

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Saida « Dr. Moulay Tahar »

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



MÉMOIRE

Présenté par

KAMLI dalila et **DJELAILI** karima

Envue de l'obtention du

Diplôme de Master en Biologie

Spécialité: Microbiologie appliquée

Etude de propriétés de bactéries lactiques isolées à partir
de produits alimentaires traditionnels Algériens

Soutenue publiquement le 25 / 06 / 2023 devant le jury composé de :

Président	Dr BELLIL Yahia	MCA	Université de Saida
Examinatrice	Dr CHAHROUR Wassila	MCB	Université de Saida
Encadrant	Dr BENREGUIEG Mokhtar	MCA	Université de Saida
Co-Encadrant	Dr BENABBOU Taha Ahmed	MCB	Université de Saida

Année Universitaire 2022-2023

Remerciements

Avant tout, nous tenons à remercier Allah tout puissant: qui nous a donné la santé, la volonté, et la patience pour l'accomplissement de ce travail.

*Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à notre cher encadreur Dr **BENREGUIEG Mokhtar** qui a accepté la charge d'être le rapporteur de notre mémoire et qui nous a dirigés dans ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de notre plus profond respect et de notre plus vive reconnaissance.*

*Nous tenons également à remercier le Dr **BENABBOU Taha Ahmed** pour son soutien continu, ses conseils et son aide pratique dans la réalisation de ce travail.*

Notre profonde reconnaissance s'adresse à membres du jury:

*Dr **BELLIL Yahia** et Dr **CHAÏROUR Wassila** qui ont fait l'honneur d'accepter d'être membres du jury, nous vous remercions infiniment pour l'intérêt porté au sujet, l'aide précieuse et les conseils pertinents.*

Nous profitons également d'exprimer toutes nos reconnaissances aux enseignants de la faculté de science département de biologie pour nous avoir transmis leurs connaissances et assuré notre formation.

Nous remercions vivement les laborantins de laboratoire de biologie pour les conseils, l'aide et l'amitié qu'ils nous ont témoignée tout au long de notre travail.

À tous ceux qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce modeste travail, un éternel merci à vous.



Dédicace

*Avec l'aide d'Allah, j'ai pu réaliser
Ce modeste travail que je dédie À :*

Mes chers parents

Mes frères et soeurs

À tous les membres de la famille

À mon fiancé et sa famille

A ma collègue Karima

Et à tous ceux qui m'ont soutenu

De près ou de loï

Dalila



Dédicace

Je dédie humblement ce travail :

À Mon soutien dans la vie, mon cher père.

À la source de la tendresse et la personne la plus

Précieuse que j'ai, ma mère.

À mes sœurs : Moukhtaria, Naïma, Sadika.

À mon unique frère : Kada.

Aux petits membres de la famille : Mohamed,

Ibrahim, Asmaa, Ritaj.

Et à mes sœurs et amies : Zahra, Dhaïba,

Kaouthar, Nassren, Mariem.

Je n'oublie pas également une amie d'étude et une

Collègue dans ce travail : Dalila.

Karima

المخلص

البكتيريا التي تحتوي على حمض اللاكتيك موجودة بشكل طبيعي في بيئتنا وفي الأطعمة التي نتناولها. يتم استخدام هذه البكتيريا في تخمير وحفظ الأطعمة بواسطة إنتاجها للأحماض العضوية والمركبات المضادة للميكروبات مثل البكتيريوسين، والتي تمتلك خصائص تثبيطية ضد بعض أنواع البكتيريا المسببة للأمراض. من أجل فهم تأثير هذه البكتيريا المثبطة، قمنا بعزل من 50 هذه الكائنات الحية الدقيقة من ثلاثة منتجات ألبان تقليدية. تم الحصول على عزلات إيجابية الغرام وسالبة الكاتالاز من أربعة عينات مختلفة (لبن زبدة، كريمة 1، كريمة 2). تم إجراء فحص أولي باستخدام تقنية فليمنغ، حيث أظهرت 20 عزلة نشاطاً مضاداً للبكتيريا ضد واحدة على الأقل من البكتيريا المؤشرة الأربعة (المكورات العنقودية الذهبية، الإشريكية القولونية، الزائفة الهوائية، الليستيريا المونوسيتوجينا). تم تنقية العزلات النشطة على وسط MRS. أظهر الاختبار المجهرى ان 24% فقط من العزلات كانت عصيات ضد 76% مكورات.

نتائج الاختبارات المثبطة التي تمت باستخدام الطريقة المباشرة وغير المباشرة أظهرت أن أكبر منطقة تثبيط بلغ قطرها 56 مم، وذلك بواسطة العزلة CD3 ضد الليستيريا المونوسيتوجينا. كما تم رصد تفاعل بين العزلة DE1 وجميع البكتيريا المؤشرة من خلال مناطق قطرها 25 إلى 40 مم. وكذلك تفاعل عزل K2B1 مع جميع بكتيريا المؤشر باستثناء المكورات العنقودية الذهبية كانت هناك حاجة إلى مزيد من الدراسات لتحديد الطبيعة الدقيقة للمانع. أظهرت اختبارات تحديد طبيعة التثبيط أن جميع العزلات لها قوة مثبطة بسبب تحمض البيئة باستثناء عزل K2B1 الذي احتفظ بتأثير بعد تحييد المادة الطافية. تم تحديد العزلة الأخيرة لاحقاً على أنها *Lactococcus lactis. ssp* باستخدام معرض API50 Ch.

الكلمات المفتاحية: بكتيريا لبنية، بروبيوتيك، لبن، زبدة، كريمة.

Résumé

Les bactéries lactiques sont naturellement présentes dans notre environnement et notre alimentation. Ils sont utilisés dans la fermentation et la bioconservation des aliments en produisant des acides organiques et d'autres antimicrobiens tels que les bactériocines et en inhibant certaines souches pathogènes. Pour mettre en évidence l'effet inhibiteur de ces bactéries, nous avons procédé à l'isolement de ces microorganismes à partir de 3 sous produits laitiers traditionnels. 50 isolats Gram positif et catalase négatif sont obtenus à partir de 4 différents échantillons (Lben Zebda, Klila1, Klila2). Un screening primaire est réalisé en utilisant la technique de Fleming où 20 isolats ont montré une activité antibactérienne contre au moins une bactérie indicatrice parmi les quatre (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria innocua*). La purification des isolats actifs a été réalisée sur milieu MRS. L'examen microscopique a montré que 24% des isolats seulement sont de bacilles contre 76 % de coques.

Les résultats du test inhibiteur réalisé par la méthode directe et indirecte, ont montré que la plus grande zone d'inhibition était de 56 mm de diamètre donnée par l'isolat CD3 contre *Listeria innocua*. Il existe également une interaction entre l'isolat DE1 contre toutes les bactéries indicatrices par des zones d'inhibition de 25 à 40 mm de diamètre. De même que l'interaction de l'isolat K2B1 avec toutes les bactéries indicatrices à l'exception de *S.aureus*. D'autres études étaient nécessaires pour déterminer la nature exacte de l'inhibiteur. Les tests réalisés pour déterminer la nature de l'inhibition ont montré que la totalité des isolats ont un pouvoir inhibiteur dû à l'acidification du milieu à l'exception de l'isolat K2B1 qui a gardé un effet après la neutralisation du surnageant. Ce dernier isolat est, par la suite, identifié en tant que *Lactococcus lactis .ssp* en utilisant une galerie API50 Ch.

Mots clés : les bactéries lactiques, les probiotiques, lben, zebda, klila.

Abstract

Lactic acid bacteria are naturally present in our environment and food. They are used in the fermentation and biopreservation of food by producing organic acids and other antimicrobials such as bacteriocins and inhibiting certain pathogenic strains. To highlight the inhibitory effect of these bacteria, we preceded 50 to isolate these microorganisms from 3 traditional dairy products. 50 Gram-positive and catalase-negative isolates are obtained from 4 different samples (Lben Zebda, Klila1, and Klila2). A primary screening is performed using the Fleming technique where 20 isolates showed antibacterial activity against at least one indicator bacterium among the four (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria innocua*). Purification of active isolates was performed on SRM medium. Microscopic examination showed that only 24% of isolates are from bacilli compared to 76 % from cocci.

The results of the inhibitory test performed by the direct and indirect method showed that the largest inhibition zone was 56 mm in diameter given by the CD3 isolate against *Listeria innocua*. There is also an interaction between the DE1 isolate against all indicator bacteria by inhibition zones 25 to 40 mm in diameter. As well as the interaction of the K2B1 isolate with all indicator bacteria except *S. aureus*. Further studies were needed to determine the exact nature of the inhibitor. Tests to determine the nature of inhibition showed that all isolates have inhibitory power due to acidification of the environment with the exception of the K2B1 isolate that retained an effect after neutralization of the supernatant. The latter isolate is subsequently identified as *Lactococcus lactis. ssp* using an API50 Ch gallery.

Key words: *lactic acid bacteria, probiotic, milk, butter, klila.*

Liste des tableaux

Tableaux	Titres	page
1	Les différents genres des bactéries lactiques	8
2	Principales espèces et sous espèces de lactobacilles utilisées en industrie laitière. <i>Lb Lactobacillus</i>	10
3	exemple de micro-organismes probiotiques études	18
4	Récapitulatif des différents critères de sélection des souches probiotiques	25
5	L'origine des échantillons	28
6	Les souches d'indicateurs	33
7	Le code et la dose de chaque antibiotique utilisé	37
8	Résultats de l'examen macroscopique des colonies sur milieux gélosés MRS et M17	44
9	Résultats de la coloration de Gram et catalase des 50 colonies	47
10	Profil physiologique et biochimique des isolats actifs	49
11	profil fermentaire de souche K2B1. API50 CHL après 48h d'incubation a 30C°	52
12	Activité inhibitrice de 15 isolats lactiques bioactifs	54
13	Résultats de la méthode indirecte (sens neutralisation de surnageant) de 15 isolats lactiques	57
14	Résultats de teste d'antibiogramme des isolats	61

Liste des figures

Figures	Titres	page
1	Voies fermentaires de la dégradation du glucose	6
2	Arbre phylogénétique des bactéries lactiques et genres apparentés	8
3	<i>Lactococcus</i>	9
4	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> (a gauche) et <i>Lactobacillus casei</i> (a droite) , observés au microscope électronique (G x 10 000)	10
5	<i>Streptococcus</i>	11
6	Schéma des méthodes de fabrication des principaux produits laitiers algériens	17
7	<i>Lactobacillus Bulgaricus</i>	19
8	<i>Streptococcus thermophilus</i>	19
9	<i>Bifidobacterium Longum</i>	20
10	<i>Saccharomyces boulardii</i>	20
11	Les mécanismes d'action des probiotiques	24
12	Échantillon de Lben	29
13	Échantillon de Dhan (Zebda)	29
14	Échantillon de klila1	29
15	Échantillon de klila2	29
16	Mise en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode des spots sur agar	34
17	Schéma de la méthode de diffusion en puits	35
18	Dénombrement de flore totale des échantillons de « Lben de Dhan et Klila 1 et 2 » sur le milieu MRS et M17.à 30°C	40
19	Dénombrement de la flore lactique sur le milieu MRS à 30°C [A] : Lben de dilution 10^{-3} , [B] : Klila 1 de dilution 10^{-2}	42
20	Le pourcentage global de coques et de bâtonnets dans les 50 bactéries lactiques isolées	43
21	Répartition des 50 isolats lactiques en coques et de bacilles en fonction de l'échantillon	43

22	Aspect macroscopique des isolats sur milieu (1) MRS et (2) M17 après 24h d'incubation à 30°C	44
23	Aspect des cultures pures des bactéries lactiques sur bouillon MRS	44
24	Aspect de purification des quelques isolats des bactéries lactiques sur bouillon MRS après 24h d'incubation à 30°C	45
25	Résultats de purification des quelques isolats en stries sur milieux MRS solide	46
26	Aspect microscopique Gx100 de quelques isolats A: isolat K2B1 (coque), B: isolat DB6 (bacille)	46
27	Profil fermentaire de souche K2B1 de bactéries lactiques identifiées par des API50 CHL ; après 48h d'incubation a 30C°	51
28	Aspects des effets inhibiteurs des bactéries lactiques contre les bactéries pathogènes par la méthode directe	53
29	Nombre d'isolats inhibiteurs pour chaque bactérie indicatrice	55
30	Aspects des effets inhibiteurs des bactéries lactiques contre les bactéries pathogènes par la méthode indirecte (sens neutralisation de surnageant)	56
31	Aspects des effets inhibiteurs des bactéries lactiques contre les bactéries pathogènes par la méthode indirecte (surnageant neutralisé)	58
32	Caractérisation de l'agent inhibiteur de 4 isolats. <i>P.aeruginosa</i> : LC3 / DE1 , <i>Escherichia coli</i> : DE1 / K2B1 , <i>Listeria innocua</i> : K2B3	59
33	Résultats de teste d'antibiogramme des isolats DE1, K2B1, K2B3	61

Liste des abréviations

BL	Bacteriers Lactiques
TSE	Tryptone Sel Eau
Lb	<i>Lactobacillus</i>
Sb	<i>Saccharomyces boulardii</i>
Ln	<i>Leuconostoc</i>
BL	Bacteriers Lactiques
PTG	Peptidoglucane
Fao	Food and agriculture organization
PH	Le potentiel hydrogène
AND	Acide dèsoxyribonuclèique
SCI	Syndrome du côlon Irritable
NST	Nombre de sujet à traiter
NNT	Number Needed to Treat,
PMN	Polymorphonucléaire
OMS	Organisation mondiale de la santé
MRS	Mac-Rogosa Sharpe
LAB	Lactic acid bacteria

Table des matières

Sommaire	page
Remerciements	
Résumé	
المخلص	
Abstract	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction	1
Synthèse bibliographique	
Chapitre I : les bactéries lactiques	
I.1. Définition	5
I.2. Habitat	6
I.3. Classification	7
I.4. Principaux genres des bactéries lactiques	9
I.4.1. <i>Lactococcus</i>	9
I.4.2. <i>Lactobacillus</i>	9
I.4.3. <i>Streptococcus</i>	11
I. 4.4. <i>Leuconostocs</i>	11
I.4.5. <i>Entérocooccus</i>	12
I.5. Intérêt des bactéries lactiques	12
I.5.1. Domaine alimentaire	12
I.5.1.1 rôle sur la structure et la texture	12
I.5.1.2.Rôle dans la conservation	12
I.5.1.3.Rôle sur les caractéristiques organoleptiques	12
I.5.2.Domaine de santé	13
Chapitre II : les probiotiques	
II.1. Définitions	15
II.2.Les aliments probiotiques (produits laitiers traditionnel)	15
II.2. 1.Lben	15
II.2. 2.La Klila ou Caséine desséchée	16
II.2.3.Rayeb	16
II.2.4.Zbeda Arbi(Le beurre)	16

II.2.5.Dhan alhour ou Dhan Al-hayal	16
II.2.6.Jben	17
II.3.Les principaux probiotiques	18
II.3.1.Genre <i>Lactobacillus</i>	18
II.3.2.Genre <i>Streptocoque</i>	18
II.3.3.Genre <i>Bifidobacterium</i>	19
II.3.4.Genre <i>Sachromyces</i>	19
II.4.L'importance des probiotiques	20
II.4.1.Indication aux probiotique	20
II.4.1.1.Maladies inflammatoires et troubles intestinaux	20
II.4.1.2.Diarrhée du voyageur	21
II.4.1.3.Diarrhées postantibiotiques	21
II.4.1.4>Allergie	22
II.4.1.5.Renforce le système immunitaire	22
II.5.Mécanismes d'action des probiotiques	23
II.6 Critères sélectionnés des souches probiotiques	24
Partie Expérimentale	
Matériel et méthodes	
1. Origine des échantillons et prélèvements	28
2. Dénombrement et isolement des bactéries lactiques	29
3. Identification des bactéries lactiques isolées	30
3.1. Examen macroscopique	30
3.2. Examen microscopique	30
3.3. Tests physiologiques et biochimiques	31
3.3.1. Recherche de la catalase	31
3.3.2. Croissance à différentes températures	31
3.3.3. Croissance à différents Ph	31
3.3.4. Teste de thèrmorésistance	31
3.3.5. Galerie API 50chl	32
4. Conservations des souches	32
4.1. Conservation à court terme	33
4.2. Conservation à long terme	33
5. Recherche du pouvoir inhibiteur	33
5.1. Méthode directe	34

5.2. Méthode indirecte	35
6. Caractérisation de l'agent inhibiteur	36
6.1. Inhibition due à l'acidité	36
7. Effet bactéricide ou bactériostatique	36
8. Etude des aptitudes probiotiques des souches lactiques	37
8.1. Teste d'antibiotique	37
Résultats et discussion	
1. Isolement des bactéries lactiques	40
1.1. Dénombrement	40
1.2. Isolement des bactéries lactiques	42
2. Identification des isolats lactiques	44
2.1. Caractérisation macroscopique	44
2.2. Purification des isolats	45
2.3. Observation microscopique	46
2.4. Résultats des testes physiologiques et biochimiques	47
2.5. Identification des isolats par API 50 CHL	51
3. Recherche des souches lactiques productrices des agents antimicrobiens	53
3.1. Nature de l'agent inhibiteur	55
3.1.1. Inhibition due à l'acidité	56
4. Caractérisation de l'agent inhibiteur	59
4. 1. Effet bactéricide ou bactériostatique	59
5. Résistance aux antibiotiques	60
Conclusion	65
Références bibliographiques	
Annexe	

Introduction

Introduction

Introduction

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes très répandus dans la nature, Présents dans le sol, sur les plantes, ils jouent un rôle important dans notre santé car elles constituent une grande partie de notre flore intestinale et tapissent les muqueuses nasales, buccales et vaginales ce qui aide à nous protéger des germes pathogènes envahissants. Les bactéries lactiques sont utilisées depuis des siècles pour fermenter les aliments. Ils sont largement offerts avec un grand intérêt pour la biotechnologie. Considérées comme inoffensives pour l'homme, leur utilisation est courante dans le monde entier pour la fabrication de produits laitiers fermentés (fromage, yaourt, etc...). **(Belarbi,2011).**

Elles sont utilisées dans plusieurs domaines, tels que l'industrie pharmaceutique, l'alimentation, l'alimentation animale et la bioconservation, et plus utilisées dans l'Industrie laitière. **(Kassas, 2017).**

L'utilisation de cette bactérie dans la fermentation des produits laitiers est importante pour améliorer la digestibilité et/ou prolonger la durée de vie des produits laitiers fermentés. L'une des principales propriétés de ces bactéries est la production de substances antimicrobiennes telles que des bactériocines, des peptides ou des composés non protéiques de faible poids moléculaire (acides organiques, H₂O, ...etc) qui inhibent la croissance des pathogènes d'intoxication alimentaire et des micro-organismes de détérioration. Les micro-organismes qui possèdent ces propriétés sont appelées probiotiques.

Le terme probiotique, dérivé du mot grec « bios », signifiant vie, est né au milieu du siècle dernier de la constatation que certains micro-organismes ont un effet positif sur la flore intestinale **(Benreguiég, 2015)**. Ce sont généralement des espèces bactériennes appartenant à *Bifidobacterium*, *Enterococci* et certains *Escherichia coli*, *Lactococcus*. Les eucaryotes inférieurs tels que les *lactobacilles*, les *streptocoques* et les *Saccharomyces*. Ces espèces agissent sur la composition du microbiote et ont divers effets positifs sur l'hôte, dont, entre autres, l'élimination des agents pathogènes, l'exercice de propriétés anti-inflammatoires et la modulation du système immunitaire. **(Muriel, 2013).**

Actuellement, les chercheurs travaillent à découvrir des souches de bactéries lactiques qui ont la capacité de sécréter de nouvelles substances qui inhibent les pathogènes, en les isolant de produits fermentés de manière traditionnelle, comme les produits laitiers de fabrication traditionnelle.

Introduction

L'objectif de ce travail est d'étudier certaines propriétés bénéfiques de bactéries lactiques isolées à partir de produits laitiers traditionnels (Lben, Zebda, klila) de la région de Saida et Tiaret.

Dans notre recherche, nous avons d'abord traité une synthèse bibliographique composée de deux chapitres: le premier chapitre: présentant des informations générales sur les bactéries lactiques, le deuxième chapitre: des informations générales sur les probiotiques et les produits laitiers traditionnels (Lben, Zebda, Klila, Rayeb, Dhan, Jben).

La deuxième partie reporte la description du protocole expérimental en plusieurs étapes en exposant les techniques utilisées pour la réalisation de ce travail : identification par la galerie API 50 CH, croissance à différentes températures, croissance à différents pH, étude de la thermorésistance, recherche du pouvoir inhibiteur et teste antibiogramme.

La troisième partie portera l'interprétation des résultats et leur discussion et enfin une conclusion.

Synthèse
bibliographique

Chapitre I

Les bactéries

lactiques

I. Bactéries lactiques

I.1. Définition

Les ancêtres de BL, qui sont d'anciens micro-organismes, pourraient remonter à trois milliards d'années. (Kassas, 2017). À la fin des années 1800, période marquée par de nombreuses percées microbiologiques, le groupe de bactéries lactiques, également connu sous le nom de LAB, a été officiellement identifié. Le groupement a été classé plus précisément en 1919 par Orla-Jensen, qui a combiné divers genres partageant la capacité commune de fermenter les glucides et de produire de l'acide lactique (Zergoug, 2017).

Ce sont des espèces bactériennes possédant une paroi cellulaire Gram positive et prenant la forme de coccal ou de bacillaire sont connues pour être immobiles, asporogènes, anaérobies avec aérotolérance et manquent de certaines enzymes comme la catalase, le cytochrome oxydase et la nitrate réductase (certaines peuvent avoir une pseudocatalase). Ces micro-organismes ont besoin de glucides fermentes cibles pour soutenir leur croissance et générer de l'énergie en décomposant les sucres (Boussekine, 2022).

Lorsque l'acide lactique est le seul produit final, il s'agit d'une bactérie lactique homofermentaire (certaines espèces produisent au moins 18 moles d'acide lactique par mole de glucose fermenté). Parfois, en plus de l'acide lactique, d'autres composés principalement composés d'acide acétique, d'éthanol et de dioxyde de carbone sont produits : c'est le cas de l'hétérofermentation (seule 1 mole d'acide lactique est produite par mole de glucose fermenté) (Bekhouche, 2006).

