

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

Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

En vue de l'obtention du Diplôme de Master en Biologie

Option

Sciences des aliments

Présenté par

M^{elle} **ABID Zoulikha**

Intitulé

**Étude de l'activité antimicrobienne des souches de bactéries lactiques
isolées d'un produit laitier traditionnel Algérien «*Jben*»**

Soutenu le **02 / 07 / 2015** devant le jury composé de:

| | | |
|---------------------------------|---|--------------|
| M. ABDELOUAHID D. E. | Professeur à l'Université de Tlemcen | Président |
| M. LAZOUNI H. A. | Maître de Conférences A à l'Université de Tlemcen | Examineur |
| M ^{me} . BELYAGOUBI N. | Maître de Conférences A à l'Université de Tlemcen | Examinatrice |
| M. BELYAGOUBI L. | Maître de Conférences B à l'Université de Tlemcen | Promoteur |

Année universitaire: **2014 / 2015**

Dédicace

Avec l'aide de Dieu, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie À :

*Mes chers parents, pour leurs dévouements,
leurs amours, leurs sacrifices et leurs encouragements jusqu'au
bout, que Dieu leur accorde une longue vie et encore une fois*

Merci !!

*À la source de la tendresse de patience et de générosité,
ma mère "Arab Ilham".*

*À mon père "Ahmed," qui m'a appris que la patience est
le Secret du succès.*

Mes chères frangines : Awatef et Adila

Mon seul frère : Mohamed Islam

Toute ma grande famille surtout mon grand père et ma Mimi.

Mes cousines et ma tante Nadjia que je l'aime beaucoup.

À la mémoire de mes grands parents maternels.

A toutes mes camarades et mes très chères amies:

Wafae et Samira

*Enfin à toutes les personnes qui comptent pour moi, intervenues dans
ma vie à un moment ou à un autre et qui m'ont accompagné et
soutenu.*

Et

Tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer

Zoukha



Remerciements

Un mémoire, tant nominatif soit il, est un travail de réflexion collective, donc au terme de ce travail, il m'est à la fois un plaisir et un devoir de remercier sincèrement toutes les personnes qui ont participé à sa réalisation.

Avant tout, je remercie Le *BON DIEU* le tout puissant de nous avoir donné le courage, la volonté et la patience pour achever ce modeste travail.

Mon vif remerciement et ma profonde gratitude s'adressent à mon encadreur M^r *Belyagoubi. L.*, qui a accepté m'encadrer, je le remercie infiniment pour sa grande patience, ses encouragements, son aide et ses conseils judicieux, durant la réalisation du présent travail.

Mes remerciements vont également aux membres de jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail, au président M^r *Abdelouahid*, au examinateur: M^r *Lazouni*, et en particulièrement à M^{me} *Belyagoubi. N.*, Je la remercie vivement pour ses conseils et ses corrections lors de la rédaction.

Je tiens à remercier l'ensemble du personnel travaillant au laboratoire du département de Biologie pour leur soutien technique et leur bonne humeur, sa gentillesse et sa grande disponibilité et confiance surtout M^r *Habi Salim* et M^{me} *Farouani*.

Je remercie ma famille pour leurs aides durant mes études et leurs soutiens. Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à tous mes proches, toutes mes amies qu'on a travaillé ensemble, qui m'ont toujours soutenues et encouragées au cours de la réalisation de ce mémoire.

Toutes les personnes qui ont contribuées de près et de loin.

Merci 

ملخص

تستخدم بكتيريا حمض اللاكتيك في التخمير وحفظ الأغذية العضوية مع إنتاج أحماض عضوية ومواد مضادة للبكتيريا أخرى مثل bacteriocine من خلال منع بعض السلالات المسببة للأمراض. من أجل إظهار التأثير الكابح لهذه البكتيريا، درسنا قوة معادية من 16 سلالات معزولة من منتجات الألبان الجزائرية التقليدية "الجبن" وجها لوجه لثمانية سلالات مسببة للأمراض:

(Escherichia coli, Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Micrococcus lutus Bacillus cereus, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans).

تم إحصاء و عد كل الميكروبات الموجودة في منتجات الألبان التقليدية في الأوساط التالية:
PCA، (5.6, 6.2) MRS، M17. حيث كانت مرتفعة جدا في العينات الثلاثة و وصلت إلى: $(4,37 \times 10^6 \text{ UFC/g})$
في درجة حرارة 30°C احصينا: $(213 \times 10^6 \text{ CFU / g})$ وفي 45°C وصل العدد إلى $(19,7 \times 10^6 \text{ CFU / g})$.
وقد أدت تفاعلاتها إلى ظهور منطقة تثبيط كبيرة بقطر تتوع ما بين 10-30 ملم. أظهرت النتائج أن هذه العوامل احتمال أن تكون bacteriocine. هناك حاجة لإجراء مزيد من الفحوصات لتحديد الطبيعة الدقيقة للمثبطات.
ان منتجات الألبان التقليدية هي مصدر للسلالات الجديدة المضادة للميكروبات.

الكلمات المفتاحية : منتوج اللبن التقليدي، الجبن، اليكتيريا اللبنية ، اليكتيريا المرضة ، التضاد.

Résumé

Les bactéries lactiques sont utilisées dans la fermentation et la bioconservation des aliments grâce à la production des acides organiques et d'autres substances antibactériennes telles que les bactériocines en inhibant certaines souches pathogènes.

Dans le but de mettre en évidence l'effet inhibiteur de ces bactéries, nous avons étudié le pouvoir antagoniste de 16 souches isolées d'un produit laitier Algérien traditionnel le "Jben" qui est un fromage frais vis-à-vis de sept souches pathogènes (*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus lutus*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et la levure *Candida albicans*).

Des dénombrements de la flore mésophile totale et de la flore lactique de ce produit laitier traditionnel ont été effectués sur les milieux PCA, MRS, M17 où la charge de la flore mésophile totale est très élevée dans les trois échantillons atteint jusqu'à ($4,37 \times 10^6$ UFC/g), et celle de bactéries lactiques est remarquable dans l'échantillon 2 et 3 qui atteint à 30°C une charge de (213×10^6 UFC/g) et à 45°C ($19,7 \times 10^6$ UFC/g).

Leurs interactions ont conduit à l'apparition de zones d'inhibition importantes d'un diamètre qui varie entre 10 à 30 mm.

Les résultats obtenus ont montré que ces agents sont probablement des Bactériocines. Des tests supplémentaires ont été nécessaires pour connaître la nature exacte des agents inhibiteurs.

Les produits laitiers traditionnels constituent une source de nouvelles souches antimicrobiennes.

Mots clés : produit laitier traditionnel, Jben, Bactéries lactiques, Bactéries pathogènes, Antagonisme.

Abstract

Lactic acid bacteria are used in the fermentation and organic food preservation with the production of organic acids and other antibacterial substances such as bacteriocins by blocking some pathogenic strains.

In order to demonstrate the inhibitory effect of these bacteria, we studied the antagonistic power of 16 strains isolated from a traditional Algerian dairy product "Jben" overlooked seven pathogenic strains (*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus lutus*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and the yeast *Candida albicans*).

Counts of the total mesophilic lactic flora and fauna of traditional dairy products were performed on the PCA media, MRS, M17 were the burden of total mesophilic flora is very high in the three samples reached up ($4,37 \times 10^6$ CFU / g), and the lactic acid bacteria is remarkable in sample2 and 3. At 30 ° C the charge is of (213×10^6 CFU / g) and in 45 ° C ($19,7 \times 10^6$ CFU / g).

Their interactions have led to the appearance of significant inhibition zone with a diameter which varied between 10 to 30 mm. The results showed that these agents are likely bacteriocins. Additional tests were needed to determine the exact nature of the inhibitors.

The traditional dairy products are a source of new antimicrobial strains.

Key words: traditional dairy product, Jben , Lactic acid bacteria , pathogenic bacteria , Antagonism.

SOMMAIRE

| | Page |
|------------------------------|------|
| Dédicace..... | I |
| Remerciements..... | II |
| ملخص..... | III |
| Résumé | IV |
| Abstract | V |
| Sommaire | VI |
| Liste des tableaux | X |
| Liste des figures | XI |
| Liste des photos..... | XII |
| Liste des abréviations | XIII |

