine.
- H₂O₂.
- Produit de coloration de Gram :
 -  Violet de gentiane.
 -  Lugol's iodine.
 -  Alcool 95°.
 -  Fuchsine.

Appareillage :

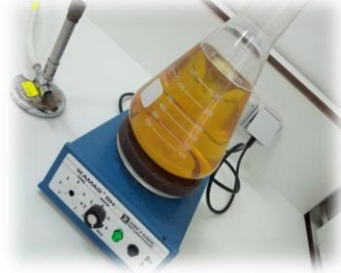
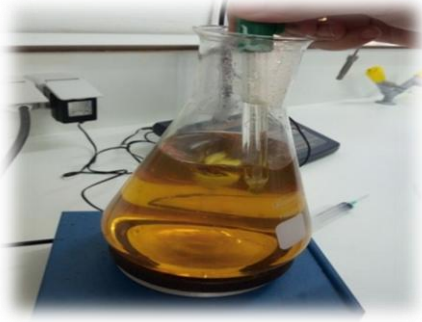
- Etuve bactériologique (WISVEN).
- Bain marie (MEMMET).
- Réfrigérateur (Condor).
- Autoclave (WISCLAVE).
- Vortex (VELP).
- Balance de précision (KEREN).
- Balance électrique (KEREN).
- Microscope optique (ZEISS).
- Agitateur muni d'une plaque chauffante (VWR).

Autres matériels :

- Bec-benzène.
- Boîtes de Pétri.
- Tubes à essai.
- Lames.
- Lamelles.

- Anse de platine.
- Pipettes Pasteur.
- Portoirs.
- Flacons stériles.
- Papier parafilm

Annexe 3 : Photos des appareils utilisés dans cette étude



Annexe 4 : Coloration de Gram

La coloration de Gram a été réalisée selon la technique suivante :

- Sur une lame, fixer à la chaleur une culture bactérienne ;
- Recouvrir la lame avec la solution de violet de gentiane pendant une minute ;
- Ajouter du lugol pendant 30 secondes ;
- Décolorer avec de l'alcool 95°, puis rincer à l'eau ;
- Faire une contre coloration en utilisant la fuschine et laisser agir 20 à 30 secondes ;
- Laver à l'eau ;
- Après séchage, soumettre la lame à une observation microscopique à immersion (x100).

Les bactéries à Gram positif apparaissent en violet et les bactéries à Gram négatif en rose.