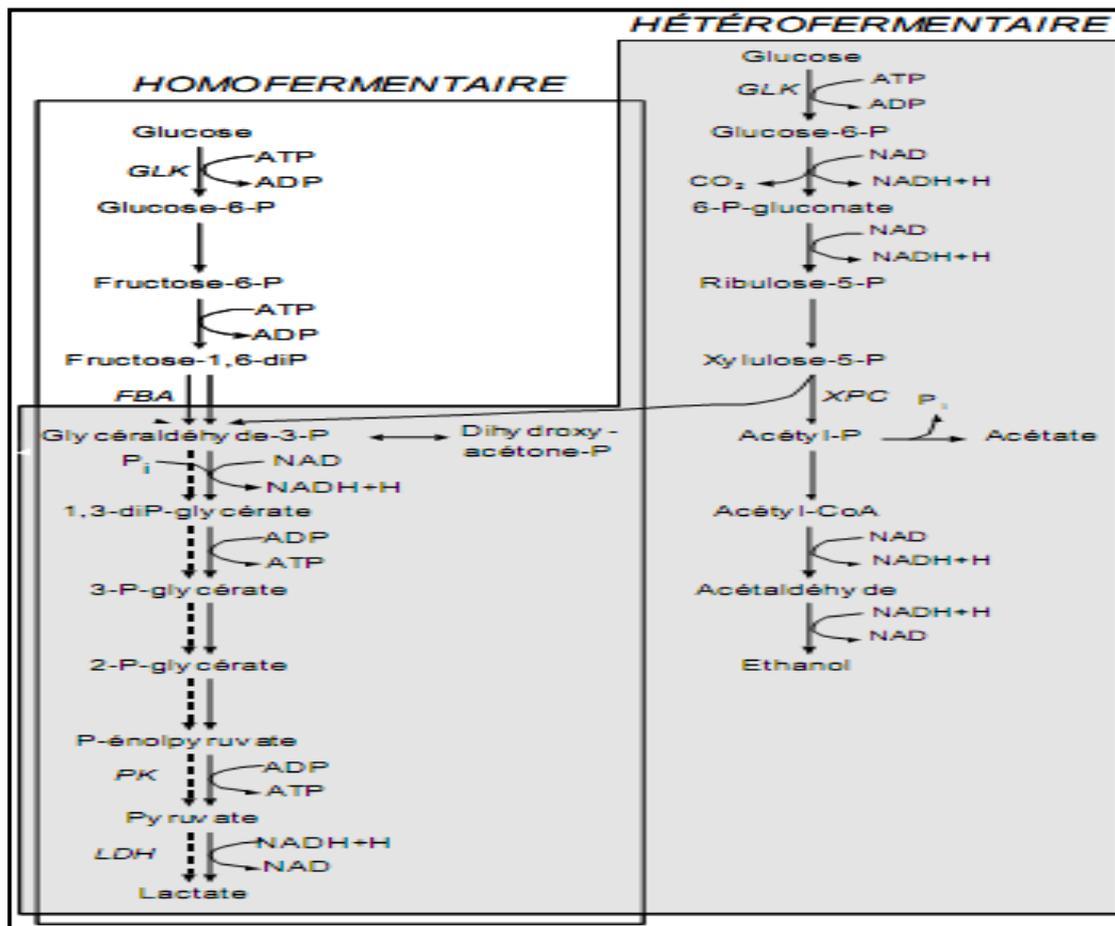


Figure 01. Voies fermentaires de la dégradation du glucose (Atlan et al., 2008). [GLK : glucokinase, FBA : fructose-1,6- bisphosphate aldolase, XPC : xylulose-5-phosphate phosphocétolase, PK : pyruvate kinase, LDH : lactate déshydrogénase].

I.2. Habitat

Les bactéries lactiques sont des bactéries ubiquitaires qui existent dans différents environnements et sont capables de se développer sur différents substrats à part le lait (Patrick, 2001). Leur présence est dans de nombreux milieux naturels, chez les végétaux (plantes et fruits), les animaux et les humains (oralet vaginal, fèces et lait). Mais certaines espèces semblent tellement adaptées à des environnements spécifiques qu'elles ne peuvent guère être trouvées ailleurs que dans leur habitat naturel (Bekhouche, 2006). Il convient également de noter que le LAB fait partie de la flore microbienne naturelle de la bouche, de l'intestin et du vagin de l'homme et de nombreux animaux endothermiques (Achemchem, 2014).

Cependant, les bactéries lactiques ont la capacité de vivre en symbiose entre elles et avec l'hôte. Une symbiose est un lien intime et durable entre deux organismes xénospécifiques

(espèces différentes), parfois plus que cela. Le tractus gastro-intestinal des mammifères est colonisé par des bactéries lactiques (*Bifidobacteria*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Weissella*). Cependant, l'appareil reproducteur féminin est principalement colonisé par *Lactobacillus*, auxquelles il apporte des nutriments tels que le glycogène. En acidifiant l'environnement, ces bactéries protègent contre les agents pathogènes qui causent des infections vaginales, comme *Trichomonas vaginalis*, qui provoque trichomonase vaginale et vulvovaginite causée par *Candida albicans* (Zergoug, 2017).

I.3. Classification

Historiquement, ce groupe comprenait *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus*, mais les principaux genres de BL importants dans la technologie alimentaire comprennent également *Aerococcus*, *Carobacter*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Tetradenococcus*, *Labyrinthococcus*, *Weissella* et *Bifidobacterium* (Axelsson, 2004).

La taxonomie s'est longtemps basée sur des critères morphologiques et biochimiques pour distinguer les espèces et caractériser les variants au sein d'une même espèce. Ces épreuves sont :

- résistance aux bactériophages.

Des recherches basées sur des :

- Type de Gram, morphologie et arrangement cellulaire.
- Métabolisme différent des glucides, des protéines et des lipides, propriétés fermentaires.
- Les cellules se développent sur des milieux hostiles.
- Ainsi que la synthèse d'enzymes (protéases), de métabolites (exopolysaccharides), de bactériocines et de critères moléculaires ont ensuite permis de classer les espèces selon les critères suivants :
- La détermination de la composition en peptidoglycane (PTG) permet de visualiser le type d'espèces en fonction de la nature des liaisons peptidiques.
- La composition de l'ADN mesuré par hybridation permet de distinguer genre et espèce. (Schleifer *et al.*, 1985; Schleifer, 1986; Farrow *et al.*, 1989).

Elles appartiennent à la lignée des Firmicutés, à la classe des Bacilli et l'ordre des Lactobacillales (Garrity et Holt, 2001).

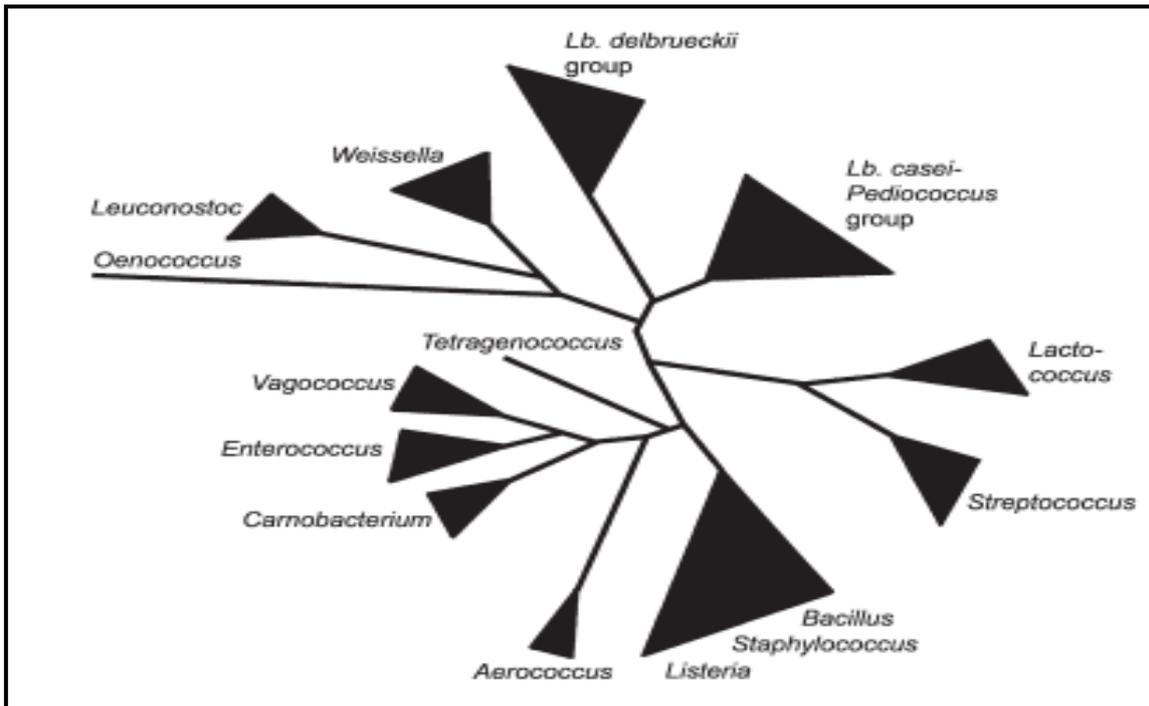


Figure 02 : Arbre phylogénétique des bactéries lactiques et genres apparentés.
(Axelsson, 2004).

Tableau 01. Les différents genres des bactéries lactiques.

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

I.4. Principaux genres des bactéries lactiques

I.4.1. *Lactococcus* :

Sphériques ou ovales, en paires ou en chaînes. Dans le type mésophile, leur température optimale se situe entre 10 et 40°C, mais elles ne peuvent pas se développer à 45°C. Ils poussent généralement à 4 % de NaCl et à un pH proche de la neutralité, et leur croissance s'arrête lorsque le pH du milieu atteint 4,5 (Zergoug, 2017).

Les souches de *Lactococcus lactis* sont fréquemment utilisées dans la fabrication de produits laitiers pour leurs propriétés acidifiantes et productrices de saveurs et d'arômes. En fermentant le lait, elles confèrent au produit fini des propriétés organoleptiques spécifiques et permettent une conservation plus longue (Drouault et al., 1999).

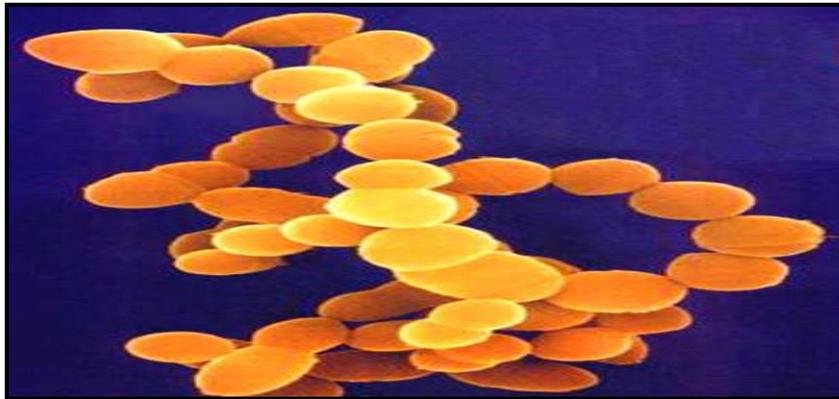


Figure 03 : *Lactococcus* (Khater et Ghfar, 2017).

I.4.2. *Lactobacillus* :

Le genre *Lactobacillus* est largement utilisé dans l'industrie alimentaire et la nutrition humaine en raison de sa fonction cruciale dans la conservation et la fermentation de divers aliments, ainsi que de leurs caractéristiques probiotiques. Les *lactobacilles* sont responsables de la production de diacétyle et d'amines, qui contribuent à la saveur des aliments fermentés. Ils jouent également un rôle déterminant dans le processus de fermentation d'un large éventail d'aliments, notamment les produits laitiers, la viande, les produits de la pêche, l'ensilage et la choucroute, ainsi que les boissons, comme l'ont indiqué König et al., en 2009. Selon (Siegumfeldt et al., 2000), les *lactobacilles* présentent généralement une plus grande résistance au stress acide que les *Lactocoques*. Cela peut être attribué à l'optimum de pH inférieur de l'enzyme responsable de la régulation du pH intracellulaire chez les *lactobacilles*,

qui transloque les protons via un mécanisme ATPase. Le métabolisme du sucre chez *Lactobacillus* est soit homofermentaire, soit hétérofermentaire. Il convient de noter que des souches particulières du microbe peuvent être thermophiles ou mésophiles (Mami et Kihal, 2019).

Tableau 02 : Principales espèces et sous espèces de lactobacilles utilisées en industrie laitière.

Lb : *Lactobacillus*. (Kandler et al., 1986).

Espèces	Fermentation du lactose	Croissance		
		A 15°C	A 45°C	
<i>Lb. Helveticus</i>	Homofermentaire	-	+	Thermophile
<i>Lb. delbruekii subsp bulgaricus</i>		-	+	
<i>Lb. delbruekii subsp lactis</i>		-	+	
<i>Lb. acidophilus</i>		-	+	
<i>Lb. Casei</i>	Hétérofermentaire	+	-	Mésophile
<i>Lb. Plantarum</i>		+	-	
<i>Lb. Kefiri</i>		+	-	
<i>Lb. Brevis</i>		+	-	Thermophile
<i>Lb. Fermentum</i>		-	+	

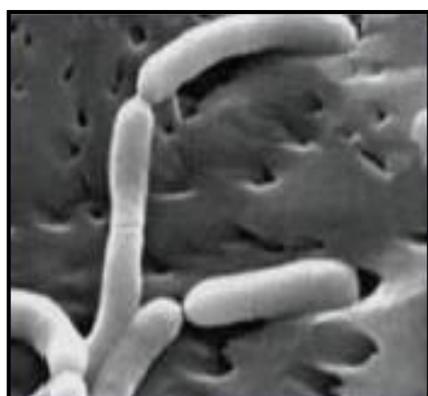


Figure 04 : *Lactobacillus bulgaricus* (à gauche) et *Lactobacillus casei* (à droite), observés au microscope électronique (G x 10 000) (Mami et Kihal, 2019).

I.4.3. *Streptococcus*:

Le genre *Streptococcus* est principalement composé d'espèces d'origine humaine ou animale, certaines étant pathogènes, telles que *S.pyogenes* et *S.agalactiae*. D'autres espèces, telles que *S.mutans*, contribuent à la formation de la plaque dentaire. Ces espèces ne se trouvent généralement pas dans les aliments. *Streptococcus thermophilus*, d'autre part, est la seule espèce de streptocoque utilisée dans la technologie alimentaire. Elle se caractérise par son habitat dans le lait et les produits laitiers et son caractère non pathogène (**Bendi Hadji et Bensalah, 2021**).

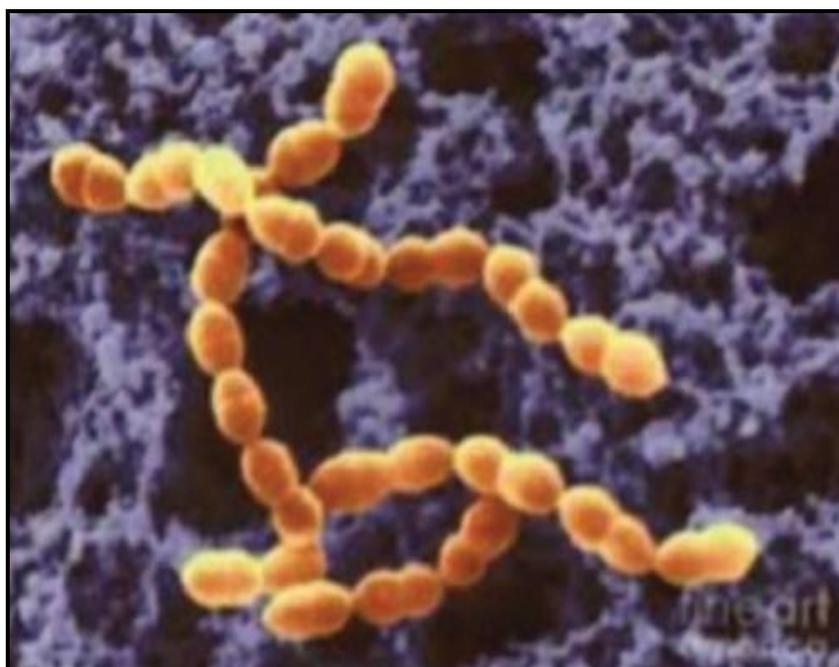


Figure 05 : *Streptococcus* (**Bendi hadji et Bensalah, 2021**).

I.4.4. *Leuconostocs*:

La famille des *leuconostocaceae*, contient des coques ovoïdes, pouvant être allongés ou ovoïdaux. Ce sont des cellules sphériques détiennent en paire ou en chaîne, elles sont particularisées par un métabolisme hétérofermentaire en convertissant le glucose en D-lactate et éthanol ou en acide acétique par la survenue de transcétolase, elles sont incapables de dégrader l'arginine ce qui à eux distinguent des *lactobacilles* hétérofermentaires (**Gonzalez et al., 2007**).

Ce genre comprend dégrader suivantes : *Ln. mesenteroides* avec ces sous espèce *mesenteroides*, *cremoris* et *dextranicum* et *Ln. Lactis* et *Ln. Pseudomesenteroides* et *Ln.Paramesenteroides* (**Abdelmoumene, 2015**).

I.4.5. *Entérocooccus*:

Les cellules sont ovoïdes, isolées par paires ou en courtes chaînes, avec une homofermentase. Certaines espèces sont mobiles avec de petits flagelles, tandis que d'autres sont des pseudocatalases. Le genre se caractérise par une tolérance à 6,5% de NaCl, un pH de 9,6 et un intervalle de températures de 10°C à 45°C, avec un intervalle de croissance optimale de 35°C à 37°C (Zergoug, 2017).

I.5. Intérêt des bactéries lactiques

Il y a un rôle important des bactéries lactiques dans l'industrie alimentaire et le domaine de santé.

I.5.1. Domaine alimentaire :

I.5.1.1. Rôle sur la structure et la texture :

Les laits fermentés, selon les bactéries lactiques présentes, l'acidification provoque la création d'un caillé plus ou moins ferme. La texture souhaitée peut être ferme (yaourt ferme) ou onctueuse (yaourt brassé, kéfir). Pour atteindre une consistance spécifique ; Les souches productrices de polysaccharides peuvent être utilisées avec les souches plus ou moins acidifiantes. (Boumediene, 2013).

I.5.1.2. Rôle dans la conservation:

- **Production d'acide lactique :** Les bactéries lactiques jouent un rôle important dans l'inhibition de la flore non laitière. (Bougaddima et Sebaha, 2019).
- **Production de bactériocines :** Ces peptides antimicrobiens sont synthétisés à partir d'un très grand nombre de souches bactériennes lactiques et sont généralement résistants à la chaleur (Bougaddima et Sebaha, 2019).

I.5.1.3. Rôle sur les caractéristiques organoleptiques :

En plus de l'acide lactique, d'autres produits tels que le diacétyl et l'acétaldéhyde sont également produits, qui sont responsables du goût caractéristique (Boudjema, 2008).

I.5.2. Domaine de santé :

La valeur des ferments lactiques pour la santé humaine a été suggérée pour la première fois au début du siècle, en 1907, par un Russe du nom de Metchnikoff, qui affirmait que *Lactobacillus* sp pouvait réduire la putréfaction intestinale en altérant la microflore intestinale.

Le rôle des bactéries lactiques dans la santé a été discuté dans le contexte des probiotiques. Les bienfaits des ferments lactiques sont de plus en plus étudiés, certains confirmés, d'autres incontestés :

- Améliore la digestion du lactose.
- Traiter certaines infections ou diarrhées.
- Abaissement du cholestérol sérique et déconjugaison des sels biliaires.
- Utilisation dans le développement de vaccins (**Calvez et al., 2009**).

Chapitre II

Les probiotiques

II. Probiotiques

II.1. Définitions

Le terme probiotique est dérivé de deux mots grecs "pros" et "bios" qui signifient littéralement "pour la vie". (**Jennifer et al., 2016**), proposé pour la première fois par Parker en 1974, pour désigner les micro-organismes et les substances qui contribuent au maintien de l'équilibre des bactéries intestinales. Puis **Veller (1991)** a redéfini les probiotiques comme suit: « Ce sont des préparations microbiennes vivantes, utilisées comme additifs alimentaires, qui ont un effet positif sur l'animal hôte en améliorant la digestion et l'hygiène intestinale. (**Benreguieg, 2015**).

En 2002, les bactéries probiotiques ont été définies par la FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) comme étant des « micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, exercent un effet bénéfique sur la santé de l'hôte ». (**Jennifer et al., 2016**).

Selon **Christophe et François (2007)**, les probiotiques sont des bactéries ou des levures qui modulent la multiplication bactérienne dans l'intestin. Les plus connus sont *Lactobacillus* et *Saccharomyces cerevisiae*. Ils sont largement utilisés comme compléments alimentaires et comme médicaments dans le traitement et la prévention de la diarrhée.

II.2. Les aliments probiotiques (produits laitiers traditionnel)

II.2.1. Lben:

L'origine du lait remonte à long temps, peut-être lorsque les humains ont commencé à connaître les types de produits laitiers et à utiliser leur lait. La fermentation lactique lui confère un arôme naturel et une saveur comparable (**Assamala Marthe, 2015**).

Lben est un lait écrémé ayant subi une fermentation lactique, l'acide lactique résultant provenant du clivage de la molécule de lactose par l'action des lactobacilles. Qui possède la propriété, lorsqu'il est formé en excès, de faire coaguler la caséine du lait. Cette coagulation est plus active là où la température ambiante est plus élevée. (**Matallah, 2017**).

Lben est composé de lait frais de vache ou de chèvre, qui est laissé à température ambiante pendant 24 à 48 heures jusqu'à ce qu'il soit caillé, puis baratté pendant 30 à 40 minutes. De l'eau chaude ou froide peut être ajoutée pendant le processus de barattage, en fonction de la

température ambiante. , afin de faciliter la collecte des grains de beurre. (**Bouguerrouja et al., 2019**).

II.2.2.La Klila ou Caséine desséchée :

La Kalila est un fromage fermenté produit expérimentalement dans plusieurs régions d'Algérie, qui est fabriqué en chauffant du lait caillé (55 à 75 °C) jusqu'à ce qu'il coagule.

Puis il est distillé au torchon et séché naturellement à l'air. Le fromage obtenu est consommé frais, après séchage ou utilisé comme ingrédient après réhydratation dans des préparations culinaires traditionnelles. (**Bouguerrouja et al., 2019**).