Introduction

Partie bibliographique

| | |
|---|---|
| <i>Chapitre I : : Lait et produits laitiers traditionnels</i> | 2 |
| I.1. Lait | 2 |
| I.1.1- Définition | 2 |
| I.1.2- Composition du lait..... | 2 |
| I.1.3- Caractéristiques physiques et chimiques du lait | 2 |
| I.1.4- La microflore du lait | 3 |
| I.1.4.1- Flore originale | 3 |
| I.1.4.2- Flore pathogène..... | 3 |
| I.1.4.3- Flore psychrotrophe..... | 3 |
| I.2- les produits laitiers traditionnels | 4 |
| I.2.1- Rayeb | 4 |
| I.2.2- Lben..... | 5 |
| I.2.3-Bouhezza..... | 5 |
| I.2.4-Takammarit..... | 6 |
| I.2.5-Dhan..... | 6 |
| I.2.6-La crème, La zebda ou beurre frais | 6 |

| | |
|--|----|
| I.2.7- Lghaunane..... | 6 |
| I.2.8-la <i>Klila</i> | 6 |
| I.2.9- Jben..... | 7 |
| I.2.9.1- Préparation du fromage frais | 7 |
| I.2.9.2- Caractéristiques physiques et chimiques du Jben | 10 |
| I.2.9.3- Microflore de Jben | 10 |
| Chapitre II : Les bactéries lactiques | 11 |
| II.1. Définition | 11 |
| II.2. Classification | 11 |
| II.2.1. Le genre <i>Lactobacillus</i> | 12 |
| II.2.2. Le genre <i>Streptococcus</i> | 12 |
| II.2.3. Le genre <i>Lactococcus</i> | 13 |
| II.2.4. Le genre <i>Leuconostoc</i> | 13 |
| II.2.5. Le genre <i>Bifidobacterium</i> | 13 |
| II.3- Intérêts technologiques des bactéries lactiques | 14 |
| II.3.1-Activité acidifiante (production d'acide lactique)..... | 14 |
| II.3.2-Activité protéolytique..... | 14 |
| II.3.3-Pouvoir aromatisant et pouvoir gazeux | 15 |
| II.3.4-Activité bactériostatique (production de bactériocines) | 15 |
| II.3.5-Propriété probiotique | 15 |
| II.3.5.1-Les bactéries probiotiques | 15 |
| II.3.5.2- Rôle d'un probiotique..... | 16 |
| Chapitre III : Substances antimicrobiennes | 17 |
| III.1- Les acides organiques | 17 |
| III.2. Peroxyde d'hydrogène | 17 |
| III.3. Les bactériocines | 17 |
| III.3.1-Classification des bactériocines..... | 18 |
| III.3.2- Mécanisme d'action..... | 19 |
| <i>Matériel et méthodes</i> | |
| 1. Origine des échantillons et prélèvements | 20 |
| 2. Procédé de fabrication du «Jben» traditionnel :..... | 21 |

| | |
|---|----|
| 3. Détermination du pH du « Jben » | 22 |
| 4. Dénombrement de la flore mésophile totale | 22 |
| 5. Isolement des bactéries lactiques | 22 |
| 6. Mode De Calcul..... | 23 |
| 7. Conservation des souches..... | 23 |
| 8. Identification des bactéries lactiques | 23 |
| 8.1. Tests morphologiques | 24 |
| 8.1.1- Coloration de Gram | 24 |
| 8.1.2- Test état frais | 24 |
| 8.2. Test biochimiques | 24 |
| 8.2.1-Test catalase | 25 |
| 8.2.2. Test oxydase | 25 |
| 8.2.3. Urée-Indole | 25 |
| 8.2.4. Milieu Clark et Lubs..... | 25 |
| 8.2.5- Milieu Mannitol-mobilité | 25 |
| 8.2.6-Milieu TSI | 26 |
| 8.2.7-Milieu Citrate | 26 |
| 8.2.8. Effet de NaCl, de temperature et du pH | 26 |
| 8.2.9-Thermorésistance | 26 |
| 8.2.10- Galerie API 20E | 27 |
| 9. Interactions microbiennes | 27 |
| 9.1- Interaction bactéries lactiques /bactéries pathogènes | 28 |
| 9.1.1-Préparation des précultures des bactéries tests (pathogènes) | 28 |
| 9.1.2-Méthode d'inhibition bactérienne en gélose superposée (double gélose) | 28 |
| 9.2. Recherche de substances inhibitrices de nature protéique : | 28 |

Résultats et discussion

| | |
|--|----|
| I. pH des échantillons | 30 |
| II. Dénombrement de la flore mésophile totale | 30 |
| III. Isolement des bactéries lactiques | 32 |
| IV. Identification des souches | 34 |
| IV.1. Examen macroscopique | 34 |
| IV.2. Examen microscopique | 36 |
| IV.3. Tests de température, pH, NaCl et Thermorésistance | 37 |

| | |
|---|----|
| IV.4. Tests biochimiques classiques | 40 |
| IV.5. Résultats du test des sucres galeries API 20 ^E | 42 |
| V. Résultats d'activité antimicrobienne | 45 |
| V.1. Antagonisme bactéries lactiques et microorganismes pathogènes | 45 |
| V.1.1. Antagonisme bactéries lactiques / <i>Escherichia coli</i> | 45 |
| V.1.2. Antagonisme bactéries lactiques / <i>Listeria monocytogenes</i> | 46 |
| V.1.3. Antagonisme bactéries lactiques / <i>Staphylococcus aureus</i> | 46 |
| V.1.4. Antagonisme bactéries lactiques / <i>Micrococcus lutus</i> | 47 |
| V.1.5. Antagonisme bactéries lactiques / <i>Bacillus cereus</i> | 48 |
| V.1.6. Antagonisme bactéries lactiques / <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 48 |
| V.1.7. Antagonisme bactéries lactiques / <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 49 |
| V.1.7. Antagonisme bactéries lactiques / <i>Candida albicans</i> | 49 |
| V.2. Résultats de la recherche de substances inhibitrices de nature protéique | 50 |

Conclusion

Références bibliographiques

Annexe

Liste des tableaux

| | Page |
|--|-------------|
| Tableau 01 : Composition du lait chez divers mammifères | 2 |
| Tableau 02 : Flore microbienne du lait | 4 |
| Tableau 03 : les caractéristiques physico-chimiques du « lben »artisanal | 5 |
| Tableau 04 : Les différents genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques | 14 |
| Tableau 05 : Classification des bactériocines de bactéries lactiques | 18 |
| Tableau 06 : Bactériocines de classe III produites par des bactéries lactiques | 19 |
| Tableau 07 : Situation géographiques des stations d'échantillonnage..... | 20 |
| Tableau 08 : Caractéristiques des échantillons du « Jben » prélevés | 21 |
| Tableau 09 : Origine des souches utilisées dans les tests d'activité antimicrobienne..... | 27 |
| Tableau 10 : Aspects macroscopiques et milieux d'isolement des souches | 35 |
| Tableau 11 : Résultats des tests catalase, oxydase et coloration de Gram et aspect microscopique des souches..... | 36 |
| Tableau 12 : Tests de température, pH, NaCl et Thermorésistante..... | 38 |
| Tableau 13 : Résultats des tests biochimiques classiques d'identification des souches isolées | 40 |
| Tableau 14 : Résultats des tests biochimiques de la galerie API 20 E | 43 |

Liste des figures

| | Page |
|---|------|
| Figure01- Schéma de fabrication des produits laitiers traditionnels | 9 |
| Figure 02- procédé de fabrication de « jben » | 21 |
| Figure 03- les valeurs de pH des trois échantillons..... | 30 |
| Figure04- Dénombrement de la flore mésophile totale à 30°C..... | 31 |
| Figure05- Dénombrement des bactéries lactiques à 30°C..... | 32 |
| Figure06- Dénombrement des bactéries lactiques à 45°C..... | 33 |
| Figure 07- Schéma de différenciation entre les bactéries lactiques | 44 |
| Figure08 Résultats des interactions entre les souches des bactéries Lactiques et <i>Escherichia coli</i> | 45 |
| Figure09- Résultats des interactions entre les souches des bactéries lactiques et <i>Listeria monocytogenes</i> | 46 |
| Figure10- Résultats des interactions entre les souches des bactéries lactiques et <i>Staphylococcus aureus</i> | 46 |
| Figure11- Résultats des interactions entre les souches des bactéries lactiques et <i>Micrococcus luteus</i> | 47 |
| Figure12- Résultats des interactions entre les souches des bactéries lactiques et <i>Bacillus cereus</i> | 48 |
| Figure13- Résultats des interactions entre les souches des bactéries lactiques et <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 48 |
| Figure14. Interactions entre les souches de bactéries lactiques et <i>Klebsiellapneumoniae</i> | 49 |
| Figure14. Interactions entre les souches de bactéries lactiques et <i>Candida albicans</i> | 49 |

Liste des photos

| | Page |
|--|-------------|
| Photo01. Produit laitier traditionnel « Jben » | 20 |
| Photo02. Dénombrement de la flore mésophile totale sur le milieu P.C.A à 30°C | 31 |
| Photo03. Dénombrement de la flore lactique sur le milieu MRS _{5,6} et M17 à 30°C | 34 |
| Photo04. Observations microscopiques de bactéries lactiques | 37 |
| Photo05. Effet de pH sur la croissance de bactéries lactiques isolées | 39 |
| Photo06. Test de Citrate de Simmons..... | 41 |
| Photo07. Test de Mannitol Mobilité..... | 41 |
| Photos08. Test de TSI..... | 42 |
| Photo09 .Résultat de la galerie API20 E..... | 42 |
| Photo 10. résultat d'antagonisme | 50 |
| Photo11 : Résultat du test de la recherche de substances inhibitrices de nature protéique après incubation de 37 °C pendant 24 h..... | 51 |

Liste des abréviations

| | |
|---------------|-----------------------------------|
| °D: | degré Dornic |
| DLC: | Date Limite de Consommation |
| DO: | densité optique |
| Ech: | Echantillon |
| FAO: | Food and Agriculture Organisation |
| JM: | Jben de Méchria |
| JB: | Jben d'El-Bayadh |
| KDa: | kilodalton |
| MRS: | Man–Rogosa–Sharpe |
| OMS: | Organisation mondiale de la santé |
| P.C.A: | Plate Count Agar |
| pH: | potentiel d'Hydrogène |
| RM : | rouge de méthyle |
| S: | Souche |
| UFC : | Unité Formant Colonie |
| VP: | La réaction de Voges Proskauer |

Introduction

Le lait est un produit indispensable à l'équilibre de l'alimentation humaine. Il contient de nombreux nutriments qui fortifient notre organisme : protéines, glucides, lipides, sels minéraux, vitamines et oligo-éléments. Le lait fut de tous temps un symbole de fertilité, de richesse et d'abondance. Il représente un milieu biologique fortement altérable par voie microbienne en raison de sa forte teneur en eau, de son pH voisin de la neutralité et de sa richesse en composants biodégradables (lactose, protéines et lipides) (**Huyghebaert, 2006**).

L'Algérie a une tradition des produits laitiers bien établie, transmise de génération en génération, qui a un aspect important de la culture algérienne. Les femmes algérienne comme toutes les cultures pastorale, ont toujours été les principales protagonistes auteurs de la transformation de lait. (**Claps et Morone, 2011**).

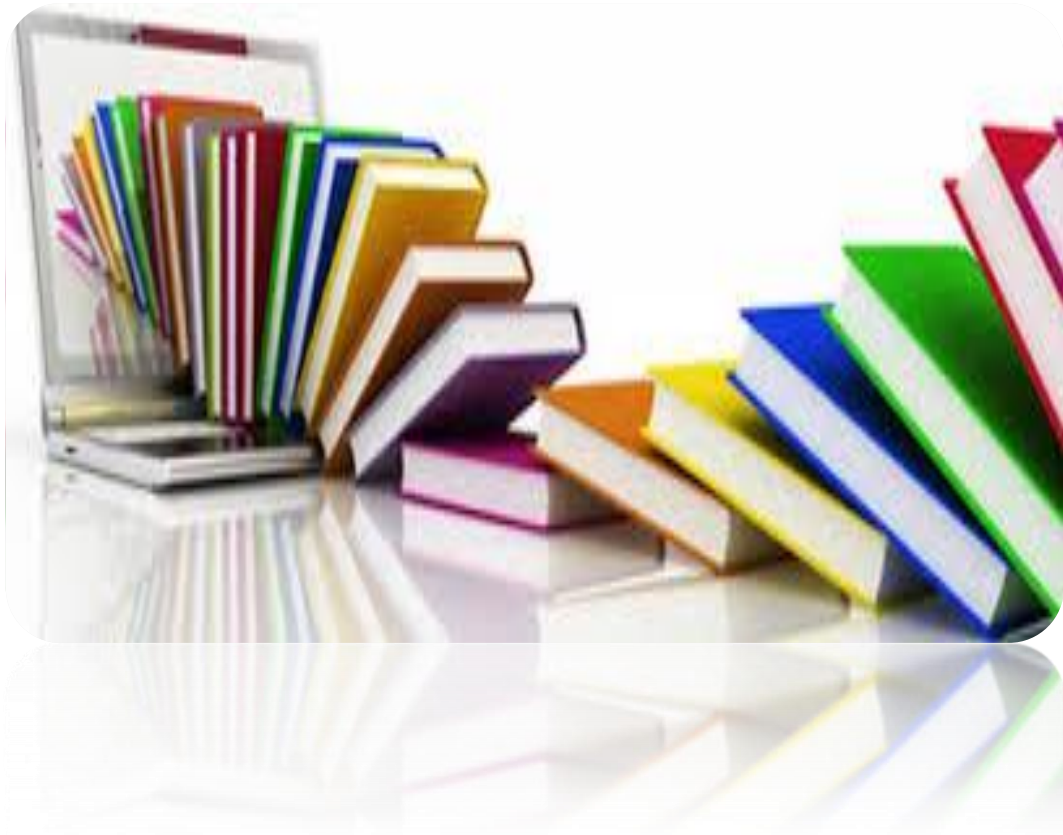
Cette transformation se fait par l'intermédiaire des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques présentent un grand intérêt dans l'industrie. Elles assurent non seulement des caractéristiques particulières d'arômes et de texture mais aussi une bonne sécurité alimentaire. Cette sécurité est favorisée grâce à la production des acides organiques (acides lactiques et acétiques), qui font baisser le pH dans le milieu, et par la synthèse de bactériocines qui renforce cette conservation (**Bekhouche et Boulahrouf, 2005**).

En Algérie, le lait cru est transformé par des méthodes traditionnelles en fromage frais "Jben", et autres produits laitiers. Ces produits retiennent leurs qualités désirables même après une longue conservation à température ambiante.

L'objectif de notre travail est d'isoler, purifier et identifier des souches de bactéries lactiques à partir d'un produit laitier traditionnel à base de lait de vache qui est le "Jben" de la région de Méchria et d'El-Bayadh, et de tester leur pouvoir antimicrobien dans le but de sélectionner des souches inhibitrices possédant un pouvoir inhibiteur contre les germes pathogènes afin de préserver la santé et l'hygiène publique.

Synthèse bibliographique



I.1. Lait

I.1.1- Définition :

C'est en 1909 que le Congrès International de la Répression des Fraudes a défini le lait comme étant : « le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum » (**Larpen et al., 1997**).

Le lait sans indication de l'espèce animale de provenance correspond au lait de vache (**Larpen et al., 1997**).

Le lait apparaît comme un liquide opaque, blanc mat, plus moins jaunâtre selon sa teneur en β -carotènes et en matière grasse. Il a une odeur peu marquée mais reconnaissable (**Cniel, 2006**).

I.1.2- Composition du lait

Le lait est un substrat très riche, fournissant à l'Homme et aux jeunes mammifères un aliment presque complet (**Larpen, 1997**). Il contient une forte proportion d'eau environ 87%. Le reste est représenté par l'extrait sec (environ 130g par litre). Les principaux constituants de cet extrait sec sont : les lipides, les glucides, les protides, les vitamines et les éléments minéraux (Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Cl^-) (**Vimahieu, 2005**).

Tableau 01 : Composition du lait chez divers mammifères (**Dillon, 2008**).

| Composition moyenne du lait (g/l) | | | | | | | | |
|--|-----|-------------|----------------|-----------|---------|----------|-------------------|--------------------|
| | Eau | Extrait sec | Matière grasse | Protéines | | | Glucide : lactose | Matières minérales |
| | | | | totale | caséine | albumine | | |
| Equidés | | | | | | | | |
| Jument | 925 | 100 | 10-15 | 20-22 | 10-12 | 7-10 | 60-65 | 3-5 |
| Anesse | 925 | 100 | 10-15 | 20-22 | 10-12 | 9-10 | 60-65 | 4-5 |
| Ruminante | | | | | | | | |
| Vache | 900 | 130 | 35-40 | 30-35 | 27-30 | 3-4 | 45-50 | 8-10 |
| Chèvre | 900 | 140 | 40-45 | 35-40 | 30-35 | 6-8 | 40-45 | 8-10 |

I.1.3- Caractéristiques physiques et chimiques du lait :

Les principales propriétés physico-chimiques du lait sont représentées par sa densité, son point de congélation, son point d'ébullition et son acidité.

Sur le plan physique, c'est à la fois une solution (lactose, sels minéraux), une suspension (matières azotées) et une émulsion (matières grasses). Son pH est légèrement acide (pH compris entre 6.5 et 6.8 pour le lait de vache et entre 6.2 et 6.82 pour le lait de chèvre). Par contre, il est légèrement basique pour le lait humain (pH compris entre 7 et 7.5), l'acidité du lait augmente avec le temps suite à la transformation du lactose en acide lactique. Cette acidité permet d'avoir un indicateur du degré de conservation. Pour cela, on utilise le degré Dornic (°D) (Dillon, 2008; Hebboul et al., 2005).

I.1.4- Microflore du lait

Le lait contient peu de micro-organismes lorsqu'il est prélevé dans des bonnes conditions, à partir d'un animal sain (moins de 5000 germes/ml) (Larpent, 1997).

Dans des conditions de propreté et d'hygiène normale, le lait cru renferme de nombreux germes constituant la flore originale. Cette microflore est représentée essentiellement par des lactobacilles et des streptocoques lactiques commensaux provenant du pis et des canaux galactophores (Hermier et al., 1992).

Le lait cru peut être contaminé par différents microorganismes avant, pendant et après la traite ; selon Betsi et al., (1997) in Chaouch et Tebichek (2001) ils peuvent être classés dans les flores suivantes :

I.1.4.1- Flore originale

Lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions, le lait contient essentiellement de germes saprophytes du pis et des canaux galactophores : Microcoques, Streptocoques lactiques et lactobacilles (Guiraud, 1998).

I.1.4.2- Flore pathogène

Elle présente un danger pour le consommateur c'est le cas de : *Mycobacterium bovis*, *M. tuberculosis*, *Bacillus cereus*, et des représentants des genres *Brucella* et *Salmonella* (Fukushima et al., 1984 in Bourgeois et al., 1996).

I.1.4.3- Flore psychrotrophe

Il s'agit essentiellement de : *Acinetobacteres*, *Clostridium*, *Pseudomonas* et *Flavobacterium* qui se développent à une température de 3 à 7°C (Hicks et al., 1985; Jooste et al., 1985 in Leveau et Bouix, 1993). *Listeria monocytogenes* est capable de se multiplier à

une température comprise entre 0°C et +10°C est qualifiée de ce fait de psychrotrophe (Rosset, 2001).