II.2.3.Rayeb:

Le rayeb est l'un des produits laitiers fermentés populaires en Algérie, il est fabriqué en ajoutant une petite quantité de leben (lait fermenté écrémé) au lait et on le laisse cailler. Celle-ci se fait à température ambiante et dure de 24 à 48 heures selon la saison. . Le Rayeb a une tradition ancienne en Algérie, il est fabriqué à partir de lait cru de vache ou de chèvre. La fermentation du lait est un processus traditionnel, automatique, non supervisé et peut être une source précieuse de probiotiques. (**Assamala Marthe, 2015**).

Le raybe ne subit pas le processus d'agitation et d'écémage comme le beurre (lben), c'est du lait entier fermenté

II.2.4.Zbeda Arbi (Le beurre) :

Le Faire du beurre avec des quantités de concentré de matières grasses dans le raybe : C'est le processus de barattage. (**Caste, V, 2004**).

Le barattage se fait dans une gourde traditionnelle ou autre en peau de chèvre, la matière première est le rayab, et la séparation de le rayabe donne deux produits Zebda et lait caillé. Ensuite Zebda est lavé et maintenu à une température de 2 à 4 degrés°C. (**Kont, 1999**).

II.2.5.Dhan:

C'est une produit extraite du lait de vache, et elle porte plusieurs noms, comme Dhan al-hayal et Dhan al-hour et aussi semen al-har ces noms sont répandus en Algérie et au Maroc.

Dhan c'est la Zebda ou Smen qui est lavé, salé et malaxé, puis conditionné dans des pots en terre cuite fermés hermétiquement et entreposés dans un endroit frais et obscur à température ambiante. Il se conserve d'un à deux ans. (Djimli et al., 2019).

Dhan est le meilleur produit extrait du lait de vache à haute valeur nutritive. Il est utilisé dans le traitement de certaines maladies telles que l'asthme et la toux.

II.2.6.Jben:

Le jben est un fromage frais traditionnel dont la préparation est basée sur la coagulation du lait cru (coagulation enzymatique). (Matallah ,2017). Dans lequel du lait cru entier de vache a été pasteurisé à 65°C/30 minutes, puis caillé à 45°C par ajout de présure végétale. Qui est obtenu par extraction à l'eau diffusée de fleurs d'artichaut dans un rapport de 5% (5 ml d'extrait pour 100 ml de lait). Le caillé a été placé dans des moules perforés pour égoutter. De plus, nous avons préparé le fromage à l'aide de levain lactique, thermophile et d'extrait de fleur d'artichaut. (Mennane, et al., 2007).

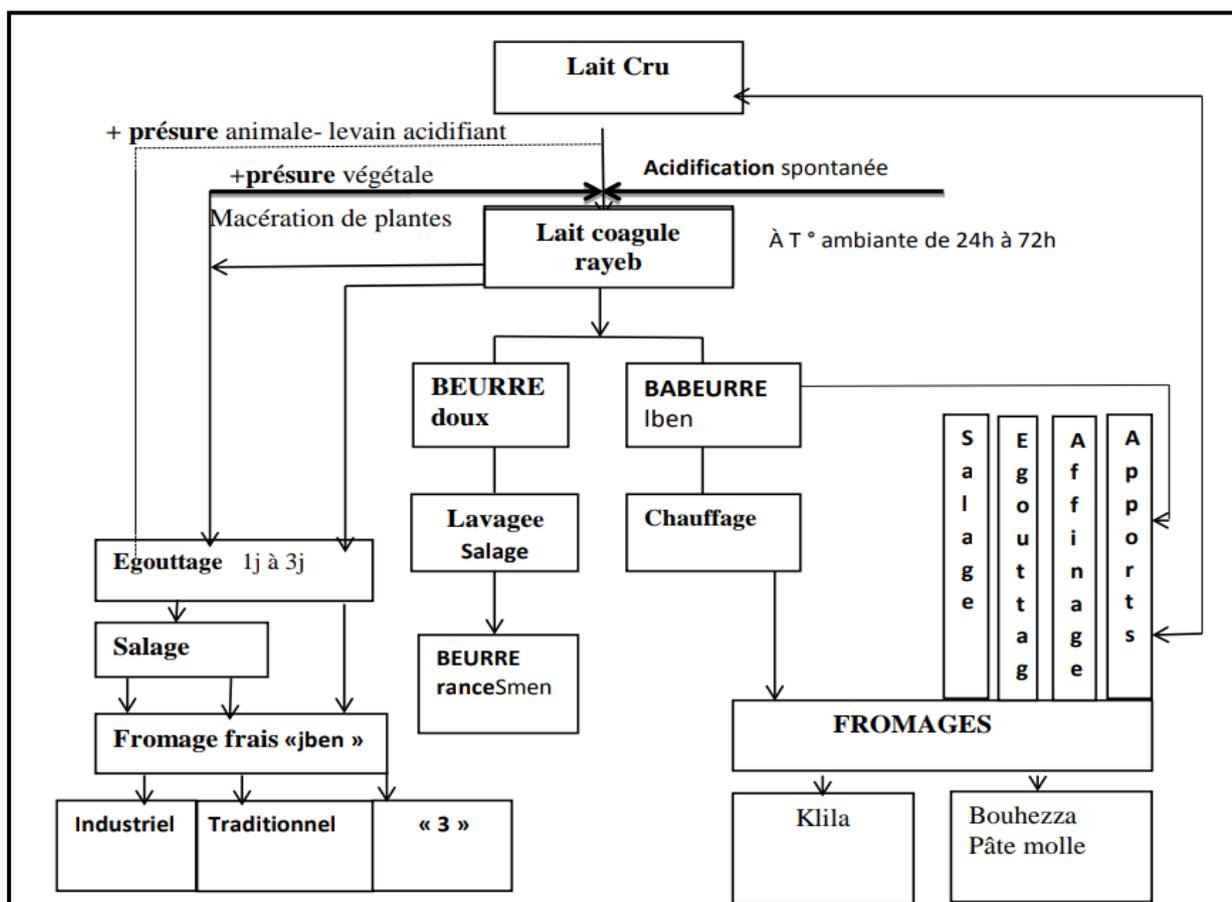


Figure06 : Schéma des méthodes de fabrication des principaux produits laitiers algériens (Khateret Ghedar 2017).

II.3.les principaux probiotiques

Les principaux microorganismes probiotiques qui sont utilisés appartiennent principalement aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. Bien que des autres espèces des genres *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Propionibacterium*, *Streptococcus* et *Saccharomyces* (Belhamra, 2017).

Tableau 03 : Exemple de micro-organismes probiotiques études (Benreguieg, 2015).

Genre	Espec
<i>Lactobacillus</i>	<i>L.Acidophilus</i>
	<i>L.Rhamnosus /GG</i>
	<i>L.Reuteri</i>
	<i>L.Bulgaricus</i>
	<i>L.Lactis</i>
<i>Befidobacterium</i>	<i>B.Bifidum</i>
	<i>B.Breve</i>
	<i>B.Infantis</i>
	<i>B.Langum</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>S.Thermophilus</i>
<i>Sachromyces</i>	<i>S.Boulardii</i>

II.3.1.Genre *Lactobacillus*:

Lactobacillus est le genre le plus utilisé en industrie alimentaire et la nutrition humaine, car les *lactobacilles* sont considérés comme des probiotiques et ils jouent un rôle important dans la conservation et la fermentation des aliments (choucroute, fourrage, produits laitiers et de viande ainsi que les produits du poisson) et des boissons (Kassas, 2017). **Figure 07.**

II.3.2.Genre *Streptocoque*:

La seule espèce de streptocoques qui soit utilisée en technologie alimentaire est *Streptococcus thermophilus*. Elle se différencie par son habitat (lait et produits laitiers) et son caractère non pathogène. La résistance à la température, la capacité de croître à 52°C et le nombre limité des hydrates de carbone permettent de distinguer les *S.thermophilus* de la plupart des autres *streptocoques* (Abdelali et Bouhali, 2021). **Figure 08.**



Figure 07: *Lactobacillus Bulgaricus*

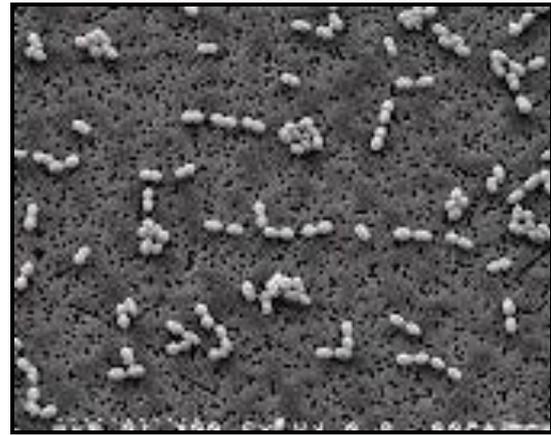


Figure 08: *Streptococcus thermophilus*

<http://lelabodanissa.blogspot.com/2015/02/chapitre-1-la-contamination-par-les.html?m=1>

II.3.3. Genre *Bifidobacterium*:

Généralement un pH idéal pour la croissance entre 6,5 et 7 et une température entre 37°C et 41°C. Ils ont une forme en V irrégulière ou une forme en Y bifide. (Abdulali et Buhali, 2021).

Bifidobacterium est un bacille présent dans la flore intestinale du nouveau-né Il est utilisé dans certains yaourts (probiotique). Le facteur bifidogène présente dans Sa bactérie peut provoquer un effet anti-infectieux au niveau de l'intestin.

Les *Bifidobactéries* sont des organismes anaérobies stricts qui fermentent activement les glucides pour produire de l'acide acétique ou lactique (Ariech, 2020). **Figure 09.**

II.3.4. Genre *Sachromyces*:

La variété *Boulardii Saccharomyces cerevisiae* se caractérise par sa grande tolérance aux pH acides et sa capacité à croître à 37°C.

Le Dr Henri Poulard (microbiologiste français) lors de son voyage en Indochine a remarqué que les habitants utilisaient une décoction d'écorce de litchi et de mangoustan pour traiter les symptômes de la diarrhée causée par la bactérie *Vibrio cholerae*. Il procéda à une analyse microbiologique grâce à laquelle Henry Poulard put découvrir une levure capable de se développer à haute température qu'il nomma : *Saccharomyces boulard*. **Figure 10.**

Cette levure peut être comparée à la levure de *Saccharomyces cerevisiae* morphologiquement et physiologiquement, mais sa classification fait encore débat. Là où certains auteurs la considèrent comme une souche de *Saccharomyces cerevisiae* tandis que d'autres la voient comme une espèce actuellement distincte, les données de la littérature sur la recherche ADN

placent cette levure comme un groupe diversifié de *Saccharomyces cerevisiae* (Benjamin, 2016).

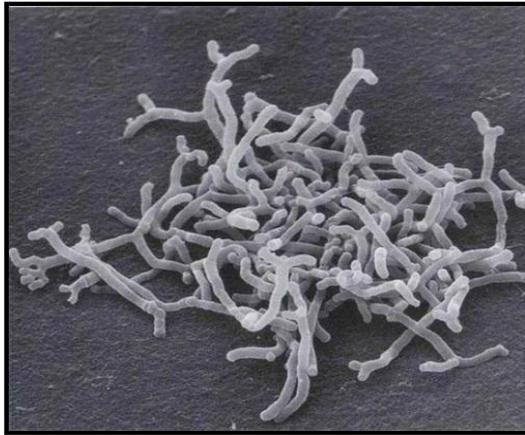


Figure 09: *Bifidobacterium Longum*.

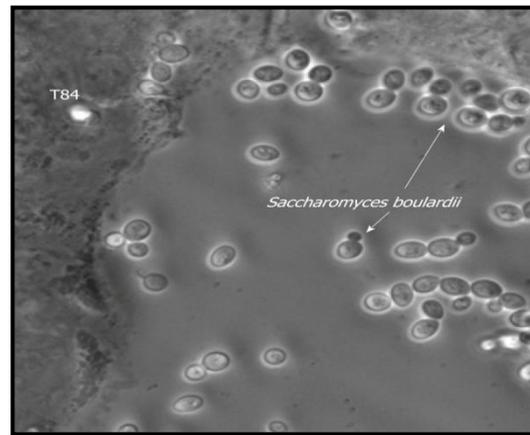


Figure10: *Saccharomyces boulardii*

<https://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v25/i18/WJG-25-2188-g001.htm>

<https://m.indiamart.com/proddetail/bifidobacterium-longum-19237967948.html>

II.4.l'importance des probiotiques

Les probiotiques font partie de notre quotidien car on les retrouve dans des aliments comme le yaourt, le lait fermenté, les légumes, les céréales, le germe de blé, la levure de bière ou encore le kéfir. Elle a un intérêt thérapeutique pour modifier, améliorer ou renforcer la flore intestinale. Les probiotiques affectent la microflore intestinale en augmentant le nombre de bactéries anaérobies bénéfiques et en diminuant le nombre de micro-organismes pathogènes. Les probiotiques influencent l'écosystème intestinal en stimulant les mécanismes immunitaires des muqueuses, en interagissant avec les microbes commensaux ou pathogènes. (Lou Le ,2022).

II.4.1.Indication aux probiotique :

II.4.1.1.Maladies inflammatoires et troubles intestinaux :

Les maladies intestinales inflammatoires, telles que la pochite et la maladie de Crohn, ainsi que le syndrome du colon irritable, peuvent être causés ou aggravés par des altérations dans la flore intestinale incluant l'infection .Il y a de nouveaux champs d'investigation, bien qu'il soit prématuré d'affirmer que les probiotiques agissent efficacement dans ces conditions. Selon certaines études, les probiotiques pourraient jouer un rôle dans la thérapie et la prophylaxie et

des combinaisons de souches pourraient avoir un rôle à jouer dans le traitement thérapeutique. (Françoise, 2001).

Une étude randomisée, contrôlée en double aveugle a évalué les effets de *Lactobacillus GG* dans le traitement du SCI chez 52 enfants âgés de 7 ans en moyenne. Ces enfants ont été répartis équitablement en deux groupes: “probiotique” et “témoin”. Pendant 4 semaines, le groupe “probiotique” a reçu 10 UFC/jour de *Lactobacillus GG* sous forme de capsule alors que le groupe “témoin” a reçu un placebo sous forme de capsule. L'évaluation de la douleur a été mesurée dans les deux groupes. Dans l'ensemble, l'utilisation de *Lactobacillus GG* à une dose de 100 UFC/jour pendant 4 semaines a réduit la sévérité de la douleur et amélioré la qualité de vie des enfants atteints du SCI (Benjamin, 2016).

II.4.1.2. Diarrhée du voyageur:

Selon une méta-analyse de 2005, qui a confirmé que toutes les souches sont efficaces pour prévenir la diarrhée du voyageur. Cette étude a inclus douze études et 4709 patients, dont certains ont développé une diarrhée (\geq cinq selles en 48 heures) lors d'un voyage à l'étranger (Turquie, Égypte et Mexique « destinations chaudes »). Deux à sept jours avant le voyage, le traitement probiotique a commencé avec les patients et s'est poursuivi tout au long du voyage. Les résultats ont montré une réduction de 15 % du risque de diarrhée, ce qui représente une réduction absolue du risque de 40 % à 34 % avec un NST de dix-sept (Christophe et François, 2007).

II.4.1.3. Diarrhées postantibiotiques:

Deux méta-analyses datant de 2002 ont montré que les produits alimentaires contenant du *Sb* et des *Lactobacillus (Lb)* réduisent de 60 % l'incidence des diarrhées après la prise d'antibiotiques.

Ces résultats ont été récemment confirmés par une méta-analyse de 25 études contrôlées randomisées. Celui-ci a inclus 2800 patients et a observé une prévalence de diarrhée (\geq cinq selles en 48 heures) dans les deux mois suivant l'exposition aux antibiotiques (diverses molécules). Le traitement aux probiotiques (*Sb*, *Lb*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus faecium*) variait de cinq jours à huit semaines avec une moyenne de deux semaines après le traitement antibiotique et la dose moyenne était de 3×10^9 /jour. L'incidence des diarrhées sous antibiotiques a diminué de 27% à 12%, soit une diminution de plus de moitié, ce qui correspond à un nombre

nécessaire à traiter (NNT) égal à sept. Cette analyse a également montré la supériorité de *Sb* et *Lb* sur les autres probiotiques. **(Christophe et François, 2007)**

II.4.1.4 Allergie:

Dans un essai randomisé, en double aveugle et contrôlé par placebo, *L. rhamnosus GG* administré à des femmes enceintes quatre semaines avant l'accouchement, puis à des nourrissons à haut risque d'allergie pendant six mois, a entraîné une réduction significative de la maladie atopique précoce. L'étude démontre la capacité des micro-organismes probiotiques à moduler la réponse immunitaire et à prévenir l'apparition de réactions allergiques.

Dans d'autres études cliniques chez des nourrissons allergiques au lait de vache, la dermatite atopique a été atténuée par la prise de souches probiotiques de *L. rhamnosus GG* et *B. lactisBB-12*. Les mécanismes exacts ne sont pas élucidés, mais dépendent de la capacité des *Lactobacilles* à contrer l'augmentation de la perméabilité intestinale, à améliorer les réponses IgA spécifiques à l'intestin, à améliorer la fonction de barrière intestinale en restaurant le microbiote normal et à améliorer la transformation du facteur de croissance bêta et la production d'interleukine-10 ainsi que cytokines qui favorisent la production d'anticorps IgE. **(Françoise, 2001).**

II.4.1.5. Renforce le système immunitaire:

Un essai clinique en double aveugle contre placebo comportant 25 sujets (60-83 ans) ayant consommé pendant 6 semaines du lait supplémenté ou non avec *Bifidobacterium lactis*, 1.5×10 UFC/jour montrait une sécrétion accrue d'IFNo (sang périphérique), une augmentation de la phagocytose par les polymorphonucléaires (PMN) et une activité bactericide accrue 3, 6 et 12 semaines après la fin de l'intervention.

Chez 52 volontaires sains (63 ans) recevant en 3 phases (wash in, essai, wash out) *Lactobacillus rhamnosus* (5×100 UFC/jour), l'activité phagocytaire des PMN augmentait de 15% et l'activité tumoricide NK de 70 à 150%, ces valeurs revenant lentement à l'état initial après arrêt du traitement. Bien que ces études aillent dans le sens d'un renforcement de l'immunité innée agissant comme première ligne de défense lors d'infections, très peu d'études ont analysé l'impact d'une supplémentation probiotique sur l'incidence des épisodes infectieux **(Jean, 2005).**

II.5.Mécanismes d'action des probiotiques

Les probiotiques, une fois arrivés sur leur site d'action, exercent des effets directs sur le microbiote et les cellules immunitaires. (Bougaddima et Sebaha, 2019). Plusieurs mécanismes par lesquels certains probiotiques exercent des effets préventifs ou thérapeutiques ont été proposés, mais ces modes d'action ne sont pas encore complètement élucidés. (Yahla, 2007)

.Figure 11.

Voici ci-dessous la liste non exhaustive des fonctions envisagées des probiotiques dans l'organisme. (Bougaddima et Sebaha, 2019). .

- Réduction de l'inflammation par les cytokines anti-inflammatoires, en particulier dans les maladies inflammatoires chroniques.
- Activation des macrophages locaux pour augmenter la présentation de l'antigène aux cellules B.
- Renforcement de la barrière épithéliale : augmentation de l'expression des gènes de la mucine et donc inhibition de l'adhésion des pathogènes aux cellules épithéliales.
- Production de bactériocines pour inhiber les bactéries pathogènes
- Réduction de la perméabilité intestinale grâce à la préservation du cytosquelette des cellules épithéliales.
- Inhibition de l'apoptose des cellules épithéliales et stimulation de leur croissance, ce qui renforce l'effet barrière.
- Abaisser le pH pour créer un environnement défavorable qui inhibe le développement d'E. coli et de Salmonella.
- Compétition pour les sites d'attache : en effet si des bactéries probiotiques occupent les sites de la barrière épithéliale, les bactéries pathogènes ne pourront pas s'établir.
- Inhibition de la production de toxines des bactéries pathogènes.
- Rééquilibrer la flore intestinale et le système génito-urinaire.
- Réduire et stimuler les enzymes pour améliorer la digestion des aliments et augmenter l'absorption des vitamines et des minéraux.
- Amélioration des activités enzymatiques telles que la lactase, la glycosidase et les activités de la phosphatase alcaline car les probiotiques possèdent eux même ces enzymes.
- La Modulation de système immunitaire

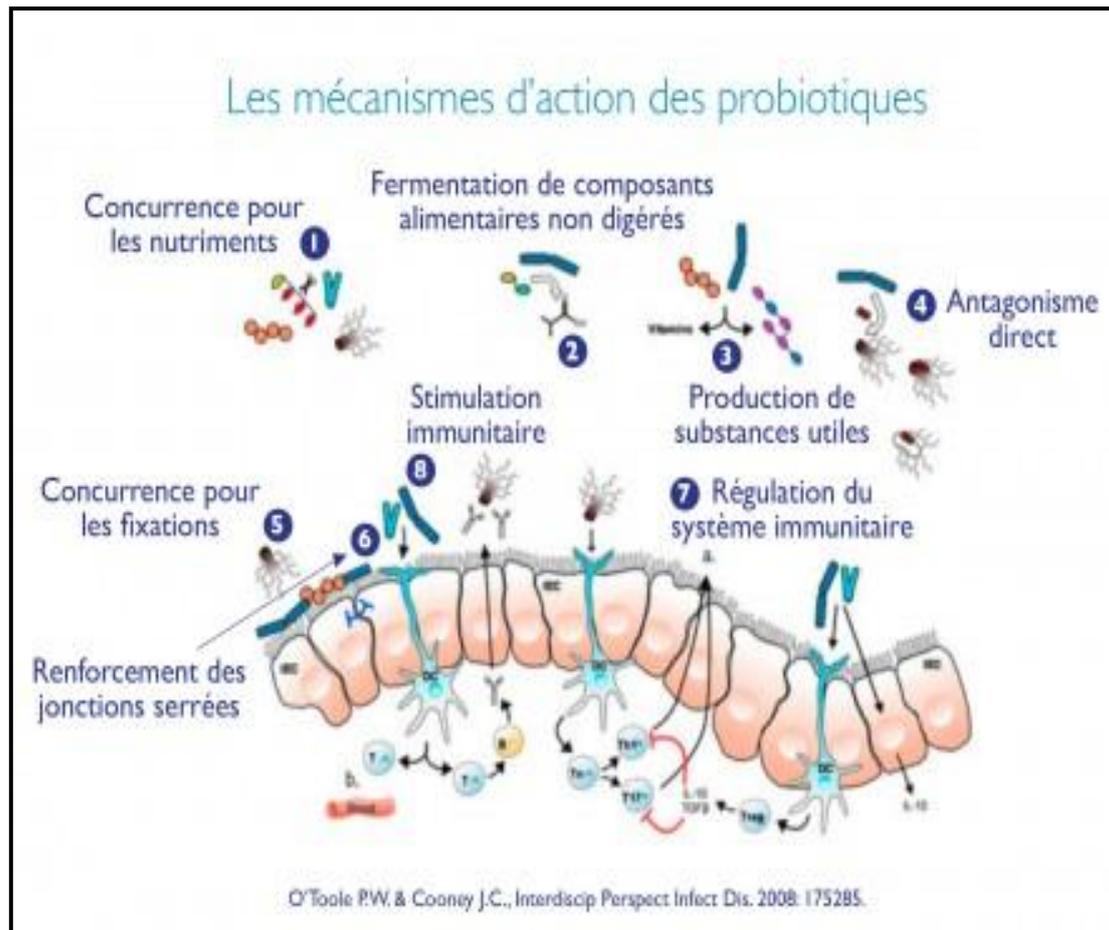


Figure 11: Les mécanismes d'action des probiotiques

<https://fr.scienceforhealth.be/mecanismes-daction/>

II.6. Critères sélectionnés des souches probiotique

L'exploitation de nouvelles souches bactériennes, espèces ou même genres qui ont potentiellement de nouvelles propriétés technologiques ou probiotiques a récemment fait l'objet d'une attention accrue. Cet intérêt pour les nouvelles souches incite à établir des critères rationnels de criblage et de sélection de microorganismes candidats, sans oublier d'évaluer l'efficacité des souches sélectionnées chez l'homme par des essais cliniques contrôlés. Ainsi, en 2002, l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'Organisation mondiale de la santé (OMS) ont établi des directives à suivre pour commercialiser un produit contenant des probiotiques (**Benjamin, 2016**).

Tableau 4.

Tableau 04: Récapitulatif des différents critères de sélection des souches probiotiques (Benjamin, 2016).

Critères de sécurité	<ul style="list-style-type: none"> • Identification taxonomique précise par des méthodes moléculaires. • Dépôt de la souche dans une collection de culture internationale. • Historique de non pathogénicité (statut QSP) • Les gènes de résistance aux antibiotiques ne peuvent pas être transmis. • • Il n'y a pas de dégradation excessive des sels biliaires. • Souche d'origine humaine de préférence.
Critères fonctionnels	<ul style="list-style-type: none"> • Tolère l'acide gastrique, la bile et les enzymes digestives. • Adhésion de cellules intestinales et/ou de mucus. • Hostilité aux agents pathogènes, production de substances antimicrobiennes et modulation immunitaire. • La capacité à produire des effets bénéfiques sur la santé (l'effet sur la santé est documenté et prouvé par des essais cliniques sur l'homme).
Critères technologiques	<ul style="list-style-type: none"> • Viabilité et stabilité pendant les processus de production et dans le produit final. • Conservation des propriétés probiotiques après production.

Partie
expérimentale

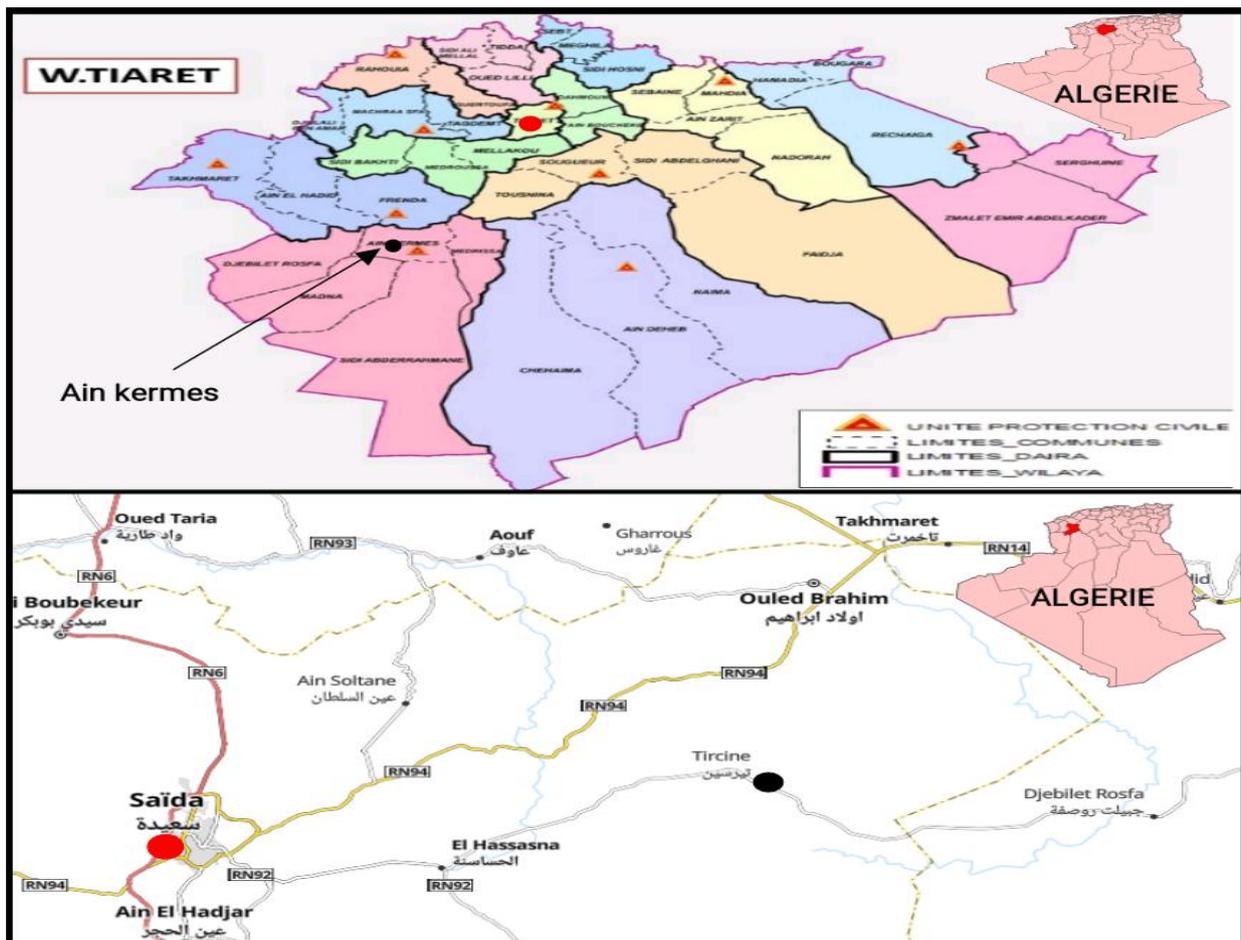
*Matériel et
méthodes*

1. Origine des échantillons et prélèvements :

Nous avons collecté quatre échantillons des produits laitiers traditionnels Algériens, qui sont Lben , Dhan (Zebda) et Kalila 1 de la région d'Awlad Bkhald, commune de Tercin, Daïra d'Awlad Ibrahim, wilaya de Saida, et un échantillon d'Al-Kalila 2 de la région de Ain kermes à Tiaret Ensuite, ils ont été transférés dans des flacons en verre stériles au laboratoire ,puis conservés à 4°C jusqu'à leur utilisation.

Tableau 05 : L'origine des échantillons.

Les échantillons	La région	La wilaya	La date
Lben	Awlad Bakhald	Saida	25/02/2023
Zebda	,commune de Tercine,		
Kalila 1	Daïra d'Awlad Ibrahim		
Kalila 2	Ain kermes	Tiaret	



Sites de prélèvement des échantillons



Figure 12: Échantillon de Lben.

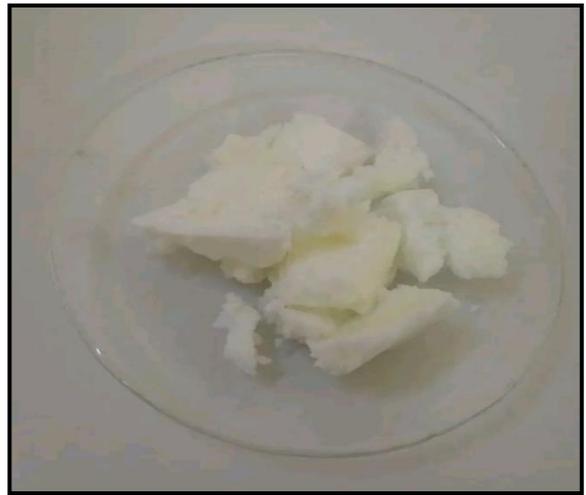


Figure 13 : Échantillon de Dhan (Zebda).



Figure 14 : Échantillon de klila1.

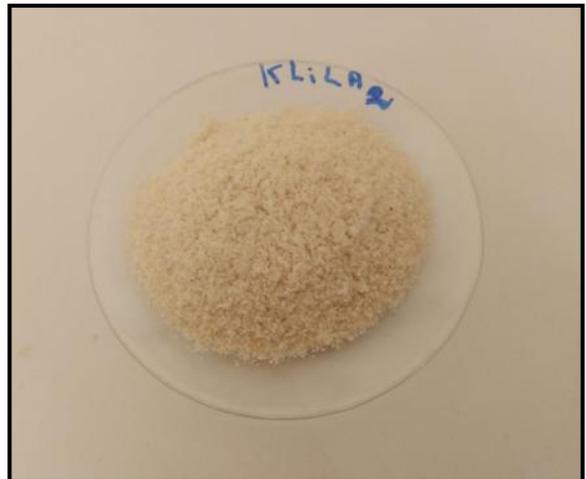


Figure 15: Échantillon de klila2.

2. Dénombrement et isolement des bactéries lactiques :

Le dénombrement est éalisée au laboratoire de microbiologie de l'Université Moulay El Taher, Saida Algérie.

Nous avons pris 1 ml de lben et 1 g d'échantillon de Kalila 1 et 2 et 1 g d'échantillon de Dhan (zebda) et nous l'avons mis dans 3 tubes contient 9 ml de solution TSE (tryptone sel eau) (**voir annexe**), pour la préparation des dilutions décimales.

Pour d'isoler les bactéries lactiques nous avons utilisé le milieu MRS et M17 (ne utilise pas pour échantillon de klila 1 et 2). Le milieu MRS a été utilisé pour réaliser le dénombrement des lactobacilles. M17 Pour l'isolement des coques lactiques (**Karam et Karam, 2006**).

Le dénombrement des LAB a été déterminé en utilisant le milieu MRS. Les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 48 h. Après incubation, les colonies ont été dénombrées et enregistrées en unités formatrices de colonies (ufc/ml). Seules les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies ont été retenues (**Khedid et al., 2009**).

Nous avons utilisé les dilutions (10^{-3} 10^{-4} 10^{-5}); prélevé 0,1 ml de chaque dilution sont ensemencé en surface de MRS et M17 et 1 ml de chaque dilution ensemencé en profondeur, puis incubé à une température de 30°C pendant 24h à 48h. .

Pour déterminer le nombre d'UFC/ml en utilisant la formule suivante :

$$UFC/ml = \text{nombre de colonies} \times 1/Ve \times 1/D$$

Ve étant le volume d'ensemencement

D étant la dilution prise en compte.

3. Identification des bactéries lactiques :

L'identification des isolats est réalisée sur la base de l'étude d'un certain nombre de caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques à l'aide des techniques classiques de la microbiologie. **Larpent (1997)** décrit toutes les techniques de reconnaissance.

3.1. Examen macroscopique :

Grâce à ce test, les colonies sur boîtes de Pétri contenant le milieu MRS et M17 sont étudiées après incubation à 37 ° C pendant 24 à 48 heures. La forme, la couleur et la taille de ces colonies sont décrites visuellement.

3.2. Examen microscopique :

Un test de coloration de Gram (**voir annexe**) est réalisé, puis chaque colonie est observée au microscope optique (au grossissement x100) afin de déterminer la caractéristique de Gram (positive ou négative), la forme des cellules et ainsi que leur mode regroupement (**Belhamra, 2017**).

3.3. Tests physiologiques et biochimiques :

3.3.1. Recherche de la catalase:

Le test a été réalisé selon le protocole décrit par **Prescott et al (2003)**. La catalase est mise en évidence en émulsifiant la culture bactérienne à tester dans 10 volumes de solution fraîche de peroxyde d'hydrogène. Le dégagement important de gaz sous forme de mousse reflète la décomposition du peroxyde d'hydrogène par l'enzyme à tester.

3.3.2. Croissance à différentes températures:

Ce test est important car il distingue les bactéries lactiques mésophiles et thermophiles. Après avoir inoculé le bouillon MRS avec une culture jeune de bactéries et incubé à 45°C pendant 24-48 h et incubé à 10°C pendant 48h à 7 jours. La croissance est appréciée par comparaison à un tube témoin du milieu non inoculé et incubé sous les mêmes conditions. Les bactéries mésophiles se développent à 10°C alors que les bactéries thermophiles ne le font pas (**Belhamra, 2017**).

3.3.3. Croissance à différents pH:

Selon le **Dr Zainab Balhamra, 2017**, nous avons pris la valeur de pH égale à 9,6 et 4,4, le bouillon MRS est inoculé dans des tubes à pH 9,6 avec une solution d'hydroxyde de sodium, et à 4,4 avec une solution d'acide chlorhydrique, avec une petite culture de bactéries lactiques et incubés à 30 °C pendant 72 heures.

3.3.4. Teste de thermorésistance:

Les tests de tolérance à la chaleur rendent la sélection possible résistante à la chaleur. Les isolats à tester avaient préalablement été distribués à Tubes à essai stériles contenant du bouillon MRS. Puis exposé à une certaine température 60°C pendant 30 minutes, puis refroidissement rapide sous un jet d'eau du robinet, Incuber à 30°C pendant 48 heures. Les résultats positifs se traduisent par un trouble (**Ayers et al., 1918**).

3.3.4. Galerie API 50chl :

L'analyse biochimique des bactéries Gram-positives, catalase- et oxydase-négatives a été réalisée par le système API bioMérieux en utilisant la galerie API 50CHL (bioMérieux, Marcy l'étoile, France). L'ensemencement et la lecture des galeries ont été effectués selon les instructions du fabricant. Ils se font comme suit :

- Cultiver des souches pures sur milieu MRS gélosé pendant 24 heures à 30°C.
- ouvrir une ampoule de milieu de suspension (2 ml), utiliser un écouvillon pour éliminer toutes les colonies de la culture et former une suspension dense dans l'ampoule.
- Ouvrir une ampoule de milieu de suspension (5ml) et atteindre une opacité égale à 2 McFarland en transférant un nombre de gouttes de la première suspension en notant le nombre de gouttes (n).
- ouvrir les ampoules de milieu API 50 CHL, ensemercer 2 fois le nombre de gouttelettes trouvées (2n), homogénéiser.
- Répartir l'API 50 CHL ainsi ensemercé dans des petits tubes et recouvrir d'huile de paraffine stérile.
- Pendant une période de 48 heures, le processus d'incubation doit être effectué en aérobiose à une température de 30°C.
- Les tests sont lus à deux intervalles de temps précis : 24 et 48 heures. Au cours de ce processus, chaque tubule est soigneusement examiné pour déterminer l'étendue de l'acidification qui s'est produite. La présence d'acidification provoque un changement de couleur du violet au jaune dans le milieu contenant du bromocrésol. Dans le cas du test à l'esculine, le changement de couleur est du violet au noir.
- Documenter les résultats qui ont été atteints.
- Le profil biochimique obtenu à partir de ce procédé peut être analysé à l'aide du logiciel d'identification APILAB, développé par bioMérieux à Marcy l'étoile, France. (Benreguieg.2015).
-

4. Conservation des isolats :

Il existe deux méthodes, à court et à long terme, pour conserver les souches pures.

4.1. Conservation à court terme :

Des souches pures de bactéries lactiques sont ensemencées sur gélose inclinée MRS, après incubation à 30 °C, et conservées à 4 °C pour une conservation à court terme. Il est nécessaire de repiquer les souches toutes les quatre semaines sur bouillon MRS (Belhamra, 2017).

4.2. Conservation à long terme :

A partir des cultures jeunes de 18h, préalablement purifiées sur milieu liquide, une centrifugation à 4000 tours/min pendant 10 min a été réalisée. Une fois les cellules récupérées et le surnageant éliminé. Le milieu de culture de conservation est additionné au culot. Le milieu de conservation contient 70% de lait écrémé (enrichie par 0.5g/l d'extrait de levure et 0.5g/l de glucose) et 30% à 40% de glycérol. Les cultures sont conservées en suspension dans des micros tubes à -20°C Pour une conservation à long terme (Zergoug, 2017).

5. Recherche du pouvoir inhibiteur:

Les souches d'indicateurs utilisées dans cette étude sont appartenent au laboratoire de la recherche de microbiologie appliquée de l'Université de Oran 1. Elles sont au nombre de quatre, deux à Gram positives et deux Gram négatives classées dans le tableau suivant :

Tableau 06 : Les souches d'indicateurs.

La souche	Gram	Catalase	Type respiratoire
<i>E.coli</i> ATCC 25922	Coccobacille G-	-	Aéroanaérobique facultatif
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Bacille G-	+	Aéroanaérobique
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Cocci en grappe de raisin G+	+	Aéroanaérobique
<i>Listeria innocua</i> CLIP 11262(ATCC BAA-680)	Coccobacilles G+	+	anaérobique facultatif

5.1. Méthode direct :

Pour mettre en évidence les zones d'inhibition, les étapes successives sont les suivantes :

1. Les souches lactiques sontensemencées en touchant la surface du milieu solide MRS issu d'une culture de 24 heures, puis les boîtes sont séchées à température ambiante pendant 2 heures. Puis incubé pendant 24 heures à 30°C.
2. Après incubation, une couche de gélose molle nutritive 0,7 (% agar) (**voir annexe**) contenant 0,1 mL de souche liquide de 18 h d'une souche indicatrice (pathogène), est versée sur la première couche de mrs agar. La lecture des boites s'effectue après 24h d'incubation à 37°C.

Les souches présentant une zone transparente sont considérées comme productrices de substances antimicrobiennes. La taille des zones d'inhibition produites a été mesurée en millimètres. (**Bellil et al. 2014**).

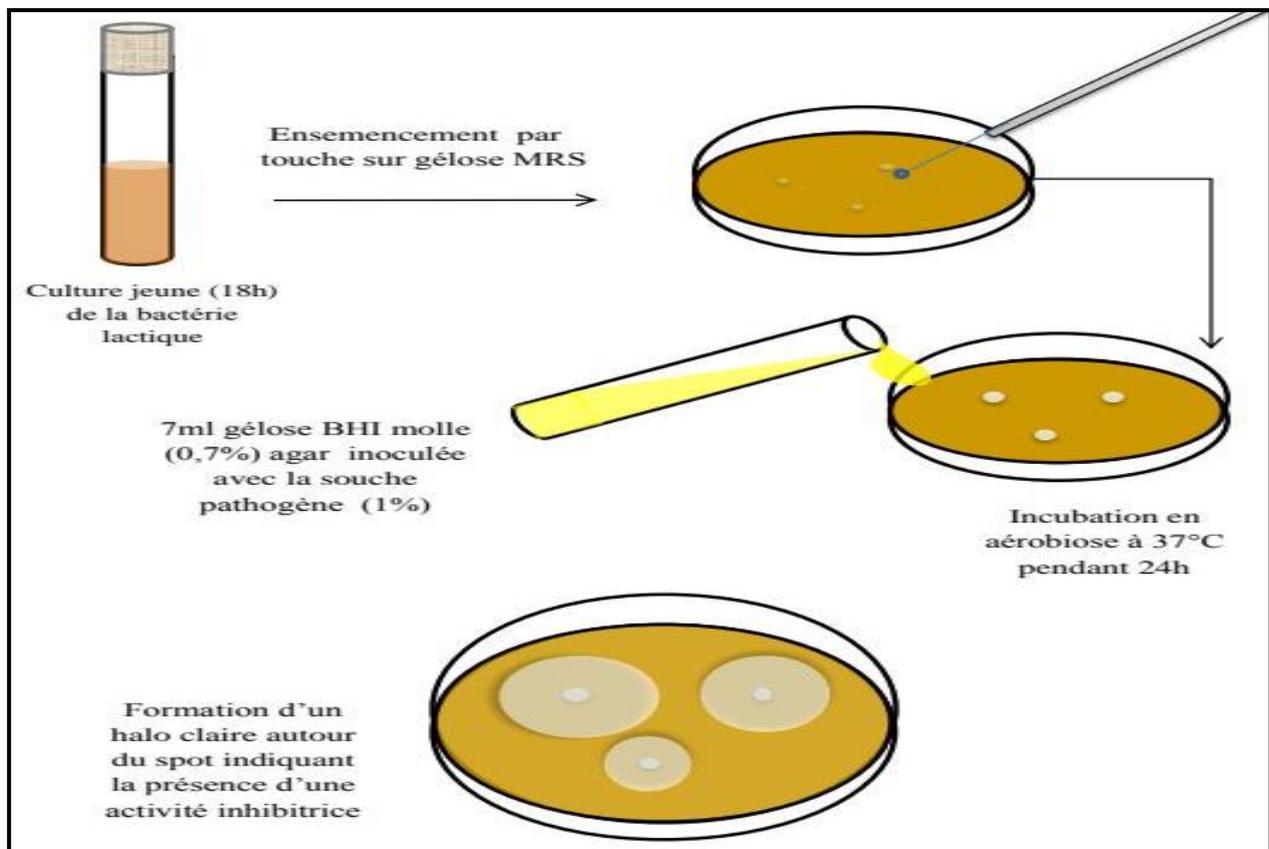


Figure 16: Mise en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode des spots sur agar (**Belhamra, 2017**).

5.2. Méthode indirect :

La méthode de diffusion en puits cette méthode consiste à :

1. Les souches productrices de substances inhibitrices sont cultivées dans du milieu MRS liquide et incubées pendant 48 heures.
2. Après incubation, le milieu est centrifugé (8000 tr/min, 10 min) et le surnageant est conservé à 4°C.
3. Dans une boîte de Pétri contenant du Müller Hinton solide et ensemencé par la souche test, des puits sont réalisés avec un emporte pièce.
4. Ces puits recevront 100 µl du surnageant brut de la culture lactique à tester.
5. Les boîtes sont incubées pendant 24 h à 30°C.
6. Les puits entourés d'une zone claire d'inhibition de la souche test et ayant un diamètre supérieur à 2 mm sont considérées comme positive (**Boumediene.2013**).