Tableau 02 : Flore microbienne du lait (Leyral et Vierling, 2001).

| Flore originale | | Flore de contamination | |
|--|--|---|--|
| Bactéries des canaux galactophores | Bactéries contaminant le lait pendant et après la traite | Bactéries d'origine fécale | Bactéries présentes sur l'animal malade |
| <i>Lactobacilles</i> streptocoques lactiques | <i>Pseudomonas</i> , <i>Flavobacterium</i> Enterbacteries, Microcoques Corynébactéries, <i>Bacillus</i> Streptocoques faecalis <i>Clostridium</i> | <i>Clostridium</i> Coliformes fécaux <i>Salmonella</i> <i>Yersinia</i> <i>Campylobacter</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Brucella</i> <i>Listeria</i> |

I.2 Les produits laitiers traditionnels :

C'est l'augmentation de la production du lait durant certaines saisons, et la difficulté de son préservation sous la forme fraîche à conduit au développement des technologies de production traditionnelles (Dharam et Narender, 2007). Ces produits sont partie intégrante d'héritage algérien, et ont une grande importance, culturelle, médicinale et économique, ils ont été développé sur une longue période avec les compétences culinaires des femmes.

En plus de la conservation des solides du lait pour plus longtemps à température ambiante, la fabrication de produits laitiers traditionnels améliore la valeur alimentaire du lait.

Les produits laitiers traditionnels algériens importants qui ont la signification commerciale sont : Lben, Klila, Bouhezza, Jben, Rayeb, Dhan et Zebda, Takammarit et autres.

I.2.1- Rayeb :

Le Rayeb est un produit qui n'aura aucun traitement thermique préalable et laissé s'acidifier par fermentation spontanée jusqu'à l'obtention d'un caillé (Touati, 1990).

Il peut être consommé comme boisson après une simple homogénéisation, ou additionné aux autres plats traditionnels (couscous, mesfouf). Il entre dans la fabrication du Lben (Aissaoui, 2004).

1.2.2- Lben :

Le Lben est fabriqué à partir de lait de vache, brebis et de chèvre .Le lait subit une acidification spontanée par sa flore original jusqu'à coagulation .

Le caillé obtenu est introduit dans la Chekoua ou le Zeer ou il subit une forte agitation ou barattage.

En Algérie, le Lben entre dans la fabrication de différents fromages traditionnels tels que Bouhezza et Klila.

La composition physico-chimique du Lben varie en fonction de la nature du lait utilisé, de la condition de la coagulation, de l'intensité de l'écémage et la quantité d'eau additionnée lors du mouillage (Aissaoui, 2004).

Le tableau suivant montre la composition chimique de Lben.

Tableau 03 : Caractéristiques physico-chimiques du Lben artisanal (g/l) (Aissaoui, 2004).

| Constituants | Protéine | Lipide | Chlorure | Acide lactique | Extrait sec |
|---------------|----------|--------|----------|----------------|-------------|
| Teneurs (g/l) | 3.44 | 9.14 | 1.6 | 82.6 | 90.2 |

1.2.3- Bouhezza :

C'est un fromage fermier fermenté à égouttage spontané, préparé à l'origine à partir de lait de chèvre et éventuellement de brebis mais actuellement il est préparé à partir du lait de vache, il est très répandu dans l'est algérien plus précisément dans les régions de Oum Bouaghi, Khenchela, et dans certaines régions de Batna (Mekentichi, 2003)

Le salage, l'égouttage et l'affinage du Bouhezza sont réalisés simultanément dans une «Chekoua», préalablement traitée aux tannins pendant 3 à 4 mois. Au stade de la consommation le fromage est pétri avec incorporation de poudre de piment rouge, ce qui lui donne une caractéristique particulière (Lemouchi, 2008).

1.2.4- Takammarit :

C'est un fromage de Hoggar, il est fabriqué par introduction d'un bout de caillette de jeunes chevreaux dans le lait. Après quelques heures, le caillé est retiré à l'aide d'une louche et déposé en petits tas sur une natte et sera ensuite pétri pour évacuer le sérum puis déposé dans une autre natte faite de tige de fenouil sauvage qui lui donne de l'arome. Les nattes sont ensuite placées à l'ombre jusqu'au durcissement du fromage.

Le fromage peut subir un affinage durant un mois (**Bousnane et Djadi, 2009**).

1.2.5- Dhan :

Un beurre traditionnel est fabriqué à partir du lait de vache non pasteurisé. Tout d'abord, le lait est laissé à température ambiante jusqu'à ce qu'il s'acidifie. Une agitation manuelle est utilisée dans une peau de chèvre jusqu'à la séparation de la crème du lait écrémé, pendant l'agitation d'une petite quantité d'eau fraîche est ajoutée. Cette eau aide à coaguler les globules gras. Cette agitation dure quelques dizaines de minutes. Les matières grasses sont collectées et elles représentent le beurre (**Bettacheet et al., 2012**).

1.2.6- La crème, la Zebda ou beurre frais :

Selon la norme du Codex Alimentaire, le beurre est un « produit gras dérivé exclusivement du lait et/ou de produits obtenus à partir du lait, principalement sous forme d'une émulsion du type eau dans huile ». Il est obtenu par barattage de la crème du lait (**Luquet et Corrieu, 2005**).

Elle contient la presque totalité des lipides du lait et 2,7 g de protéines pour 100 g. Le beurre est fabriqué à partir de la crème (le barattage) et contient 0,8 g de protéines pour 100 g (**Vilain, 2010**).

1.2.7- Lghaunane :

Fromage fabriquée en Kabylie à partir du colostrum, la préparation se fait dans des ustensiles en terre cuite enduits d'huile d'olive dans lesquels est versée une petite quantité d'eau salée, puis le lait est chauffé et coagulé. Le caillé formé est découpé puis consommé tel quel. (**Agroligne, 2001 in Lahsaoui, 2009**).

1.2.8- Klila :

C'est un fromage ferment produit empiriquement dans plusieurs régions de l'Algérie, il est fabriqué par un chauffage relativement modéré (55 à 75°C) du Lben jusqu'à ce qu'il est

caille (10 à 15 min). Le caille est ensuite égoutté spontanément ou pressé à l'aide d'une pierre, le fromage obtenu est consommé tel qu'il est frais ou après un séchage il est utilisé comme un ingrédient après réhydratation dans les préparations culinaires traditionnelles (Mennane et al., 2007).

I.2.9- Jben :

Selon la norme du Codex Alimentaire et la norme internationale FAO/OMS, le fromage frais ou non affiné est du fromage qui est prêt à la consommation peu de temps après fabrication. Aux termes de la réglementation française, la dénomination « fromage » est réservée à un produit fermenté ou non, obtenu par coagulation du lait, de la crème ou de leur mélange, suivie d'égouttage. Tous les fromages frais ont une DLC de 24 jours (Luquet et Corrieu, 2005).

Le « Jben » est le fromage frais le plus connu et consommé au Maroc depuis fort longtemps aussi bien en milieu rural qu'en milieu urbain. Dernièrement, la consommation de ce produit s'est accrue suite à l'installation dans les villes d'un grand nombre de laiteries traditionnelles qui préparent le «Jben» à partir du lait cru selon des procédures souvent artisanales. A côté de ce secteur traditionnel, certaines unités laitières semi-industrielles se sont aussi intéressées à la fabrication du «Jben», utilisant du lait soit cru, soit pasteurisé, et des procédures de préparation plus ou moins améliorées. De ce fait, il existe aujourd'hui de nombreuses méthodes de préparation du «Jben», et par conséquent, plusieurs variétés de fromage frais sont commercialisées au Maroc sous la dénomination populaire commune de "Jben" (Benkerroum et Tamime 2004).

Traditionnellement, le fromage *Jben* est fabriqué avec du lait cru de brebis ou de chèvre, acidifié spontanément et coagulé par des enzymes coagulantes d'origine végétale issues des fleurs de cardon (*Cynara cardunculus L*), ou d'artichaut (*Cynara scolymus*), ou du latex de figuier (*Ficus carica*) ou des graines de citrouille (Nouani,2009).

I.2.9.1- Préparation du fromage frais :

Le fromage frais « Jben » est du variété molle et produit selon un protocole traditionnel qui comprend la coagulation présure de lait cru entier de vache, à laquelle a été ajouté un sel dans une proportion de 10-20 NaCl par litre du lait (Mennane et al., 2007). D'une manière générale, le fromage frais commercialisé est fabriqué soit à partir du lait de vache ou du lait de chèvre. Le processus de fabrication nécessite trois grandes étapes essentielles (Figure 01): la maturation, la coagulation et l'égouttage (Randazzo et al., 2002).

➤ **la maturation** : c'est l'incubation du lait cru à température ambiante pendant un temps variable de façon à favoriser la multiplication d'une flore lactique qui va jouer un rôle important dans l'acidification du lait. Cette maturation peut être spontanée ou provoquée par adjonction de levains. Le recours à des levains artificiels du commerce n'est cependant pas toujours une nécessité absolue, car le fermier producteur de lait a lui-même la possibilité de cultiver un levain naturel à partir de la flore contenue dans son propre lait.

➤ **La coagulation** : c'est une opération qui vise à coaguler le lait au moyen de la présure (emprésurage) ou de toute autre enzyme coagulante. L'activité coagulante est déterminée par la force de présure, la température du lait et son acidité. Après l'emprésurage, le lait est abandonné au repos à température ambiante pendant 6 à 10 heures. Il va prendre en masse (caillage) avec une consistance plus ou moins ferme selon le degré d'acidité développé.

En réalité, le coagulum est obtenu par deux modes de coagulation : la coagulation dite lactique et celle engendrée par l'action de la présure. Ces deux modes ont une action simultanée sur le lait avec cependant une prédominance plus ou moins marquée de l'un ou l'autre selon que le fromager souhaite obtenir une pâte à caractère plus présure ou à caractère plus lactique.

➤ **L'égouttage** : un des buts essentiels de cette opération est de régler la teneur en eau du fromage. Il permet l'élimination de la plus grande partie du sérum qui imprègne le coagulum. L'égouttage est amorcé dans des moules qui confèrent au fromage sa forme. La nature du gel influe sur la conduite de l'égouttage. Un gel lactique subit un égouttage spontané et le caillé a par conséquent une forte humidité. Cependant, un gel présure est un gel compact, solide ou l'égouttage ne peut avoir lieu qu'après certaines interventions telles des actions mécaniques de pression.

Suivant le goût du fromager, le salage peut être fait. C'est une opération importante dans la fabrication des fromages. Elle a des effets multiples: elle améliore l'égouttage en le complétant, elle oriente et sélectionne le développement microbien et relève la saveur de la pâte (**Benkerroum et Tamime, 2004**).

Ce type de fromage est très apprécié par les consommateurs et pourraient être promus à l'échelle nationale et internationale, si elle sera fabriquée sur une grande échelle en respectant leurs caractéristiques organoleptiques, car il a un goût salé, légèrement acide et agréables propriétés organoleptique (**Mennane et al., 2007**).

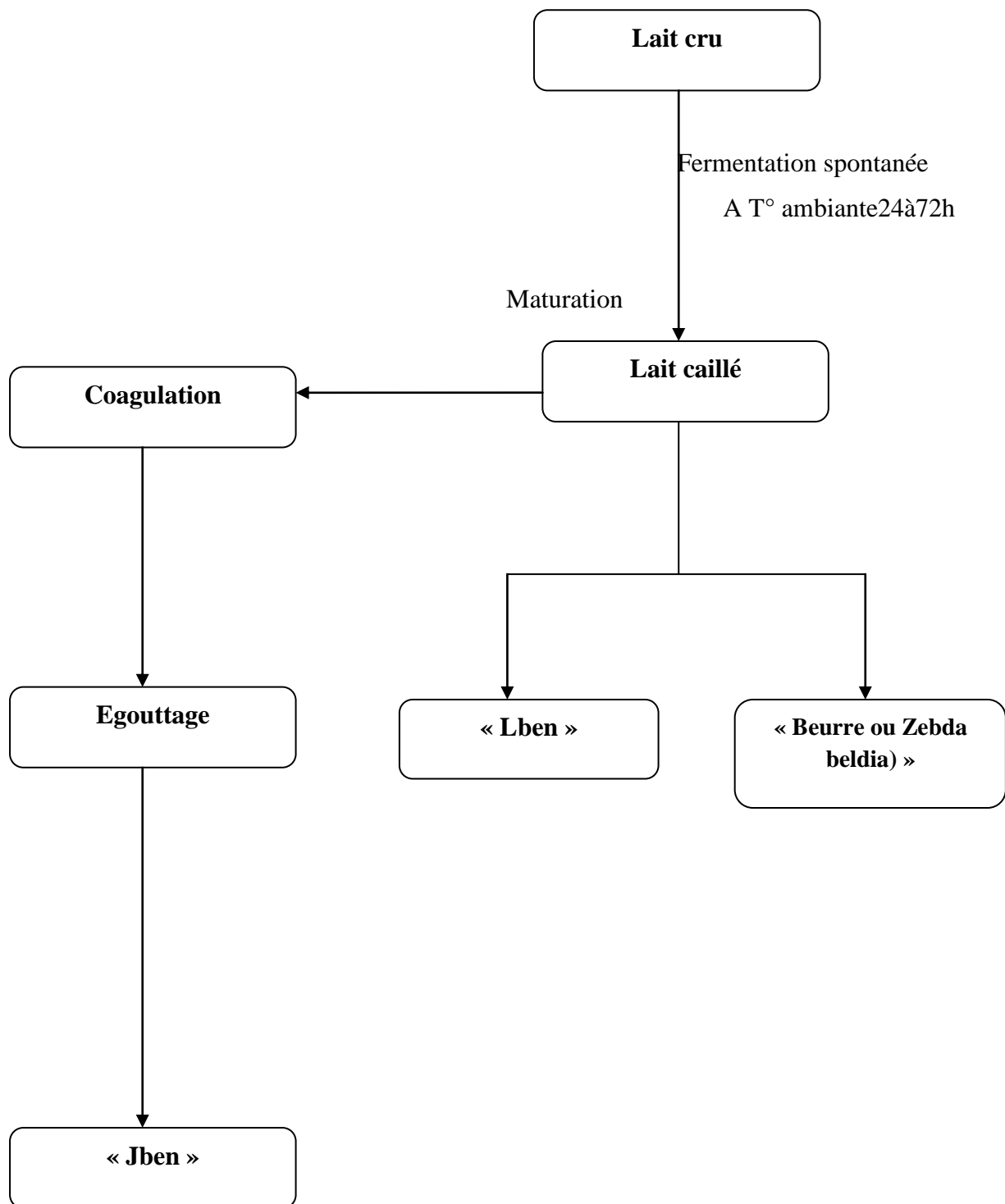


Figure 01 : Schéma de fabrication des produits laitiers traditionnels (Benkerroum et Tamime, 2004).

I.2.9.2- Caractéristiques physiques et chimiques du Jben :

Le fromage frais « Jben » ne présente pas de caractéristiques définies à cause des méthodes artisanales utilisées pour sa préparation reposant, essentiellement, sur les connaissances acquises à partir d'une longue expérience (**Salmeron et al., 2002**). Les arômes, les propriétés organoleptiques et les caractéristiques physico-chimiques du fromage dépendent de celles du lait cru qui à son tour dépend de la race des animaux et leur type d'alimentation (**Poznanski et al., 2004**).

Généralement, Le pH (<4,2) et l'acidité titrable (> 0,9%) sont les paramètres les moins variables du « Jben ». Cependant, les matières solides totales du « Jben » sont le facteur le plus variable car ce dernier dépend de la durée d'égouttage. Étant donné que les lipides, le lactose et les protéines constituent les principaux composants de l'ensemble des matières solides en « Jben », ils sont directement influencés par les variations des dites matières solides (**Benkerroum et Tamime, 2004**).

I.2.9.3- Microflore de Jben :

La composition microbiologique du fromage dépend de celle du lait de départ, du processus de fabrication qu'il a subi et de l'âge du fromage (**Ercolini et al., 2009**). Généralement, elle est dominée par les bactéries lactiques en l'occurrence les *Lactococcus* et les *Enterococcus* qui influencent les caractéristiques sensorielles du produit fini (**Randazzo et al., 2009**).

II.1- Définition :

Bien avant que l'on soit conscient de l'existence des bactéries lactiques, elles n'ont été utilisées que récemment dans la conservation des aliments à base de lait, de viande, de poissons, de légumes et de fruits (**Paul Ross et al., 2002**).

La présence de bactéries lactiques est responsable de l'acidification du lait et de la maturation de la crème (**De Roissart et Luquet, 1994**).

Elles forment un groupe hétérogène composé de coques et de bacilles, dont la principale caractéristique est la production d'acide lactique à partir de la fermentation des sucres (**Badis et al., 2005**).

Les bactéries lactiques regroupent les bactéries à coloration de Gram positif, généralement immobiles asporulées et micro-aérophiles. Elles ne possèdent ni catalase, ni nitrate-réductase, ni cytochrome-oxydase.

Ces bactéries montrent des exigences nutritionnelles complexes en glucides fermentescibles, en acides gras, en acides aminés, en peptides, en vitamines et en sels, leur classification est réalisée en fonction de leur morphologie, de leur type de fermentation et de leur température optimale de croissance.

Elles sont ubiquistes, et on les trouve dans différentes niches écologiques comme le lait et les produits laitiers, les végétaux, la viande, le poisson, les muqueuses humaines et animales et dans le tractus digestif (**Drouault et Corthier, 2001**).

Les bactéries lactiques peuvent être divisées en deux groupes homofermentaires et hétérofermentaires basées sur les produits fabriqués à partir de la fermentation du glucose. (**Priyanka et Prakash, 2009**).

✚ Homofermentaires : l'acide lactique est le seul produit de la fermentation du glucose.

✚ Hétérofermentaires : la fermentation du glucose aboutit à la formation d'acide lactique et d'autres composés : éthanol, CO₂ et autres acides organiques (**Priyanka et Prakash, 2009**).

II.2- Classification :

Traditionnellement, les bactéries lactiques ont été classées sur la base des propriétés phénotypiques : la morphologie, le mode de fermentation du glucose, la croissance à différentes températures, l'isomère de l'acide lactique produit et la fermentation des différents hydrates de carbone (**De Roissart et Luquet, 1994; Holzapfel et al., 2001**).

Les genres les plus étudiés sont : *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* et *Pediococcus* (Drouault et Corthier, 2001)(Tableau04).

Actuellement le groupe des bactéries lactiques associées aux aliments renferme les 12 genres suivantes : *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella* et *Bifidobacterium*.

II.2.1- Le genre *Lactobacillus*

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

lactobacilles se répartissent en trois groupes selon leur profil fermentaire, d'après la classification de Kandler et Weiss (1986) :

Groupe I : il comprend les espèces homofermentaires obligatoires, c'est-à-dire produisant exclusivement de l'acide lactique à partir du glucose. Ce groupe est constitué d'environ 25 espèces, la plupart thermophiles (croissance à 45°C) dont *Lb. delbrueckii*, *Lb. acidophilus* et *Lb. helveticus*. La plupart des espèces sont présentes dans le lait et les produits laitiers.