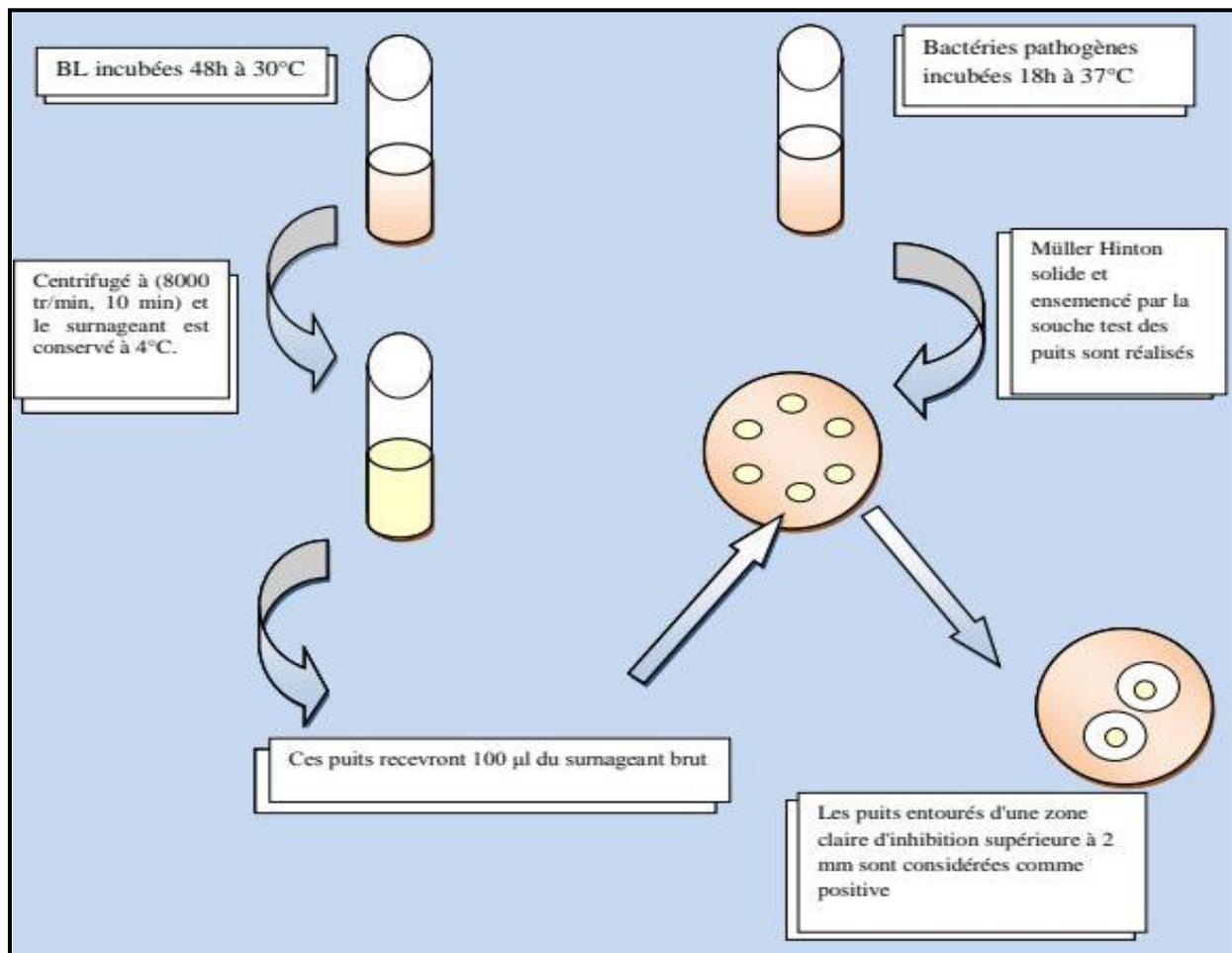


Figure17: Schéma de la méthode de diffusion en puits (**Boumediene.2013**).

6. Caractérisation de l'agent inhibiteur :

6.1. Inhibition due à l'acidité:

Lors du processus de multiplication des bactéries lactiques, il y a une production simultanée d'acide organique. Cette production entraîne une diminution des niveaux de pH intracellulaire et extracellulaire. De plus, la croissance des bactéries pathogènes est entravée et parfois complètement stoppée lorsque le pH intracellulaire atteint un seuil critique spécifique à l'espèce. Cet acide agit comme un inhibiteur de la croissance de diverses bactéries pathogènes (Benreguiég.2015).

Pour la mise en évidence des inhibitions qui sont dues à l'acide lactique nous suivons la méthode de **Barefoot et Klaenhammer en 1983**.

Après avoir été cultivées pendant 18 heures, les cultures bactériennes ont subi une centrifugation à une vitesse de 9000 rotations par minute pendant 10 minutes. Les surnageants résultants ont ensuite été filtrés à travers un millipore de 0,22 μm . Les filtrats ont ensuite été ajusté à un pH de 6,5 avec du NaOH 3N.

Pour commencer, de la gélose Muller Hinton a été coulée et laissée se solidifier dans des boîtes de Petri. Une fois prêt, la souche indicatrice a été ajoutée pour inonder la gélose. Cette souche était un inoculum standardisé avec une DO600 comprise entre 0,08 et 0,1.

Pour créer des puits pour les tests, des diamètres de 5 mm ont été réalisés et bouchés avec la même base de gélose. Chaque puits a ensuite été rempli avec 25 μl de surnageant neutralisé.

Les boîtes de Petri ont été incubées pendant 24 heures à 37°C. Enfin, les zones d'inhibition ont été mesurées par diamètre.

7. Effet bactéricide ou bactériostatique:

Pour déterminer si l'effet inhibiteur de nos souches est bactéricide ou bactériostatique, un test est réalisé en découpant une partie de la gélose dans la zone d'inhibition qui est étalé à la surface d'une boîte de Pétri contenant une gélose nutritive. Après 24 heures d'incubation à 37°C, s'il y a croissance bactérienne en surface, l'effet est antibactérien, et s'il n'y a pas de germes sur la gélose, l'effet est donc bactéricide.

Cette caractérisation a portée seulement sur les cas où l'inhibition est causée par un agent protéique. (Benreguiég.2015).

8. Etude des aptitudes probiotiques des souches lactiques:

8.1. Teste antibiogramme:

Sur la gélose Mueller-Hinton nous avons ensemencé notre souche en inondant toute la surface avec 2 mL de la culture bactérienne en bouillon. Des disques imprégnés de solution antibiotique (07 disques antibiotiques) ont été placés sur la surface de la gélose à l'aide de pinces stériles.

Après incubation à 37°C pendant 48 heures, la sensibilité ou la résistance des souches de bactéries lactiques a été évaluée par la présence ou l'absence d'une zone d'inhibition de croissance autour du disque antibiotique.

Le résultat a été exprimé comme sensible (S), résistant (R) ou intermédiaire (I) (Benreguiég, 2015).

Tableau 07: Le code et la dose de chaque antibiotique utilisé.

Les antibiotiques	Le code	La dose
Tetracycline	TE	30µg
Ceftazidime	CAZ	30µg
Amoxicillin Clavulanucid	AUG	30µg
Imipenèm	IMP	30µg
Trimethoprim Sulfamethoxazole	SXT	25µg
Chloramphenicol	C	30µg
Gentamicin	CN	10µg

*Résultats et
Discussion*

1. Isolement des bactéries lactiques

2.1. Dénombrement

Les résultats du dénombrement de la flore lactique des différents échantillons après 24h à 30°C, sont représentés dans la figure 18. Deux milieux de cultures sont utilisés pour le dénombrement MRS et M17.

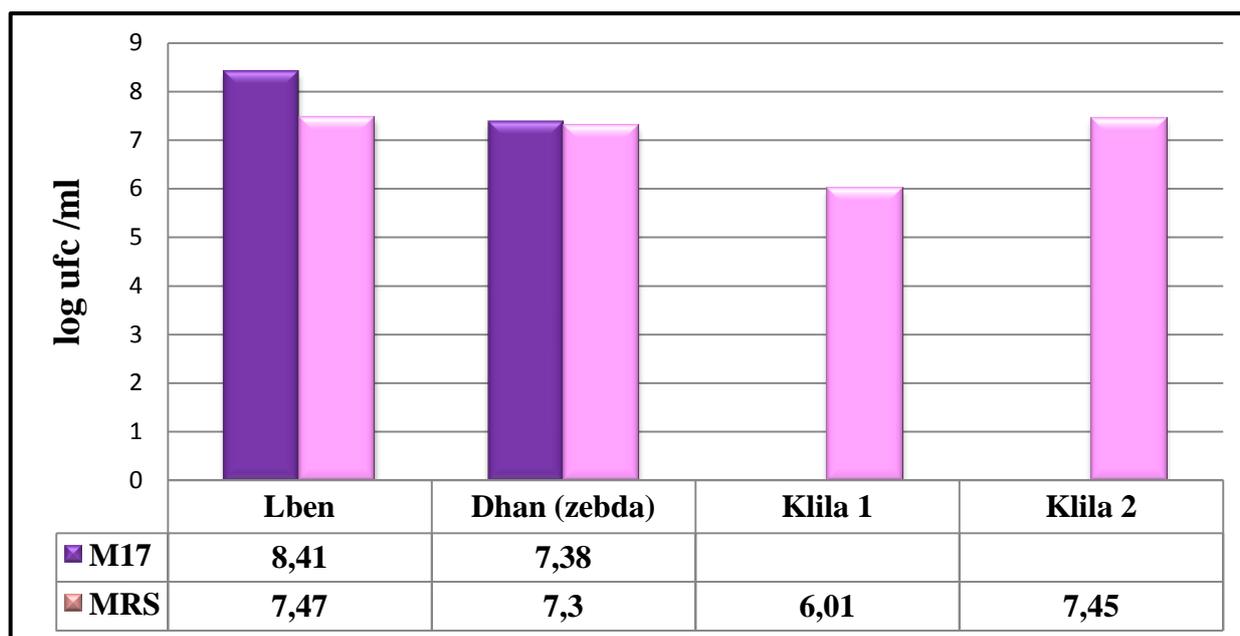


Figure 18 : Dénombrement de flore totale des échantillons de « Lben de Dhan et Klila 1 et 2 » sur le milieu MRS et M17.à 30°C.

D'après l'histogramme précédent, nous distinguons qu'à une température d'incubation de 30°C :

L'échantillon 1 de Lben possède une charge de bactéries lactiques qui égale à 2.61×10^8 ufc/ml sur M17 et 3×10^7 ufc/ml sur MRS.

L'échantillon 2 à une charge en bactéries de 2.42×10^7 ufc/ml sur M17 et 2×10^7 ufc /ml sur MRS.

L'échantillon 3 possède une charge de bactéries lactiques qui égale à 1.02×10^6 ufc /ml sur milieu MRS.

Pour le quatremme échantillon nous avons trouvé une valeur de 2.88×10^7 log ufc /ml sur milieu MRS.

Les résultats obtenus indiquent que le nombre des colonies est plus important sur les milieux M17 que sur les milieux MRS. Le Lben possède la plus grande charge microbienne, puis le Klila 2 sur MRS puis dhan, par contre la plus faible charge est celle du Klila 1 sur le milieu MRS.

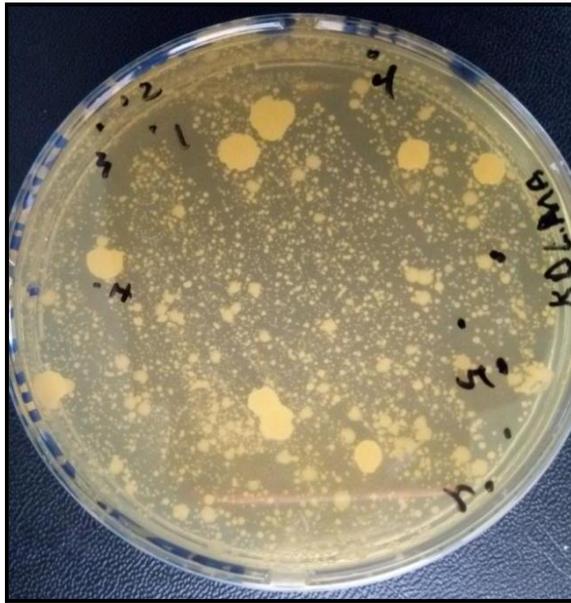
Nos résultats du dénombrement de la flore lactique à 30°C du Lben sur le milieu MRS montrent une charge de 3×10^7 UFC/ml, ces valeurs coïncident avec les travaux d'**Abdelmoumene, (2015)** où le nombre de bactéries est de $3,027 \times 10^7$ UFC/g.

Selon les travaux de **Belyagoubi et Abdelouahid (2013)** Zebda de la région d'Adrar possède un nombre de microorganismes de 10^6 UFC/g compté sur le milieu MRS et M17 à une température de 28°C. Donc ces résultats sont proches aux nos résultats de 2.42×10^7 ufc/ml sur M17 et 2×10^7 ufc /ml sur MRS.

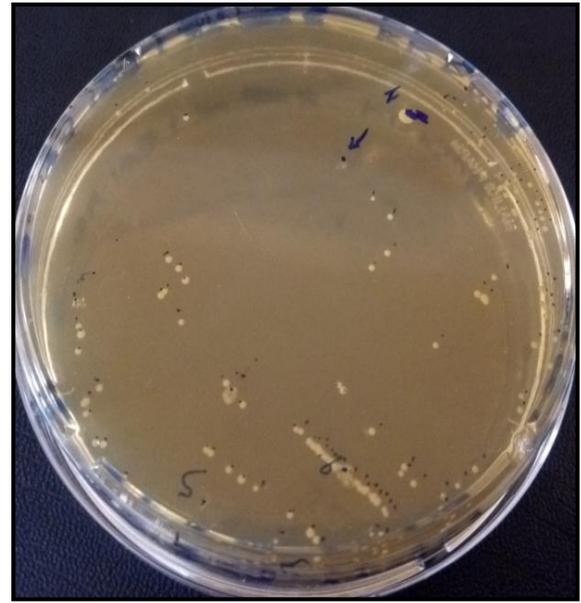
Avec une faible quantité dans l'échantillons de « klila 1 » sont en accord avec celle déjà décrite par (**Khedid et al., 2009 ; Labioui et al., 2009**) qui a dire les valeurs de LAB trouvées dans les fromages traditionnels (Klila) étaient faibles par rapport aux niveaux de LAB déjà mentionnés dans d'autres types de produits laitiers traditionnels .

Notre valeur 1.02×10^6 ufc /ml sur milieu MRS. est élevée par rapport aux résultats mentionnés par (**Bendi Hadji et Bensalah ,2021**), où le klila possède une charge variaient de $0,3 \times 10^4$ à $4,2 \times 10^4$ cfu/ml avec une moyenne de $2,2 \times 10^3$.

D'après la **figure 19** au dessous on remarquant une charge bactérienne assez élevée de Lben de dilution 10^{-3} par rapport la charge bactérienne de Klila 1 de dilution 10^{-2} , cultivé sur la gélose MRS dans une température d'incubation de 30°C.



[A]



[B]

Figure 19 : Dénombrement de la flore lactique sur le milieu MRS à 30°C.

[A] : Lben de dilution 10^{-3}

[B] : Klila 1 de dilution 10^{-2}

2.2. Isolement des bactéries lactiques

Sur 4 échantillons et à partir des boîtes contenant un nombre réduit de colonies séparées, 50 isolats à Gram positif, catalase négative ont été retenus selon les critères répondant aux bactéries lactiques et mis au point par **Wood et Holzappel (1995)**.

L'observation microscopique a révélé deux formes de cellules (Coques et Bâtonnets). Les coques (diplocoques et en chaînette) constituent la flore dominante par rapport à l'effectif total. Les formes bâtonnets (coccobacille). Par rapport au nombre total des isolats nous avons calculé les taux de coques et de bacille. Des résultats similaires ont été obtenus par **Benreguiég (2015)** avec un taux de Coques de 76% contre 24% de bâtonnets. figure 20.

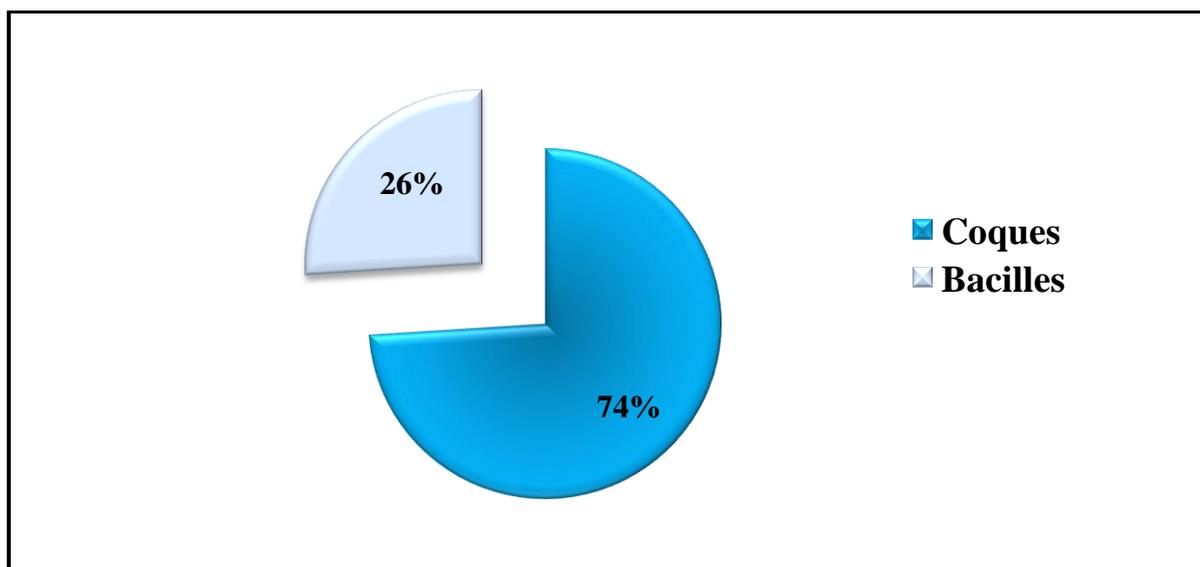


Figure 20 : Le pourcentage global de coques et de bâtonnets dans les 50 bactéries lactiques isolées.

Le graphique montre les principales différences entre le nombre de cocci et de bacilles isolés de tous les échantillons. Ce taux élevé de cocci a été observé quel que soit le type d'échantillon. Des différences subtiles ont été trouvées dans la flore lactique de Zebda par rapport au Lben, où un nombre plus important de bacilles a été obtenu, alors qu'il n'y avait pas de bacilles dans les 10 bactéries isolées de Klila 1 et 2 (**Figure 21**).

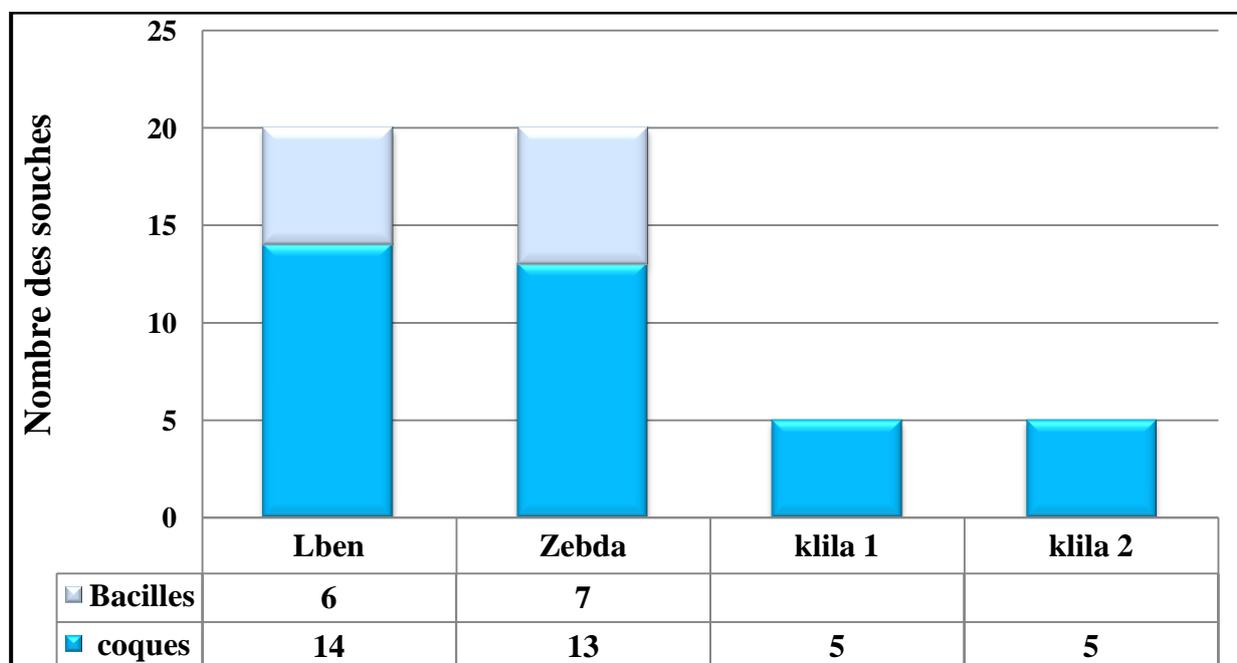


Figure 21 : répartition des 50 isolats lactiques en coques et de bacilles en fonction de l'échantillon.

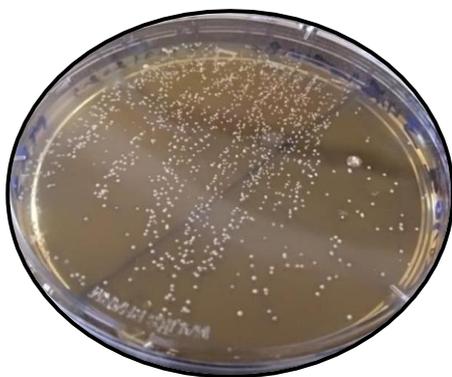
2. Identification des isolats lactiques

2.1. Caractérisation macroscopique

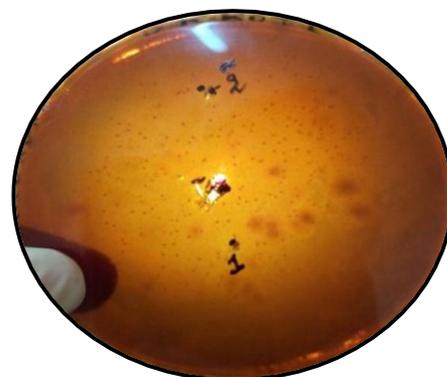
Sur milieu MRS et M17 solide et après 24h d'incubation à 30°C, des colonies répondant aux critères des bactéries lactiques ont été observé sur les boîtes (**figure22**) et sont résumés dans le tableau suivant.