Groupe II : ce sont les espèces hétérofermentaires facultatives, c'est-à-dire capables d'utiliser la voie hétérofermentaire dans certaines conditions comme une concentration en glucose limitante. Il est constitué d'une vingtaine d'espèces dont *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. sake* et *Lb. plantarum*, majoritairement mésophiles (Laurent et al., 1998).

Groupe III : il est constitué des espèces hétérofermentaires obligatoires, c'est-à-dire utilisant la voie des pentoses phosphates pour la fermentation des hexoses et des pentoses. C'est un groupe qui rassemble des espèces relativement hétérogènes, surtout mésophiles, comme *Lb. brevis*, *Lb. kefir* et *Lb. sanfransisco*, Outre leur présence dans les produits laitiers et carnés, certaines espèces se développent dans le tube digestif de l'homme, et participent à l'équilibre de la flore intestinale (Laurent et al., 1998).

II.2.2 Le genre *Streptococcus*

Comprend essentiellement des espèces d'origine humaine ou animale dont certaines sont pathogènes comme *S. pyogenes* et *S. agalactiae* d'autres sont impliquées dans la formation de la plaque dentaire (*S. mutans*). L'espèce thermophile *Streptococcus*

thermophilus se différencie par son habitat (lait et produits laitiers), et son caractère non pathogène. Du fait de ses propriétés technologiques, c'est la seule espèce considérée comme un streptocoque lactique (**Laurent et al., 1998**).

II.2.3 Le genre *Lactococcus*

Le genre *Lactococcus* est formé de bactéries à Gram positif dont les cellules, en forme de coques, sont associées par paires ou en chaînettes de longueur variable. Elles sont dépourvues de catalase et ne sont pas capables d'utiliser l'oxygène mais se multiplient en sa présence (anaérobies aérotolérantes). Ces bactéries sont thermosensibles et ne peuvent pas croître en présence de 6.5% de NaCl ou à pH 9.6. Leur température optimale de croissance s'étend de 25 à 35°C, respectivement pour les souches de *Lc. cremoris* et *Lc. lactis*. Les *Lactococcus* sont capables de croître à 10°C mais pas à une température supérieure à 40°C (**Dellaglio et al., 1994**).

II.2.4 Le genre *Leuconostoc*

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

On range habituellement les leuconostocs dans les anaérobies facultatifs, mais certains les considèrent comme des anaérobies aérotolérants. Ils sont exigeants et présentent souvent une auxotrophie pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels minéraux et les glucides (**Dellaglio et al., 1994**).

Ce genre comprend les espèces suivantes : *Ln. mesenteroides* avec ces sous espèce mesenteroides cremoris et dextransicum et *Ln. lactis* et *Ln. Pseudomesenteroides* et *Ln. paramesenteroides* (**Collins et al., 1993 ; Laease, 2005**).

II.2.5 Le genre *Bifidobacterium*

Les cellules de *Bifidobacterium* se caractérisent par leur forme très irrégulière, souvent en V et Y, mais pouvant être coccoïde. Elles se différencient des autres bactéries lactiques par leur caractère anaérobie, leur G + C % élevé, et la présence d'une enzyme, la fructose-6-phosphate phosphocétolase. Celle-ci leur permet de fermenter les hexoses en produisant de

l'acide acétique et de l'acide lactique (rapport 3:2), ainsi qu'en moindre proportion de l'éthanol et d'autres acides organiques. Cette fermentation « lactique » a conduit à les rapprocher du groupe des bactéries lactiques. Leur température optimale de croissance est comprise entre 37°C et 41°C. Elles se développent à pH supérieur à 5. Elles sont isolées de l'homme et des animaux (Laurent, 1998).

Tableau 04 : Les différents genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques (Laurent et al., 1998).

| Genre | Morphologie | Fermentation | Température optimale | Nombre d'espèces |
|------------------------|----------------------|----------------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| <i>Lactobacilles</i> | Bacilles | Homo ou hétérofermentaires | thermophiles ou mésophiles | G1 :23 G2 :16 G3 :22 |
| <i>Lactococcus</i> | Coques | homofermentaires | Mésophiles | 5 |
| <i>Streptococcus</i> | Coques | homofermentaires | mésophiles ou thermophiles | 19 |
| <i>Leuconostoc</i> | Coques | hétérofermentaires | Mésophiles | 11 |
| <i>Bifidobacterium</i> | forme irrégulière | Acide acétique et lactique | Mésophiles | 25 |

II.3- Intérêts technologiques des bactéries lactiques :

II.3.1-Activité acidifiante (production d'acide lactique) :

Le pouvoir acidifiant des bactéries lactiques permet la coagulation du lait (en facilitant l'action de la présure) et l'augmentation de la synérèse du caillé; la participation aux propriétés rhéologiques du produit final; l'inhibition de la croissance des bactéries nuisibles (Papamanoli et al., 2003).

II.3.2-Activité protéolytique :

Les bactéries lactiques possèdent des protéinases et des peptidases nécessaires à la dégradation des protéines du lait en peptides et acides amines. Ceux-ci peuvent alors être

transformé en alcools et en acides. Cette activité protéolytique intervient de ce fait sur le rendement fromager, la texture et la saveur typique du fromage et par conséquent sur les caractéristiques du produit final (**Buist et al., 1998**).

II.3.3-Pouvoir aromatisant et pouvoir gazeux :

Certaines bactéries lactiques sont capables de produire des composés d'arômes qui participent aux qualités organoleptiques des fromages. La plupart des composés d'arôme sont issus du métabolisme du citrate, l'acétoïne et le diacétyle sont les plus importants (**Georgalaki et al., 2002, Francois et al., 2007**).

II.3.4-Activité bactériostatique (production de bactériocines) :

Les bactéries lactiques produisent des substances antimicrobiennes de nature protéique appelées bactériocines. Cette caractéristique est utilisée industriellement pour la destruction des bactéries indésirables et pathogènes dans la fabrication d'aliment comme la nisine produite par les lactocoques dirigée contre *Bacillus* et *Clostridium*, la plantaricine et la sakacine produites toutes les deux par les lactobacilles actives sur *E. coli*, *Listeria* et certaines levures (**Ogunbanwo et al., 2003 ; Zambunelli et Chiavari, 2002**), contribuant ainsi à la préservation de l'équilibre microbien et organoleptique du fromage (**Harris et al., 1989 ; Georgalaki et al., 2002**).

II.3.5-Propriété probiotique :

Le terme "probiotique", dérive de deux mots grecs "pros" et "bios" qui signifient « pour la vie » (**Bernier, 2010**).

La définition actuelle des "probiotiques" est celle adoptée par le comité mixte d'experts **FAO/WHO (2002)** qui les définit comme "des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, exercent un effet bénéfique sur la santé de l'hôte".

II.3.5.1-Les bactéries probiotiques

Plusieurs espèces de bactéries ou levures sont considérées comme étant probiotiques. Malgré cette grande diversité, les bifidobactéries et les lactobacilles sont les deux principales souches de bactéries probiotiques utilisées dans les produits alimentaires (**Heyman et al., 2006**). Ils font partie du groupe hétérogène des bactéries lactiques dont la production d'acide lactique est le produit final principal de leur métabolisme (**Prescott et al., 2003**), rarement des

non-lactiques comme *Enterococcus faecalis* ou encore certaines levures comme *Saccharomyces boulardii*.

Les bactéries probiotiques sont présentes naturellement dans le tube digestif, peuvent interagir avec la flore intestinale, les cellules épithéliales intestinales et dans une moindre mesure les cellules immunitaires (Heyman et al., 2006).

II.3.5.2- Rôle d'un probiotique :

Un probiotique, un micro-organisme ne doit présenter ni toxicité ni pathogénie. Les probiotiques doivent être capables de moduler la réponse immunitaire et/ ou produire des substances antimicrobiennes. (Heyman et al., 2006).

Les bactéries probiotiques n'ont pas la capacité de coloniser de façon permanente, le tractus gastro-intestinal. Par contre, la consommation sur une base régulière permet de modifier la microflore intestinale et d'atteindre un équilibre entre les mauvaises bactéries et les microorganismes bénéfiques (Sherman et al., 2009).

Ils doivent être aussi capables de survivre et de proliférer dans les milieux naturels occupés par des bactéries pathogènes. Plusieurs études ont attribué de nombreuses propriétés aux probiotiques dans lesquels ils participent à l'activation de l'immunité et à la réduction d'allergies chez les sujets à risque (Gourbeyre et al., 2008). La résistance à l'acide gastrique et à la bile, permet aux probiotiques de survivre dans le tube digestif où réside une partie de l'immunité (Grangette et al., 2002).

Certaines études ont cependant montré que la consommation de probiotiques non-viables peut aussi engendrer des effets bénéfiques sur le système immunitaire (Salminen et al., 1999).

Les probiotiques participent au développement du système immunitaire chez le nourrisson et l'améliorent chez la personne âgée en augmentant le nombre de phagocytes et de lymphocytes natural killer, premières défense contre un agent exogène (Sherman et al., 2009). Ils agissent également sur l'immunité en colonisant le tractus intestinal, réalisant ainsi « un effet barrière ».

Les bénéfices potentiels des probiotiques vont de la suppression de l'activité de certains pathogènes à l'amélioration de l'utilisation du lactose (De vrese et al., 2001), de la réduction du cholestérol sanguin et du niveau de substances carcinogènes. et de l'inactivation de composés toxiques à la stimulation du système (Bottazzi, 1994 ; De vrese et al., 2001).

III. Les substances antimicrobiennes :

Les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyl et les bactériocines (**Dortu et Thonart, 2009**).

III.1- Les acides organiques :

En général, la production d'acides organiques permet une acidification du milieu qui peut limiter la croissance de certaines bactéries entre autres les bactéries indésirables. Des expositions prolongées dans un milieu acide peuvent entraîner la mort de plusieurs bactéries, y compris les ferments lactiques (**Champagne et al., 1992**).

Ainsi, les acides organiques ont différentes actions telles qu'un excellent pouvoir bactéricide ou un effet bactériostatique contre les micro-organismes pathogènes se trouvant dans le tube digestif (**Jedidi, 2007**).

III.2- Peroxyde d'hydrogène :

Dans les conditions d'aérobiose, chez la plupart des bactéries lactiques, les molécules de NAD réagissent avec l'oxygène pour former du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). De plus, diverses enzymes conduisent généralement à l'accumulation de peroxyde d'hydrogène qui est plus au moins toxique pour la bactérie lactique productrice. Notamment dans le cas du lait, le peroxyde d'hydrogène est le constituant d'un système inhibiteur naturel comportant aussi une peroxydase et du thiocyanate comme accepteur d'électrons.

Ce composé est un inhibiteur de la croissance microbienne car il bloque le fonctionnement de certaines enzymes-clés intervenant dans la glycolyse, comme l'hexokinase. L'action bactériostatique de ce système entraîne des irrégularités d'acidifications par les levains lactiques, qui peuvent ainsi s'auto-inhiber car ils y sont résistants. Mais, comme il peut être bactéricide pour certaines bactéries de contamination, voire pathogènes, la fédération internationale de laiterie a proposé d'utiliser les propriétés de ce système inhibiteur pour améliorer la conservation temporaire du lait cru dans les pays chauds dépourvus d'équipement de réfrigération (**Desmazeaud, 1996**).

III.3- Les bactériocines :

Klaenhammer (1988) a défini les bactériocines comme des protéines, ou complexes de protéines, avec une activité bactéricide contre des espèces proches de la souche productrice.

Toutes les bactériocines produites par des bactéries lactiques décrites jusqu'à présent ont une activité dirigée contre les bactéries Gram positif. Aucune bactériocine produite par des bactéries lactiques avec une activité contre des bactéries Gram négatives n'a été décrite, la membrane externe des bactéries Gram négatives ne permettant pas aux bactériocines d'atteindre la membrane interne, siège de leur activité (**Dortu et Thonart, 2009**).

À la suite de leurs travaux sur les colicines (bactériocines de bactéries Gram négatif) **Tagg et al., (1976)** citent les critères requis pour qu'une substance chimique soit dénommée bactériocine :

- la présence d'une partie biologiquement active de nature protéique.
- un spectre d'activité inhibitrice étroit et centré sur les espèces homologues.
- un mode d'action bactéricide.
- l'adsorption à des récepteurs spécifiques.

III.3.1- Classification des bactériocines :

On trouve des souches productrices de bactériocines chez tous les genres de bactéries lactiques. Le nombre de bactériocines de bactéries lactiques caractérisées a augmenté de façon exponentielle au cours des dix dernières années.

Tableau 05 : Classification des bactériocines de bactéries lactiques
(**Luquet et Corrieu, 2005**).

| Classe | Sous-catégorie |
|--|---|
| Classe I : lantibiotique | Type A : molécules linéaires Type B : molécules globulaires |
| Classe II : bactériocines non-modifiées thermostables | Classe : anti-listeria Classe : bactériocines à deux composants Classe : autres bactériocines |
| Classe III : bactériocines de grande taille, sensibles à la chaleur. | |

III.3.1.1 Classe I : lantibiotique :

Il s'agit de peptides de taille réduite (<5 kDa), contenant des acides aminés inhabituels obtenus par modification post-traductionnelle dont le plus caractéristique est la lanthionine.

III.3.1.2 Classe II : Peptides non modifiés :

Cette classe regroupe les petites bactériocines (< 10 KDa) thermostables et ne subissant pas de modification post-traductionnelle ; cependant elles sont généralement synthétisées sous forme d'un prépeptide qui sera mûri lors de son excrétion dans le milieu extracellulaire.

III.3.1.3 Classe III : Protéines :

Les bactériocines de classe III sont caractérisées par leur grande taille, Elle contient les protéines de taille supérieure à 30kDa et sensibles à la chaleur. La structure et le mode d'action de ces bactériocines diffèrent complètement des autres bactériocines produites par les bactéries lactiques.

Tableau 06: Bactériocines de classe III produites par des bactéries lactiques (Luquet et Corrieu, 2005).

| Bactériocines | Producteurs |
|---------------|---|
| Hélvéticine J | <i>Lactobacillus helveticus</i> 481 |
| Milléricine B | <i>Streptococcus milleri</i> NMSCC 061 |
| Zoocine A | <i>Streptococcus zooepidemicus</i> 4881 |

III.3.2 Mécanisme d'action :

Le siège d'activité des bactériocines est la membrane cellulaire, raison pour laquelle les bactériocines n'ont pas d'activité contre les bactéries Gram-négatif. Ces substances vont interagir avec des récepteurs de peptidoglycane en provoquant l'augmentation de la perméabilité de la membrane et par conséquent, la mort cellulaire. Cependant, les modes d'action des bactériocines sur la membrane sont variés (Dortu et Thonart, 2009).

Matériel et méthodes



1. Origine des échantillons et prélèvements :

Trois échantillons du “Jben” ont été prélevés à partir de deux wilayas d’Algérie (El Bayadh et Naâma) durant la période de février-mai 2015(**Tableaux 07et 08**), (**Photo 01**).

Les différents échantillons ont été récupérés dans des sachets de prélèvement stériles, environ 500 g par sachet. Immédiatement les échantillons ont été transportés dans une glacière au laboratoire pour être analysés.

La figure 02 résume le procédé de fabrication du “Jben” et le tableau suivant rappelle les stations d’échantillonnage du produit “Jben”.

Tableau 07: Situation géographique des stations d’échantillonnage (Belyagoubi, 2014).

| Région | Altitude (mètres) | Latitude (Nord) | Longitude (Ouest) | Étage bioclimatique |
|-----------------|-------------------|-----------------|-------------------|---------------------|
| Méchria (Naâma) | 1149 | 33° 31' | 0° 17' | Arid |
| El Bayadh | 765 | 32° 30' | 1° 10' Est | Arid froid |



Photo 01 : Produit laitiers traditionnel “Jben”.

Les caractéristiques des échantillons prélevés sont citées dans le tableau postérieur.

Tableau 08 : Caractéristiques des échantillons du «Jben» prélevés.

| Numéro d'échantillon | Origine | Date de prélèvement | Matière de production | Observation |
|-----------------------------|-----------------|----------------------------|------------------------------|---------------------|
| Échantillon 1 | Méchria (Naâma) | 25/02/2015 | Lait de vache | Matière molle |
| Échantillon 2 | Méchria (Naâma) | 18/03/2015 | Lait de vache | Matière molle |
| Échantillon 3 | El-Bayadh | 27/03/2015 | Lait de vache | Matière Peu liquide |

2. Procédé de fabrication du «Jben» traditionnel :

Le schéma suivant simplifie la méthode de préparation du «Jben».

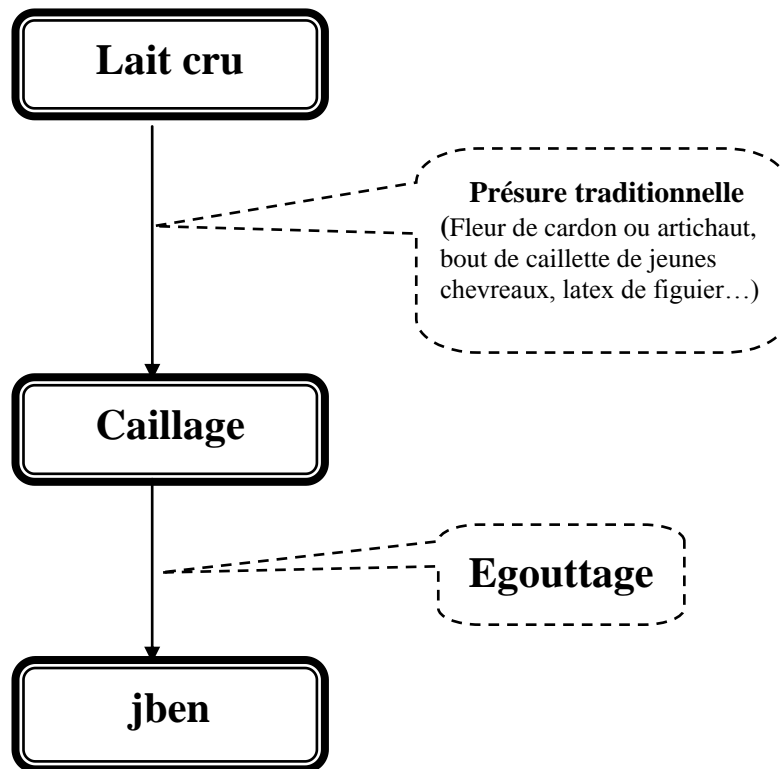


Figure 02 : procédé de fabrication du « Jben ».