Tableau 08 : Résultats de l'examen macroscopique des colonies sur milieux gélosés MRS et M17.

Milieu de culture	Forme	Taille	Couleur
MRS	lenticulaire	Grande	blanchâtre ou laiteuse
M17	Circulaire	Petite	Jaune



(1)



(2)

Figure 22: Aspect macroscopique des isolats sur milieu (1) MRS et (2) M17 après 24h d'incubation à 30°C.

- Les bactéries lactiques présentant un trouble homogène sur bouillon MRS. **La figure 23.**

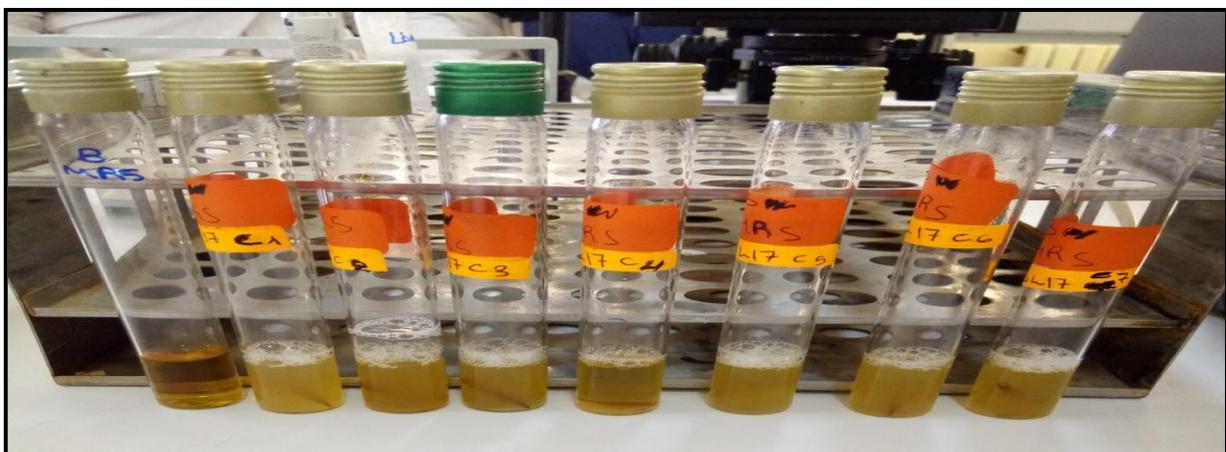


Figure 23 : Aspect des cultures pures des bactéries lactiques sur bouillon MRS.

2.2 Purification des isolats

Nous avons effectué une série d'ensemencement en prélevant 50 colonies des boîtes des cultures isolées au hasard par des Cure-dents stériles et cultivées en bouillon MRS et l'incubation 24 -48h à 30°C.

Après incubation, et pour obtenir des isolats purs nous avons procédé à des repiquages de chaque souche en stries sur milieux MRS solide (**figure25**). Pureté est estimée par observation microscopique après coloration de Gram.

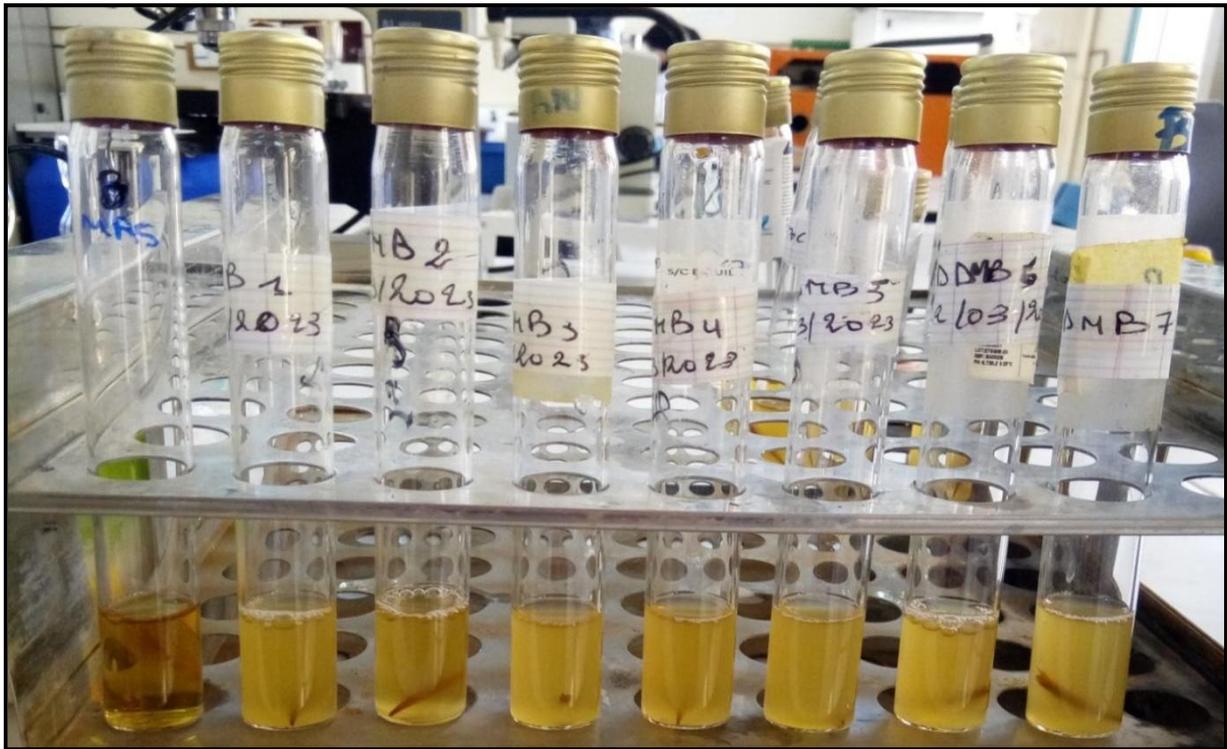


Figure 24 : Aspect de purification des quelques isolats des bactéries lactiques sur bouillon MRS après 24h d'incubation à 30°C.

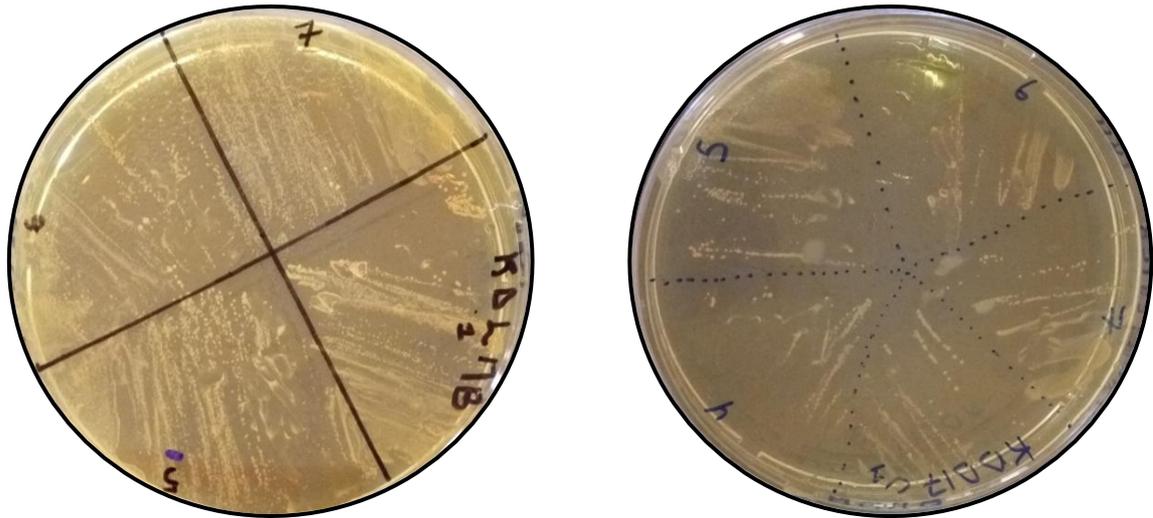


Figure 25 : Résultats de purification des quelques isolats en stries sur milieux MRS solide.

2.3. Observation microscopique

L'observation microscopique après coloration de Gram montre que les bactéries sont à Gram positif, et se présentent sous forme des coques et des bacilles isolées, en paires ou en chainettes.

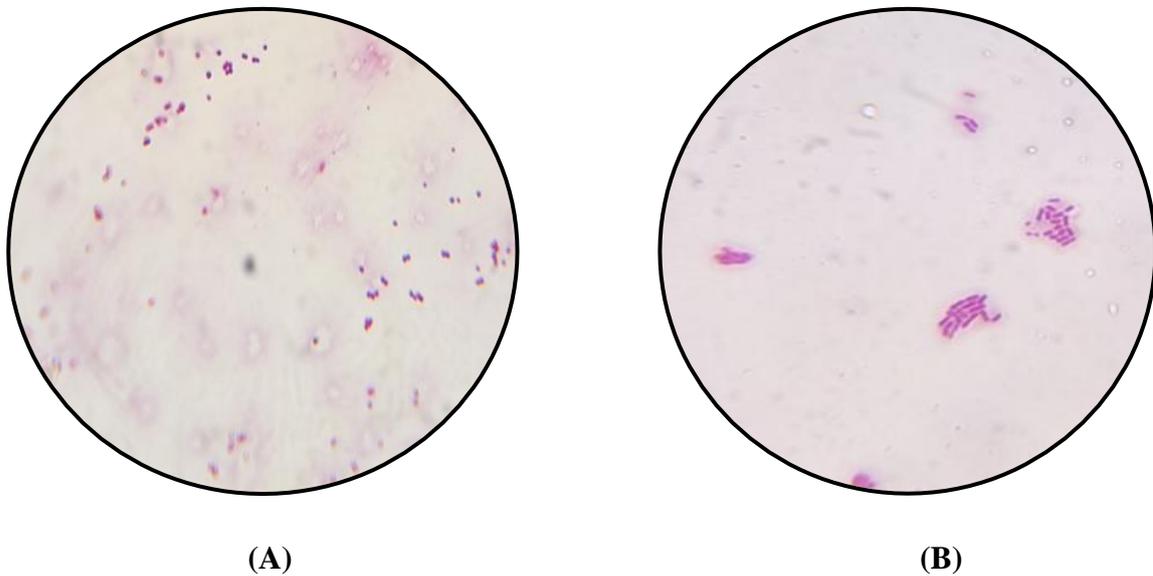


Figure 26: Aspect microscopique Gx100 de quelques isolats (A) : isolat **K2B1** (coque), (B) : isolat **DB6** (bacille).

2.4 Résultats des tests physiologiques et biochimiques

Sur les 50 Isolats nous avons fait le teste de caatalase et la coloration de Gram et nous avons pris 20 souches pour réaliser les testes de la recherche du pouvoir inhibiteur.

Des tests physiologiques et biochimiques ont été réalisés sur 15 souches (13 coques, 2 bacilles) parmi les 20 présentant des effets inhibiteurs sur au moins une souche pathogène. Le tableau 9 et 10 representes le profil profil physiologique et biochimique des isolats actifs.

Tableau 09 : Résultats de la coloration de Gram et catalase des 50 colonies.

Les echantillons	Isolats	Caractéristiques			
		Gram+ /-	Catalase	Coque/Bacille	L'association
Lben	LA1	+	-	Coque	Coccus
	LA2	+	-	Bacille	Coccobacille
	LA3	+	-	Coque	Coccus
	LA4	+	-	Bacille	Coccus
	LA5	+	-	Coque	Diplococci
	LA6	+	-	Coque	Coccus
	LA7	+	-	coque	Coccus
	LB1	+	-	Bacille	coccobacille
	LB2	+	-	Coque	Coccus
	LC1	+	-	Coque	Coccobacille
	LC2	+	-	Coque	Coccus
	LC3	+	-	Coque	Coccus
	LC4	+	-	Coque	Coccus
	LC5	+	-	Coque	Coccus
	LC6	+	-	Coque	Coccus
	LC7	+	-	Coque	Coccus
	LD1	+	-	Coque	Coccus
	LD2	+	-	Coque	Coccus
	LD3	+	-	Coque	Coccus
	LD4	+	-	Coque	Coccus
		+ : Résultat positive - : Résultat négative			

Tableau 09 (suite): Résultats de la coloration de Gram et catalase des 50 colonies.

Les échantillons	Isolats	Caractéristiques			
		Gram +/-	Catalase	Coque/Bacille	L'association
Dhan (Zebda)	DA1	+	-	Coque	Coccus
	DA2	+	-	Coque	Coccus
	DB1	+	-	Coque	Coccus
	DB2	+	-	Coque	En Chaînette
	DB3	+	-	Coque	Diplococci
	DB4	+	-	Coque	Diplococci
	DB6	+	-	Bacille	Coccobacille
	DB7	+	-	Coque	En Chaînette
	DC1	+	-	Coque	Diplococci
	DC2	+	-	Coque	Coccus
	DC3	+	-	Bacille	Coccobacille
	DD1	+	-	Coque	Coccus
	DD2	+	-	Bacille	Coccobacille
	DD3	+	-	Bacille	Coccobacille
	DD4	+	-	Coque	En chaînette
	DD5	+	-	Coque	Coccus
	DD6	+	-	Coque	En chaînette
	DE1	+	-	Coque	En chaînette
DE2	+	-	Coque	En chaînette	
Klila 1	K1A1	+	-	Coque	Coccus
	K1A2	+	-	Coque	Coccus
	K1A3	+	-	Coque	Tetracoccus
	K1A4	+	-	Coque	Coccus
	K1A5	+	-	Coque	Coccus
Klila 2	K2B1	+	-	Coque	Coccus
	K2B2	+	-	Coque	Coccus
	K2B3	+	-	Coque	Coccus
	K2B4	+	-	Coque	Coccus
	K2B5	+	-	Coque	Coccus

+ : Résultat positive
- : Résultat négative

Tableau 10 : Profil physiologique et biochimique des isolats actifs.

Isolats	Les tests				
	Croissance à 10C° Pendant 7 jrs	Croissance à 45C° Pendant 24 h	Test Thermorésistance à 60C°	Croissance à ph=9.6 Pendant 24h	Croissance à ph=4.4 Pendant 24h
	LC3	+++	+++	R	++
LD2	++	++	R	+++	++
DB1	++	+	R	+++	+++
DB2	-	+	S	+	+
DB3	++	++	R	+	-
DB4	++	+	R	+	+++
DB6	+++	++	R	++	+++
DB7	+++	++	R	+	+
DC3	++	++	R	+++	+
DE1	+++	++	R	+	+
K1A1	++	++	R	++	+++
K1A2	++	++	R	+++	++
K1A3	+	++	R	+++	++
K2B1	+++	+++	R	+	+
K2B3	++	+++	R	+	-
- : Pas Croissance / + : Croissance faible ++ : Croissance moyenne / +++ : Croissance forte R : Résistance / S : Sensible					

D'après les résultats du tableau 09 ,10 .Voici un résumé des observations :

1. Caractéristiques des bactéries lactiques :

- tous les isolats se sont révélés être gram positif et catalase négative, ce qui est typique des bactéries lactiques.

2. Croissance a différentes températures :

- parmi les 15 souches testées, 11 souches ont montré une capacité de croissance entre un forte et une moyenne a 10°C et a 45°C.

- deux souches (DB1, DB4) ont montré une croissance moyenne à 10°C et une faible croissance à 45°C, tandis qu'une seule souche (K1A3) a montré l'inverse (faible croissance à 10°C et moyenne à 45°C).

- la souche DB2 a montré une croissance à 45°C mais pas à 10°C.

3. Résistance à la chaleur :

- l'analyse des tests de thermorésistance a montré que tous les isolats étaient résistants à 60°C, sauf la souche DB2.

4. Croissance à différents pH :

- six souches (LC3, LD2, DB6, K1A1, K1A2, K1A3) peuvent croître entre un forte et une moyenne croissance à PH 9,6 et à PH 4,4.

- deux souches (DC3, DB4) peuvent croître entre un faible et une forte croissance à pH 9,6 et à pH 4,4.

- une souche (DB1) peut croître fortement à la fois à pH 4,4 et à pH 9,6.

-deux souches (DB3, K2B3) présentent une faible croissance à pH 9,6 et sont absentes à pH 4,4.

-Les quatre souches (DB2, DB7, DE1, K2B1) ont une croissance faible dans les deux pH.

-Les souches K2B3 et DB3 ont montré une faible croissance à pH 9,6 et étaient absentes à pH 4,4.

En conclusion, les résultats obtenus mettent en évidence les caractéristiques des bactéries lactiques étudiées. Tous les isolats se sont révélés être gram positif et catalase négative, ce qui est conforme aux caractéristiques typiques des bactéries lactiques.

En ce qui concerne la croissance à différentes températures, la majorité des souches ont montré une capacité de croissance modérée à élevée dans la plage de températures allant de 10°C à 45°C. Cependant, quelques souches ont présenté des comportements atypiques, telles que la souche DB1 et DB4 qui ont montré une croissance moyenne à basse température et une faible croissance à haute température.

En ce qui concerne la résistance à la chaleur, la plupart des isolats étaient résistants à une température de 60°C, à l'exception de la souche DB2 qui n'a pas montré de croissance à cette température.

En ce qui concerne la croissance à différents pH, les résultats varient en fonction des souches. Certaines souches ont montré une capacité de croissance modérée à élevée à la fois à pH 9,6 et à pH 4,4, tandis que d'autres ont montré une faible croissance ou étaient absentes à l'un des pH

testés. Par exemple, les souches DB3 et K2B3 ont montré une faible croissance à pH 9,6 et étaient absentes à pH 4,4.

En résumé, ces résultats mettent en évidence la diversité des caractéristiques des bactéries lactiques étudiées, en particulier en ce qui concerne leur croissance à différentes températures et pH. Ces informations sont importantes pour mieux comprendre et exploiter les bactéries lactiques dans différents domaines, tels que l'industrie alimentaire et la santé.

2.5. Identification des isolats par API 50 CHL

Après l'observation d'une seule souche (K2B1) donne une zone d'inhibition dans le teste de l'ihinibitin due a lacidité, nous l'avons choisie pour l'identification par le teste API 50 CHL.



Figure 27 : Profil fermentaire de souche K2B1 de bactéries lactiques identifiées par API50 CHL après 48h d'incubation à 30°C.

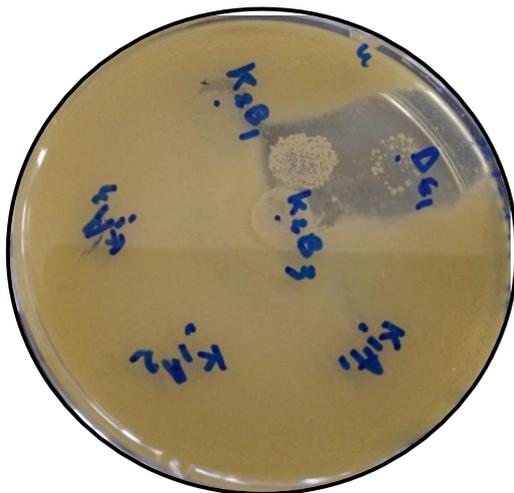
Tableau 11 : profil fermentaire de souche K2B1. API50 CHL après 48h d'incubation à 30C°.

	Carbohydrates				
Souche lactique	Témoin	Glycérol	Erythritol	D-Arabinose	L-Arabinose
K2B1	-	-	-	-	-
	D-Ribose	D-Xylose	L-Xylose	D-Adonitol	MDX
K2B1	+	-	-	-	-
	D-Galactose	D-Glucose	D-fructose	D-Mannose	L-Sorbose
K2B1	+	+	+	+	-
	L-Rhamnose	Dulcitol	Inositol	D-Manitol	D-Sorbitol
K2B1	-	-	-	-	-
	MDM	MDG	NAG	Amydaline	Arbutine
K2B1	-	-	+	-	-
	ESC	Salicine	D-Celibiose	D-Maltose	D-Lactose
K2B1	-	-	-	-	-
	D-mélibiose	D-Saccharose	D-Trehalose	Inuline	D-Mélézitose
K2B1	-	+	+	-	-
	D-Raffinose	Amidon	Glycogène	Xylitol	Gentiobiose
K2B1	-	+	-	-	-
	D-Turanose	D-Lyxose	D-Tagatose	D-Fucose	L-Fucose
K2B1	-	-	-	-	-
	D-Arabitol	L-Arabitol	GNT	2KG	5KG
K2B1	-	-	-	-	-
	- : Absence / + : Présence				

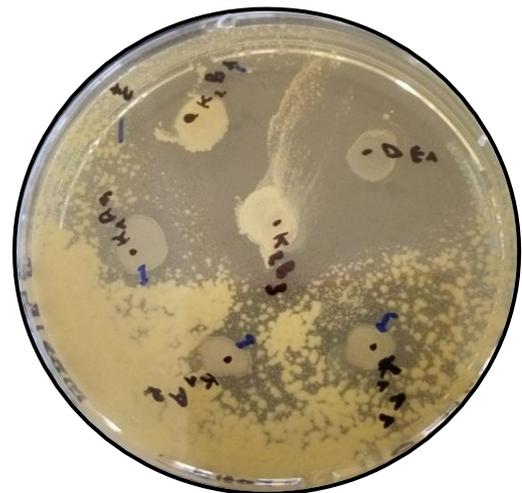
Les résultats montrent que la souche K2B1 c'est : *Lactococcus lactis* spp par un pourcentage de 84.5% après 48h d'incubation à 30C°.

3. Recherche des souches lactiques productrices des agents antimicrobiens

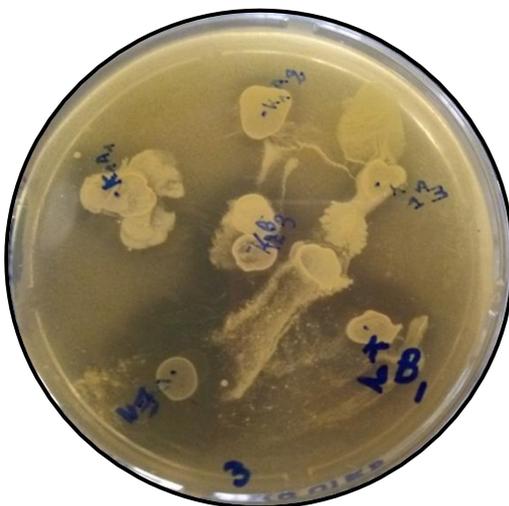
Après avoir confirmé que 50 isolats appartenaient au groupe des bactéries lactiques, 20 souches ont été testées pour l'activité antibactérienne en utilisant la méthode de **Fleming et al. (1975)**, et les résultats ont montré qu'un total de 15 souches avaient une capacité inhibitrice contre au moins un des les souches testées. Les résultats obtenus sont partiellement présentés dans la **Figure 28** et regroupés dans le **Tableau 12**.



E.coli



Staphylococcus aureus



Listeria innocua



Pseudomonas aeruginosa

Figure 28 : Aspects des effets inhibiteurs des bactéries lactiques contre les bactéries pathogènes par la méthode directe.

Tableau12 : Activité inhibitrice de 15 isolats lactiques bioactifs

Code de la souche	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)			
	<i>L. innocua</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E. coli</i>
LA1	0	0	0	0
LA2	0	0	0	0
LA5	0	0	0	0
LC2	0	0	0	0
LC3	0	0	27	0
LD2	12	0	0	0
DA1	0	0	0	0
DB1	22	0	0	0
DB2	18	0	0	0
DB3	24	0	0	0
DB4	22	0	0	0
DB6	28	0	0	0
DB7	9	0	0	0
DC3	56	0	0	0
DE1	26	40	30	25
K1A1	15	16	0	0
K1A2	12	16	0	0
K1A3	9	14	0	0
K2B1	12	24	0	20
K2B3	17	24	0	0
15 isolats lactiques bioactifs				
5 isolats lactiques non bioactifs				

D'après les résultats regroupés dans le tableau 12, les pouvoirs inhibiteurs de nos isolats sont très variables. On note que 1 isolat seulement ont inhibé les 4 bactéries indicatrices testées, il s'agit de DE1. Un de nos bactéries lactiques a montré une inhibition contre 3 bactéries indicatrices. Cependant, 4 isolats étaient actifs contre 2 bactéries et 9 isolats restant parmi les 15 ont montré un pouvoir inhibiteur contre une seule souche indicatrice parmi les 4.

Selon les travaux de **Labioui et al., (2005)** la zone d'inhibition des bactéries lactiques sur *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* et sur *Escherichia coli* varie entre 23.3 et 32,5 mm, 19,4 et 23,2 mm, 22,5 et 31,5 mm respectivement. Ces valeurs sont presque similaires à nos résultats.

La figure 25 présente les taux d'inhibitions des souches indicatrices par nos isolats lactiques.

D'après ces résultats on constate que la souche indicatrice la plus sensible à nos isolats est *Listeria innocua*, elle est inhibée par 14 isolats. La souche indicatrice *Pseudomonas aeruginosa* est inhibée par 6 isolats. Alors qu'*E.coli* et *Staphylococcus aureus* sont inhibées par 2 isolats seulement parmi les 15 actifs.

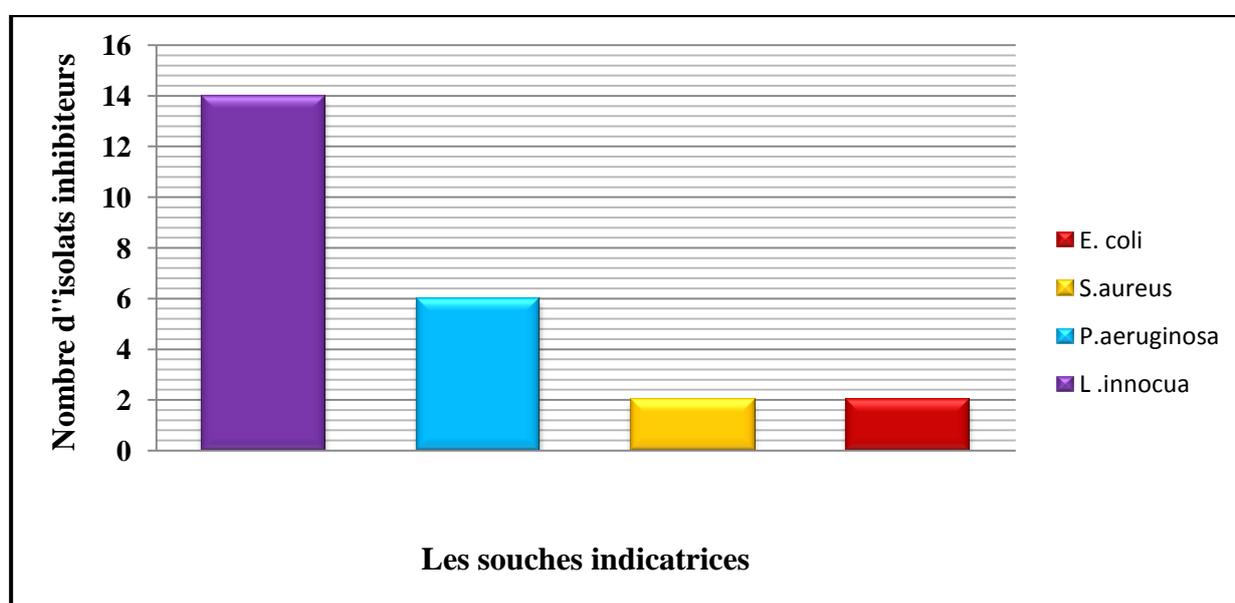


Figure 29 : Nombre d'isolats inhibiteurs pour chaque bactérie indicatrice.

3.1. Nature de l'agent inhibiteur

La méthode de diffusion en milieu solide (**Fleming et al., 1975**) a été utilisée pour détecter l'inhibition. Le principe du test est que les souches bactériennes sont mises en culture et exposées, non seulement pour mettre en évidence l'interaction négative provoquée par le métabolisme des bactéries lactiques sur les bactéries pathogènes, mais aussi pour comprendre l'importance relative de l'inhibition observée. Cela se fait en mesurant la lumière la taille du halo est obtenue.

L'observation de zones d'inhibition lors de l'interaction de nos souches de bactéries lactiques avec la flore pathogène nous a conduit à rechercher la nature exacte de ces inhibitions observées

qui peuvent être dues aux acides organiques (Holzapfel et al., 1995), au peroxyde d'hydrogène (Desmazeaud, 1996), ou à des bactériocines (Desmazeaud, 1998).

Pour les 15 isolats qui ont montré un pouvoir inhibiteur, nous avons essayé de déterminer la nature de l'agent inhibiteur pour les inhibitions dues aux acides organiques par l'utilisation de surnageant neutralisé (pH 7).

3.1.1. Inhibition due à l'acidité

En réalisant le test de mise en évidence des inhibitions qui sont dues à l'acide lactique. Les isolats lactiques ont montré une levée totale de leur effet inhibiteur et pour une seule souche K2B1 a montré une diminution de leur effet inhibiteur avec *E. coli*. Les figures 30, 31, et le tableau 13 représentent les variations dans le diamètre de la zone d'inhibition des 15 isolats testés en surnageant non neutralisé et neutralisé.

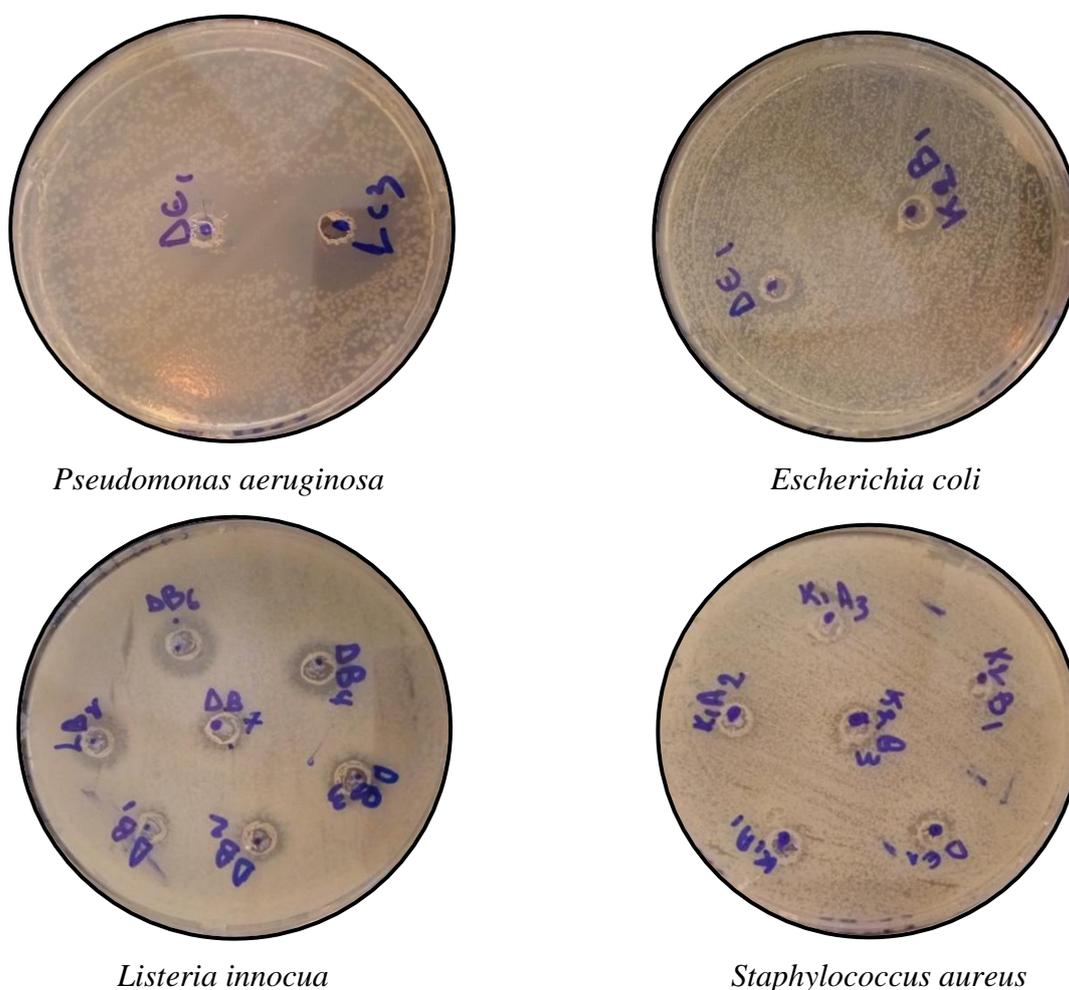


Figure 30 : Aspects des effets inhibiteurs des bactéries lactiques contre les bactéries pathogènes par la méthode indirecte (sens neutralisation de surnageant).

Tableau 13 : Résultats de la méthode indirecte (sens neutralisation de surnageant) de 15 souches.

Code de la souche	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)			
	<i>L. innocua</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
DE1	2	4	2	8
DB1	0	0	0	0
K1A1	1	0	0	0
DB2	1	0	0	0
DB4	2	0	0	0
DB6	6	0	0	0
K2B3	4	0	2	0
K2B1	1	0	0	6
K1A3	0	0	0	0
DB3	1	0	0	0
K1A2	0	0	0	0
LC3	0	16	0	0
LD2	4	0	0	0
DC3	0	0	0	0
DB7	1.5	0	0	0

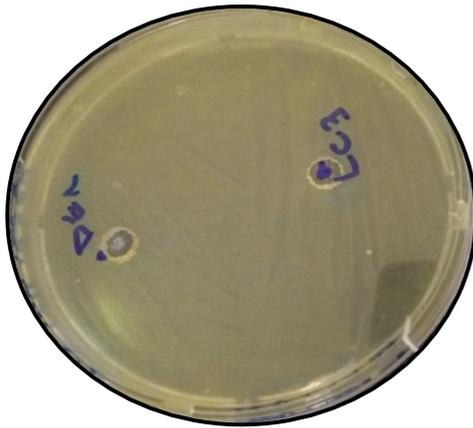
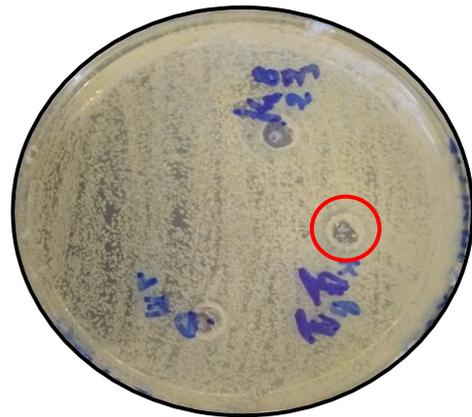
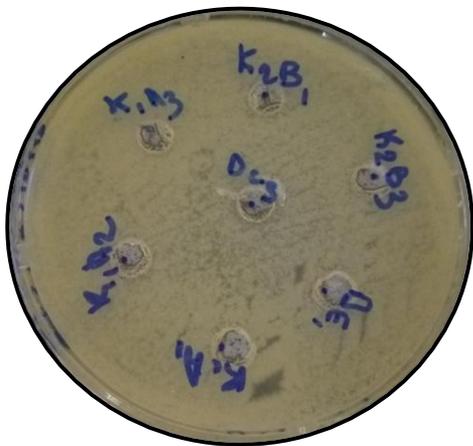
*Pseudomonas aeruginosa**Escherichia coli**Listeria innocua**Staphylococcus aureus*

Figure 31 : Aspects des effets inhibiteurs des bactéries lactiques contre les bactéries pathogènes par la méthode indirecte (surnageant neutralisé).

Les résultats obtenus en utilisant le surnageant neutralisé ont montré la disparition totale des halos d'inhibition chez 14 isolats parmi les 15. Les isolats lactiques qui ont perdus leur effet inhibiteur sont :

LC3, LD2, DB1, DB2, DB3, DB4, DB6, DB7, DC3, DE1, K1A1, K1A2, K1A3, K2B3. Pour la seule souche restante, nous avons observé une diminution dans le diamètre de la zone d'inhibition K2B1.

Selon **Helander et al (1997)**, l'effet inhibiteur des souches d'acide lactique peut être dû à la production d'acides organiques tels que l'acide lactique, l'acide formique et l'acide benzoïque.

Produits finaux du métabolisme fermentatif, ils passent passivement à travers la membrane plasmique de la cellule dans forme dissociée, et le milieu intracellulaire peut s'acidifier à fortes concentrations. Le degré auquel la fonction cellulaire est inhibée et le potentiel membranaire est invalidé. L'accumulation d'acides organiques inhibe ainsi directement les micro-organismes nuisibles qui présentent un seuil de résistance plus faible aux variations de pH intracellulaire (Benreguieg, 2015).

4. Caractérisation de l'agent inhibiteur

4.1. Effet bactéricide ou bactériostatique

Après la réalisation de teste pour déterminer si l'effet inhibiteur de 4 isolats (qui donne une grande zone d'inhibition) est bactéricide ou bactériostatique. **La figure 28**



Figure 32 : Caractérisation de l'agent inhibiteur de 4 isolats.

Pseudomonas aeruginosa : LC3 /DE1

Escherichia coli : DE1 / K2B1

Listeria innocua : K2B3

L'agent inhibiteur des 4 isolats il a un effet bacteriostatique contre *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Listeria innocua*.

5. Résistance aux antibiotiques

Les bactéries lactiques sont naturellement résistantes à beaucoup d'antibiotiques grâce à leur structure et physiologie (**Temmerman et al., 2003**). Cette résistance aux antibiotiques aide à maintenir l'équilibre gastro-intestinal lorsque la diarrhée est induite par un traitement antibiotique, offrant des avantages potentiels à l'hôte (humain ou animal). Cependant, la capacité de transférer horizontalement des facteurs de résistance (gènes) à d'autres bactéries commensales ou pathogènes présente des risques importants (**Teuber et al. 1999 ; Salyers et al., 2004 ; Maria et al., 2010**). De nombreux articles scientifiques rapportent que les gènes de résistance aux antibiotiques des agents pathogènes humains sont identiques à ceux des bactéries lactiques. Des gènes conférant une résistance acquise aux antibiotiques tels que la tétracycline, l'érythromycine et la vancomycine ont été identifiés dans des LAB isolés à partir de viande et de produits laitiers fermentés. Étant donné que les plasmides conjugatifs et les transposons sont courants dans les LB et largement distribués dans l'environnement. Il est possible que ces bactéries commensales agissent comme véhicule de dissémination des déterminants de la résistance aux antibiotiques. Elle nécessite donc des investigations sur la biosécurité des produits probiotiques (**Niamh et al., 2009**).

Nous avons effectué des tests antibiotiques sur trois souches de bactéries lactiques (DE1, K2b1 et K2B3) contre 7 antibiotiques différents. Pour savoir si nos souches étaient sensibles ou résistantes, nous avons mesuré le diamètre de la zone d'inhibition pour chaque souche avec chaque antibiotique testé.

Selon (**Vlkova et al., 2006**). Nous avons émis l'hypothèse que les souches d'un diamètre de inférieur ou égal à 15 mm étaient des souches résistantes et que les souches d'un diamètre de supérieur ou égal à 21 mm ou étaient des souches sensibles.

Tableau 14 : Résultats de teste d'antibiogramme des isolats.

Antibiotiques	Isolats		
	K2B1	K2B3	DE1
Tétracycline TE	S	S	S
Ceftazidime CAZ	I	R	I
Amoxicillin Clavulanucid AUG	S	S	S
Imipénème IMP	S	S	S
Triméthoprime Sulfaméthoxazole SXT	R	R	R
Chloramphénicol C	S	S	I
Gentamicine CN	I	R	R

R : résistance / S : Sensible
I : Intermédiaire

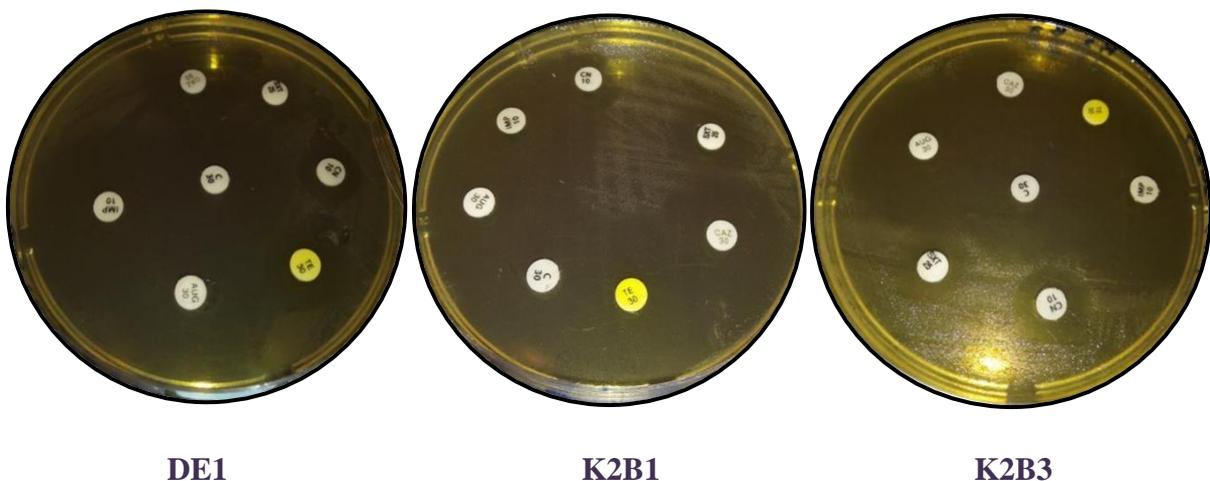


Figure 33 : Résultats de teste d'antibiogramme des isolats : DE1, K2B1, K2B3.

Les résultats obtenus ont montré que les trois souches testées (K2B1 K2B3 DE1) présentaient une résistance au triméthoprimé Sulfaméthoxazole (SXT).et deux souches (DE1, K2B3) sont résistantes à la gentamicine, tandis qu'une souche (K2B3) est résistante à l'antibiotique ceftazidime.

Les résultats ont également montré que les trois souches (K2B1, K2B3, DE1) est sensible à la tétracycline et à l'amoxicilline clavulanid et à l'imipénème, alors que seules deux souches (K2B3, K2B1) sont sensibles au chloramphénicol.

Montrer **Bahloul Et Berkat (2018)** à travers leur étude sur les bactéries lactiques, que 79,6% de leur souche est résistante pour la ceftazidime. Et Une étude de **Gevers et al. (2003)** ont découvert que 79% bactéries lactiques isolées de saucisses fermentées et séchées étaient résistantes à la gentamicine.

Et selon **Raffaele.C (2005)** Toutes les souches isolées du fromage se sont avérées résistante l'antibiotique triméthoprimé sulfaméthoxazole.

La souche DE1 , K2B3 et K2B1 est sensible à quatre antibiotiques sur 7 testés. Ce résultat est en accord avec des études ayant rapportées que les *Lactobacilles* sont généralement sensibles aux antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des protéines comme le chloramphenicol, et les tétracyclines (**Temmerman et al., 2003; Coppola et al., 2005; D'aimmo et al., 2007**) .

Les tests antibiotiques effectués par **Tahlaiti (2019)** ont montré que *Lactobacillus brevis* présente une sensibilité aux familles bêta-lactamines parmi lesquelles par l'amoxicilline, l'amoxicilline + l'acide clavulanique.

Une comparaisaon des travaux de **Mami, (2013)** dans laquelle nous avons cofirme la sensibilité de notre souche lactique à l'imipenèm.

La souche K2B1, que nous avons identifiée comme *Lactococcus lactis ssp*, est sensible à la plupart des antibiotiques utilisés et n'est résistante qu'à la ceftazidime.

Conclusion

Conclusion

Conclusion

Les bactéries lactiques sont un groupe de bactéries bénéfiques qui produisent de l'acide lactique en tant que produit final de la fermentation. Elles jouent un rôle essentiel dans la préservation de la santé humaine, la prévention des maladies, la conservation des aliments et la préparation de produits laitiers fermentés. Certaines souches présentent des caractéristiques distinctes qui les recommandent comme probiotiques, et elles possèdent également une activité antibactérienne naturelle qui leur permet d'inhiber les agents pathogènes.

Dans notre étude, nous avons isolé des bactéries lactiques à partir de produits laitiers traditionnels et nous avons étudié certaines de leurs propriétés bénéfiques. Les tests de coloration de Gram et de catalase ont confirmé que les souches isolées étaient Gram positif et catalase négatif, ce qui est typique des bactéries lactiques. Les tests d'identification ont permis de sélectionner 20 souches lactiques pour étudier leur capacité d'inhibition vis-à-vis de bactéries pathogènes telles que *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Listeria innocua*. Quinze souches ont présenté une activité antibactérienne, avec des zones d'inhibition observées lors des tests de diffusion en puits et de doubles couches.

Les souches CD3, DE1 et K2B1 ont montré une forte activité inhibitrice contre les bactéries indicatrices, avec des zones d'inhibition allant jusqu'à 56 mm de diamètre pour *Listeria innocua*. Des tests supplémentaires sont nécessaires pour déterminer la nature exacte de l'inhibiteur responsable de cette activité antibactérienne, bien que l'acide lactique ait été identifié comme l'un des composants impliqués.

Les tests d'antibiogramme ont révélé que les souches K2B1, K2B3 et DE1 présentaient une résistance à certains antibiotiques, mais étaient sensibles à d'autres.

Les bactéries lactiques de type *Lactococcus lactis ssp.* Ont montré une thermophilie, capable de se développer à des températures élevées jusqu'à 45 °C. Ces résultats suggèrent que ces souches pourraient avoir le potentiel d'être utilisées comme probiotiques ou agents de conservation.

Nos résultats fournissent des informations sur les propriétés et les caractéristiques des bactéries lactiques isolées à partir de produits laitiers traditionnels. Ces bactéries présentent un large éventail d'activités bénéfiques, notamment une capacité inhibitrice contre des bactéries pathogènes, une thermophilie et une thermorésistance et sensibilité aux antibiotiques. Ces résultats encouragent la poursuite de la recherche sur le potentiel des bactéries lactiques en tant

Conclusion

que probiotiques et conservateurs, ouvrant ainsi la voie à de nouvelles applications dans l'industrie alimentaire et la santé humaine.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

-A-

Abdelali, Z., Bouhali, I. (2021). Taxonomie numériques et étude phylogénétique des bactéries isolées de lait cru de vache. mémoire de master, université Arbi Ben mhidi ,oum ElBouaghi. .,p14

Abdelmoumene, W. (2015). Etude de l'activité antimicrobienne des souches de bactéries lactiques isolées de produits laitiers traditionnels Algériens (Zebda, Lben et Dhan), diplôme de master, universite abou bekr belkaid-tlemcen.88p

Achemchem ,F. (2014). Bactériocines de bactéries lactiques de lait et de fromage de chèvre. Presses academiques Francophones.24p.

Ariech, M.(2020), Microorganismes dans l'industrie agroalimentaire (MIAA),Le cours est destiné aux étudiants de la troisième année. Specialite. Alimentation, nutrition et pathologies (Semestre 6), Université Mohamed BOUDIAF-M'sila, p13.

Assamala Marthe.D, 2015, Étude De Quelques Produits Laitiers De Côte D'ivoire, Mémoire De Master, Université 8 Mai 1945, Guelma. , P25-26.

Atlan, D., Béal, C., Champonier –Vergés, M. C. ,Chapot-Chartier, M. P., Chouayekh, H., Coccagn – Bousquet, M., Deghorain, M., Gadu, P .,Gilbert, C .,Goffin, P., Guédon, E., Guillouard, L., Guzzo J., Juillard, V., Ladero, V., Lindley, N., Lortal, S., Loubière, P. , Maguin, E., Monnet, V., Monnt, V., Rul, F., Tourdot- Maréchal, R., et Yvon, M.,(2008). Métabolisme et ingénierie métabolique In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments Tec & Doc, Lavoisier. Paris.

Axelsson, L. (2004). Classification and physiology In: Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects. Salsinen S., Wright A.V., Ouwehand A. 3e Ed. New York, Marcel Dekker, Inc. 66.

Ayers, S.H., Johnson, W.T. & Davis, B.J., 1918. The thermal death point and limiting hydrogen-ion concentration of pathogenic streptococci. J. Infec. Dis, 23(3), pp.290-300.

-B-

Bahloul .f et Berkat. S, 2018, Coppola, R., Succi, M., Tremont, Reale, P.Salzaano, G, et Sorrentino, E. (2005). Antibiotic Susceptibility Of Lactobacillus Rhamnosus Strains Isolated From Parmigiano Reggiano Cheese. Lait: 85, 193-234.

Barefoot, S.F., Klaenhammer, T.R. 1983. Detection and activity of lacticin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Appl. Environ. Microbiol. 6:1808-1815.

Références bibliographiques

- Bekhouché, F., (2006).** *Bactéries lactiques du lait cru de vache et microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes* : 1. Isolement et identification biochimique. Thèse présentée pour obtenir le grade de docteur en microbiologie et enzymologie, option : génie alimentaire. Université Mentouri Constantine.
- Belhamra .Z, (2017)** croissance et survie des probiotiques en présence des édulcorants et des additifs alimentaires, , Thèse de doctorat, Université Ferhat Abbas sètif 1 , p 8.
- Belil .Y. Chahrour, w, Benabbou.T.A, Benmechernene.Z, Kihal.M,** Valorisation des bactéries lactiques bioactives naturellement présentes dans les légumes fermentés. International Journal of Natural Resources and Environment, ISSN 2710-8724, ISSN 2710-8724., P25
- Belyagoubi, L., Abdelouahid, D.E. 2013.** Isolation, identification and antibacterial activity of lactic acid bacteria from traditional Algerian dairy products. *Advances in Food Sciences.* 35 (1):84-85.
- Bendi.H, SM et Bensalah, Y. (2021).** caractérisation de fromages traditionnels, diplôme de master, université aboubekr belkaid. Tlemcen.
- Benjamin.C, (2016),** les probiotiques (Bactérie et levure): ou en est-on aujourd'hui ?, thèse de doctorat, Université de Montpellier. p44_p59.
- Benreguiég.M, (2015).** Propriétés antibactériennes et probiotiques des bactéries lactiques isolées à partir des vaches, de chèvre et de brebis dans la région de l'Ouest, thèse de doctorat, Université AbdElAhamid ibn badis 'Mostaganem, p41-p43.
- Boudjema K. (2008).** Essai d'optimisation de la production d'acide lactique sur lactisérums par *Streptococcus thermophilus*. Mémoire de magister. Option biochimie et microbiologie appliquées. Université M'Hmed Bougara –Boumerdés.
- Bougaddima.Y, Sebaha.M,(2019).** Isolement et identification des bactéries lactiques à statut probiotique à partir du sardin pilchard, mémoire de master, université abd El Hamid ibn badis, Mostaganem.
- Bouguerrouja.I, Dorouiche.F, Boutine .C (2019).** Contribution à la caractérisation microbiologique et physico-chimique d'une boisson lactique «Ighi», p, mémoire de master, Université Mohamed Elsidik Ben Yahai, djidjle.
- Boumediene. K, 2013,** Recherche des bactéries lactiques productrices des bactériocines et l'étude de leur effet sur des bactéries néfastes, diplôme de Magister, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen.
- Boussekine, R, (2022).** Smen/Dhan, beurre fermenté traditionnel : 1. Enquête sur les méthodes de préparation et de consommation actuelles en Algérie; 2. Identification du microbiote autochtone par la culture dépendante et la culture indépendante; 3. Caractérisation des composés

Références bibliographiques

aromatiques volatils, Thèse de Doctorat 3ème cycle, Université des Frères Mentouri Constantine1.

-C-

Calvez. S, Belguesmia. Y, Kergourley. G. (2009). In bactériocines : de la synthèse aux applications in bactéries lactiques : physiologie, métabolisme, génomique et applications industrielles édition : Economica .2009. p 100-122.

Caste, L.V, 2004.Pratiques Potentielles A Risque De Contamination Pendant La Production Et La Transformation Traditionnelles Du Lait Dans Le Centre De L'ethiopie, Diplome D'etudes Superieures Specialisees Productions Animales En Regions Chaudes.Université Montpellier Ii.L'ethiopie.

Christophe G, François P. S, 2007, Probiotiques : efficacité et dangerosité, D, Hôpitaux universitaires de Genève, 1211 Genève 14, sans page.

-D-

De Man, J.C., Rogosa, M. and Elisabeth Sharpe, M. (1960).A medium for the cultivation of *Lactobacilli*.Journal of Applied Bacteriology, 23, 130–135

Delarras, C. 2007. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire : Aliments, produits cosmétiques, eaux, produits

Desmazeaud M.J. (1998). Bactéries lactiques et qualité des fromages. Qualité sanitaire des produits alimentaires. Laboratoire de recherches laitières. INRA Paris.

Desmazeaud M.J. et Gueguen, (1996). Les bactéries lactiques dans l'alimentation humaine : utilisation et innocuité.Vol.5. P : 331-280.

Djimli.W, Bouachir .M, Benaziza .F, 2019, Etude physico-chimique et microbiologique du produit laitier traditionnel << Zebda >>, mémoire de master,Université Mohammed Seddik Benyahia de Jijel , p8 .

Drouault, S., Corthier, G., Ehrlich DS ET Renault P. (1999).Survival physiology and lysis of *Lactococcus lactis* in the digestive tract. Applied and Environmental Microbiology. 65, 4881-4886.

-F-

Farrow, J.A.E., Facklam, R.C. And Collins, M.D. (1989). Nucleic Acid Homologies Of Some Vancomycin-Resistant *Leuconostocs* And Description Of *Leuconostoc Citreum* Sp. Nov. And

Références bibliographiques

Leuconostoc Pseudomesenteroides Sp. Nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39, pp: 279-283.

Fleming H.P., Etechells J.L. ET Costilow R.N. (1975). Microbiological inhibition of isolate of *Pediococcus* from cucumber brine. *Appl. Environ. Microbiol.* Pp : 1040-1042.

Françoise .K, 2001, Consultation mixte d'experts FAO/OMS sur l'évaluation des propriétés sanitaires et nutritionnelles des probiotiques dans les aliments, y compris le lait en poudre contenant des bactéries lactiques vivantes, Cordoba, Argentine, p09_p11.

-G-

Garrity, G.M.; Holt, J.G, 2001. Taxonomic outline of the Archea and Bacteria. Pages :155 166. In D.R.Boone,R.W. Castenholz (ed) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriologie*, 2eme ed, ed, Vol.1 (The Archea and the deeply bradching and phototropic bacteria). Springer. Verlage, New York. Gevers, D., **Huys, G., et Swings, J., (2001).** Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters* 205:31–36.

Gonzalez, et al., (2007). In **Boudjani, W. (2009).** Action de la flore lactique sur les bactéries contamination. Mémoire d'ingénieur, Institut de biologie, Université de Tlemcen. 73 pages.

-H-

Holzappel W.H., Geisen R. ET Schillinger U. (1995). Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology*. P: 343.

-J-

Jean.C, Février 2005·Effets Des Probiotiques ET Prébiotiques Sur La Flore ET L 'immunité De L'homme Adulte·Afssa Agence Francaise Securite Sanitaire Die Alimente·P37.

Jennifer BURGAIN, Joël SCHER, Claire GAIANI, 2016, LISTE DES BACTÉRIES PROBIOTIQUES, Réf : F3800 v1, sans page.

-K-

Kandler, O. Weiss, N. (1986). ET Genus *Lactobacillus*. In : *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol 2,9 ème ed. Ed. Sneath PHA, Mair N.S., sharpe M.E, Holt J.G. Williams and Wilkins, Baltimore USA.

Références bibliographiques

Karam, HZ et Karam, NE. (2006). Bactéries lactiques du lait de chamelle d'Algérie: mise en évidence de souches de *Lactococcus* résistantes au sel, Article, Tropicultura, 2006, 24, 3, 153-156

Kassas.Z (2017), croissance de souche de bactérie lactique d'intérêt technologiques et/ou probiotique. Sur MRS végétal modifié, thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba.

Khater et Ghedar, M. (2017). Dénombrement et caractérisation de la flore lactique et la flore de contamination du « Jben » traditionnel fabriqué par des coagulants de nature végétale. Mémoire de MASTER, UNIV. Abou Beker Belkaid, Tlemcen.

Khedid, K., Faid, M., Mokhtari, A., Soulaymani, A., Zinedine, A. 2009.Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. 1:81 91.

König, H. ET Fröhlich, J. (2009). Lactic acid bacteria In König, H., Uden, G. ET Fröhlich, J., biology of microorganisms on Grapes, in Must and in Wine. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg* : 24.

Konté .M, (février 1999).Le lait et les produits laitiers. Document du développement de systèmes de production intensive en Afrique de l'ouest, Sénégal, 25 pages.

-L-

Labioui H., Elmoualdi L., El Yachioui M. et Ouhssine M., (2005). Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.* 144: 237-250. *Lactobacillus sp. TGR-2* isolated from *Growol. Indonesian.Food Nutr.Prog.*3 (2): 29-34

Labioui, H., Elmoualdi, L., Benzakour, A., El Yachioui, M., El Hassan Berny, E.H., Ouhssine M. (2009).Etude physicochimique et microbiologique de lait cru. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.* 148:7-16.

Larpent J.P., (1997). Microbiologie Alimentaire. *Tec & Doc, Lavoisier.* Paris. 10-72.

Lou Le .R, 2022, Les Aliments Fermentés Et Le Syndrome De L'intestin Irritable, Thèse Pour Le Diplôme D'état De Docteur En Pharmacie, Université Clermont Auvergne Faculté De Pharmacie. P90.

-M-

Maghnia.D, 2011, Étude De Potentiel Technologique Des Bactéries Lactiques Isolées Des Aliments Fermentés Traditionnels Algériens, Mémoire De Magister, Université d'Oran-Es-Senia. , p8.

Références bibliographiques

Mami, A .et Kihal, M. (2019) Activité anti-bactérienne de *Lactobacillus plantarum*: Le bio contrôle des bactéries d'altération alimentaire par les bactéries lactiques du genre *Lactobacillus*. Universitaires européennes.

Mami .A,2013,Recherche Des Bactéries Lactiques Productrices De Bactériocines À Large Spectre D'action Vis-à-vis Des Germes Impliqués Dans Les Toxi-infections Alimentaires En Algérie, Thèse De Doctorat, Laboratoire De Microbiologie Appliquée, Université D'Oran ,P 122.

Matallah.A, (2017) ,contribution à l'étude des potentialités technologie des souches isolée des produits laitiers traditionnelle Algériens.Diplôme de Master, Université de telmecen. p8-10.

Mennane, Z, Khedid, K. Zinedine, A., Lagzouli, M., Ouhsine M and ' . Elyachiou M.,2007,Microbial Characteristics of Klila and Jben Traditionnal Moroccan Cheese from Raw Cow's Milk,p24,World Journal of Dairy & Food ScienCe2 (1): ISSN 1817-308X,p24.

Muriel. M, 2013, Conséquences D'un Stress Chronique Sur La Barrière De Mucus Intestinal Chez Le Rat: Effet Du Probiotique *Lactobacillus Farciminis*,, These De Doctorat, L'universite De Toulouse.,P90.

-N-

Niamh T.Áine M.Séamus F. Declan B,2009, Transfer Of Antibiotic Resistance Marker Genes Between Lactic Acid Bacteria In Model Rumen And Plant Environments, Appl Environ Microbiol.75(10): 3146–3152.

-P-

Patrick, T.(2001). Les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y a près de 3 milliards d'années. Mini-revue. Unité de Recherches Laitières et Génétique Appliquée, INRA, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas Cedex, France.

Prescott, L.M., Harley, J.P. and Donald, A. (2003). Microbiologie, De boeck université, 2eme édition française. 128: 28-29.

-S-

Schleifer, K.H. (1986). Gram-positive cocci. Dans: bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams ET Wilkins, Baltimore, 2, pp: 999-1002.

Schleifer, K.H., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Bälz, R., Collins, M.D. And Fischer, W. (1985). Transfer of *Streptococcus lactis* and related Streptococci to the genus *Lactococcus* gen. Nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 6, pp: 183-195. 149.

Références bibliographiques

Siegumfeldt, H. Rechinger, KB. 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.

-T-

Tahlaiti .H, 2009, Etude Des Propriétés Technologiques Et Inhibitrices De Bactéries Lactiques Isolées A Partir De Blé Fermenté, universite abdelhamid ibn badis mostaganem, P124.

Temmerman R., Pot B., Huys G. Et Swings J., (2003), Identification And Antibiotic Susceptibility Of Bacterial Isolates From Probiotic Products. *Int. J. Food Microbio.* 81: 1-10.

Terzagli BE and Sandine WE (1975) ,Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied Microbiology*, 29 : 807-813.

Teuber Et Al., 1999, Salyers Et Al., 2004. Maria Et Al., 2010- Veterinary Use And Antibiotic Resistance. *Current Opinion In Microbiology.* 4 (5), 493-499.

-V-

Vlková. E., Rada.V. Popelářová.P.Trojanová.I, Killer.J, 2006. Antimicrobial Susceptibility Of Bifid Bacteria Isolated From Gastrointestinal Tract Of Calves. *Livestock Science*, P. 105, 253-259.

-Y-

Yahla.I, 2007, Effets anti-obésité et anti-inflammatoires de certaines bactéries probiotiques associées ou non aux isomères conjugués de l'acide linoléique, these de doctorat, universite djillale liabes ,sidi bel abbes. p19.

-Z-

Zergoug.A, 2017, Effet des probiotiques et bactériocines vis-à-vis des pathogènes responsables des infections urinaires, thèse de doctorat, universite abdelhamid benbadis-mostaganem.

-SITE WEB-

<https://m.indiamart.com/proddetail/bifidobacterium-longum19237967948.html> 15:29 06/05/2023.

<https://fr.scienceforhealth.be/mecanismes-daction/> 6:16am_03/05/2024.

<http://lelabodanissa.blogspot.com/2015/02/chapitre-1-la-contamination-par-les.html>?m=1 8:34 am 04/05/2023.

<https://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v25/i18/WJG-25-2188-g001.htm> 4:10 Am 04/05/2023.

Annexes

1. Coloration de Gram

Les frottis fixés à chaud ont été colorés au cristal violet pendant une minute, puis rincés vivement à l'eau distillée, traités avec la solution de Lugol pendant une minute, puis rincés à nouveau vivement à l'eau distillée. Les frottis colorés ont ensuite été traités avec de l'éthanol à 95 % pour le soumettre à une étape de décoloration. C'est l'étape critique : gardez la lame inclinée et faites couler le solvant sur le frottis pendant seulement 15 à 30 secondes jusqu'à ce que le colorant cesse de s'écouler librement du frottis. Puis rincez immédiatement à l'eau distillée. A ce stade, les cellules Gram- seront incolores et les cellules Gram+ seront violettes. Le frottis est ensuite contre-coloré avec Fushin (ou Safranin) pendant 10 à 30 secondes pour colorer les cellules Gram présentes. Après un bref rinçage à l'eau distillée, sécher le frottis avec du papier absorbant ou la flamme d'un bec Bunsen et examiner avec un objectif à immersion (X 100). Avec cette coloration double, les bactéries « Gram-positif » apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries « Gram-négatif » sont colorées en rose ou en rouge (Delarras, 2007).

2. Identification biochimique par les Galerie API 50CH avec API 50 CHL medium (bioMerieux, Marcy l'étoile, France)

L'ensemencement et la lecture de la galerie ont été réalisés selon les instructions du fabricant. Ils se font de la façon suivante:

- Cultiver des souches pures sur milieu MRS gélosé pendant 24 heures à 30°C.
- ouvrir une ampoule de milieu de suspension (2 ml), utiliser un écouvillon pour éliminer toutes les colonies de la culture et former une suspension dense dans l'ampoule.
- Ouvrir une ampoule de milieu de suspension (5ml) et atteindre une opacité égale à 2 McFarland en transférant un nombre de gouttes de la première suspension en notant le nombre de gouttes (n).
- ouvrir les ampoules de milieu API 50 CHL, ensemencer 2 fois le nombre de gouttelettes trouvées (2n), homogénéiser.
- Répartir l'API 50 CHL ainsi ensemencé dans des petits tubes et recouvrir d'huile de paraffine stérile.
- Pendant une période de 48 heures, le processus d'incubation doit être effectué en aérobiose à une température de 30°C.

- Les tests sont lus à deux intervalles de temps précis : 24 et 48 heures. Au cours de ce processus, chaque tubule est soigneusement examiné pour déterminer l'étendue de l'acidification qui s'est produite. La présence d'acidification provoque un changement de couleur du violet au jaune dans le milieu contenant du bromocrésol. Dans le cas du test à l'esculine, le changement de couleur est du violet au noir.
- Documenter les résultats qui ont été atteints.
- Le profil biochimique obtenu à partir de ce procédé peut être analysé à l'aide du logiciel d'identification APILAB, développé par bioMérieux à Marcy l'étoile, France. **(Benrguig,2015).**

3. Composition des milieux de culture utilisés

- **TSE (Tryptone-Sel –Eau)**

Tryptone 1g

Na Cl 8,5g

Eau distillée qsp 1L

- **Le milieu MRS (Mac-Rogosa Sharpe 1960)**

Peptone 10g

Extrait de viande 5g

Extrait de levure 5g

D(+) Glucose 20g

Acétate de sodium 5g

Citrate d'ammonium 2g

Acétate de sodium 5g

KH₂PO₄ 2g

MgSO₄ 0.1g

MnSO₄ 0.05g

Agar 12g

Tween 80 1ml

Eau distillée 1000 ml

pH 6.5 ± 0.2

Autoclavage à 121°C pendant 15min.

▪ **Bouillon nutritif**

Peptone 15g

Extrait de levure 3g

D(+) Glucose 1g

Nacl 6g

Eau distillée 1000ml

pH 7.5 ± 0.2

Autoclavage à 121°C pendant 15min.

▪ **Gélose nutritive**

Peptone 15g

Extrait de levure 3g

D (+) Glucose 1g

Nacl 6g

Agar 23g

PH 7.5 ± 0.2

Eau distillée 1000ml

Autoclavage à 121°C pendant 15min

Milieu Mueller-Hinton (Mueller et Hinton, 1941)

Infusion de viande de boeuf 3000 cm³

Peptone de caséine 17,5 g

Amidon de maïs 1,5 g

Agar-agar 17 g

pH=7.4

Autoclavage 120°C, 20 min

Milieu M17 (Terzaghi et Sandine. 1975)

Lactose 5 g

Peptone tryptique de caséine 2,5 g

Peptone pepsique de viande 2,5 g

Peptone de soja 5,0 g

Extrait de levure des hydrates 2,5 g

Extrait de viande 5,0 g

Glycérophosphate de sodium 19,0 g

Sulfate de magnésium, 7H₂O 0,25 g

Acide Ascorbique 0,50 g

Agar- Agar 15 g

Eau distillée 1000 ml

pH = 7.1 – 7.2.

Dissoudre les ingrédients dans l'eau à l'ébullition, laisser refroidir à 50 °C

Lait écrémé

Lait écrémé 10g

Extrait de levure 0,5g

Eau distillée 100ml

Stérilisation à 120° C pendant 10min

Glycérol (30%)

Composition des solutions de titrage

• Solution de NaOH 0,1N :

Eau distillé 1L

NaOH 40g

• Solution de HCl 1N :

Eau distilé 100ml

Hcl 4ml