3. Détermination du pH du « Jben » :

10g de l'échantillon de produits laitiers « Jben » a été homogénéisé avec 20 ml d'eau distillée. Le pH de l'échantillon a été déterminé en utilisant un pH-mètre numérique (DHAUS, STARTER 3100) où l'électrode a été insérée directement dans l'échantillon (Owusu-Kwarteng *et al.*, 2012). Deux répétitions ont été réalisées pour chaque échantillon.

4. Dénombrement de la flore mésophile totale :

- 10g de l'échantillon de produits laitiers a été homogénéisés vigoureusement avec 90 ml d'eau physiologique d'où la dilution 10^{-1} .
- On transfère à l'aide d'une pipette stérile dans une boîte de Pétri, une prise d'essai de 1ml de l'échantillon à analyser ou ses dilutions décimales (de 10^{-1} à 10^{-8}); on augmente la dilution si le produit est trop chargé.
- On coule la gélose PCA maintenue en surfusion à 45°C dans des boîtes de Pétri.

Pour obtenir une répartition homogène des colonies, on procède par remuage des boîtes sur une surface plane en veillant à inverser régulièrement le sens de rotation.

- On laisse la gélose se solidifier.
- Incuber à 30°C pendant 24 à 48 heures.

Lecture

On calcule le nombre des colonies et on exprime les résultats sous forme du nombre de micro-organismes totaux à 30°C par gramme en tenant compte du facteur de dilution éventuel, on prend en considération les boîtes contenant entre 30 à 300 colonies (Cheriguene *et al.*, 2007).

5. Isolement des bactéries lactiques :

Dix grammes de chaque échantillon a été homogénéisés avec 90 ml de l'eau physiologique stérile (0,85% de NaCl,) additionnée de peptone (0.1%.) A partir de cette dilution 10^{-1} , des dilutions décimales (de 10^{-2} à 10^{-8}) ont été préparées et pour chaque dilution un volume de 0.1 ml a été étalé en surface sur les milieux d'isolement (Kacem et Karam, 2006; Cheriguene *et al.*, 2007).

L'isolement des bactéries lactiques est réalisé sur le milieu MRS (MRS agar, à deux pH (5.6 et 6.2) et le milieu M17.

Le milieu MRS à pH=6,2 a été utilisé pour la croissance de la microflore lactique totale, les lactobacilles sont énumérés sur milieu MRS acidifié à pH=5,6.

(De Man et al., 1960).

Les cultures sont incubées pendant 72 heures à 30°C et 45°C dans des boîtes de Pétri à l'obscurité. Après isolement des colonies d'aspects morphologiques différents (taille, couleur, surface, profondeur...) sont repiquées sur milieu MRS, incubées à 30°C ou 45°C afin de s'assurer de la pureté des cultures **(Kacem et Karam, 2006, Cheriguene et al., 2007).**

6. Mode de calcul :

Pour qu'un résultat soit valable, il est nécessaire de compter les colonies sur au moins une boîte contenant au minimum 15 colonies et inférieur à 300 colonies. Le nombre N calculé de microorganismes présents dans l'échantillon pour essai, en tant que moyenne pondérée à partir de deux dilutions successives, à l'aide de la formule suivante:

$$N = \frac{\sum C}{V (n_1 + 0,1n_2) d}$$

Où :

C : la somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues de deux dilutions successives et dont au moins une contient 15 colonies;

V : est le volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte, en millilitres;

n₁ : est le nombre des boîtes retenues à la première dilution;

n₂ : est le nombre des boîtes retenues à la seconde dilution;

d : est le taux de dilution correspondant à la première dilution retenue **(Norme AFNOR NF ISO 7218, 2004).**

7. Conservation des souches :

La conservation des souches isolées pures a été réalisée soit sur la gélose MRS inclinée à 4±1°C; soit sur le milieu MRS contenant du glycérol 20% à -80°C pour une conservation à long terme.

8. Identification des bactéries lactiques :

Sur chacune des boîtes servant aux dénombrements, nous classons les colonies en catégories selon leur aspect macroscopique. Dans chaque catégorie, nous

choisissons aléatoirement une colonie supposée représentative parmi celles, observées pour réaliser les premiers tests d'orientation.

L'identification a été établie en se basant sur des caractères morphologiques et divers caractères biochimiques : production d'enzymes, température de croissance, production de gaz carbonique, fermentation de divers sucre.

8.1. Tests morphologiques :

8.1.1-Coloration de Gram :

Un frottis fixé à la chaleur est coloré pendant une minute au *violet de cristal*; il est ensuite rincé rapidement à l'eau courante, traité pendant une minute par une solution de *Lugol*, et de nouveau rincé rapidement. On soumet alors le frottis coloré à une étape de décoloration en le traitant avec l'éthanol 95%. Il s'agit de l'étape critique: la lame est maintenue inclinée et on fait couler le solvant sur le frottis pendant 2 à 3 secondes seulement jusqu'à ce que le colorant cesse de s'échapper librement du frottis. Celui-ci est alors immédiatement rincé à l'eau courante. À ce stade les cellules gram- seront incolores, les cellules gram+ violettes. On soumet ensuite le frottis à une contre coloration de 30 secondes à la *fushine* pour colorer les cellules gram- présentes. Après un bref rinçage, on sèche le frottis au buvard et on l'examine à l'objectif à immersion (grossissement X 1000) (Singleton, 1999).

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).

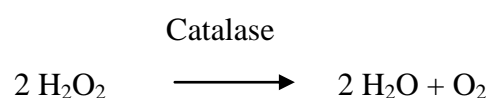
8.1.2-Etat frais :

Un tube contenant le milieu MRS liquide (10ml) est inoculé par une colonie. On incube à $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 16 à 24h, jusqu' à l'apparition d'un trouble microbien. Pour vérifier la mobilité et la forme, une lame additionnée d'une goutte de la culture est observée au microscope.

8.2. Tests biochimiques :

8.2.1- Test de la catalase :

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



La méthode de recherche de la catalase consiste à étaler une colonie sur une lame de verre sur laquelle on ajoute une goutte de H₂O₂ à 10 volumes. La présence de l'enzyme se manifeste par un dégagement de bulles de gaz (**Zinedine, 2004**).

8.2.2- Test d'oxydase :

Technique de recherche à partir d'une suspension bactérienne : dans 10 gouttes d'une suspension épaisse de bactéries en eau physiologique, on ajoute soit quelques gouttes de réactif, soit un disque. La coloration rose apparait en 1 min environ (**Marchal et al., 1991**).

8.2.3- Urée-Indole :

Une suspension dense de bactéries est introduite dans 0,5 ml de milieu Urée-Indole, l'incubation se fait à 30°C±1°C pendant 24 à 48 h.

- Un virage de milieu au rouge violacé ou au rouge rose indique une réaction d'uréase positive.
- Deux gouttes de réactif de Kovacs sont additionnées. L'apparition d'un anneau rouge indique une réaction d'indole positive (**Marchal et al., 1991**).

8.2.4- VP/RM :

Deux tubes contenant chacun 0,5 ml de milieu **Clark** et **Lubs** sont ensemencés à l'aide d'une anse, après incubation à 30°C ± 1°C pendant 18 à 48 h, on ajoute deux gouttes de réactif VP dans l'un des deux tubes et deux gouttes de réactif RM dans l'autre.

- Une teinte rouge cerise indique une réaction VP positive.
- Une teinte rouge indique une réaction RM positive (**Marchal et al., 1991**).

8.2.5- Milieu Mannitol-mobilité :

Le mannitol est un produit de réduction du D-mannose. Il permet de rechercher simultanément la fermentation du mannitol et la mobilité. On a ensemencé les souches étudiées dans le milieu par piqûre centrale, et incubé à 30°C±1°C pendant 18 à 24 h. Le virage au jaune du milieu indique la fermentation du mannitol, une diffusion dans la gélose indique la mobilité des bactéries (**Marchal et al., 1991**).

8.2.6-TSI (Gélose Glucose-Lactose-Saccharose-H₂S):

A l'aide d'une anse contenant des colonies prélevées, on ensemence la pente puis le culot d'un tube par piqûre centrale. L'incubation se fait à 30°C±1°C pendant 48 à 72h.

- ❖ Une coloration jaune de la pente indique un lactose positif.
- ❖ Une coloration jaune du Culot montre un glucose positif.
- ❖ Une coloration jaune de la zone intermédiaire indique un saccharose positif.

Ce test permet également la production de H₂S (noircissement de la zone joignant la pente et le culot) et de Gaz (bulles dans la gélose) (**Marchal et al., 1991**).

8.2.7- Citrate de Simmons:

Ce milieu ne contient qu'une seule source de carbone: le citrate. Seules les bactéries possédant une citrate-perméase sont capables de se développer sur ce milieu. La pente du milieu est ensemencée selon une strie longitudinale au moyen d'une anse contenant une colonie et incubé à 30°C ± 1°C pendant 5 jours.

- Citrate-positive : culture avec alcalinisation du milieu (virage de l'indicateur au bleu).
 - Citrate-négative : pas de culture (coloration verte de milieu inchangée)
- (**Marchal et al., 1991**).

8.2.8- Effet de NaCl, du pH et de la température :

Quatre milieux de MRS liquides ont été utilisés contenant différentes concentration de NaCl : 2% de NaCl (2 g de NaCl par 100 ml de milieu), 4%, 6,5% et 10%, avec un pH de 6.5. Une autre série d'essais a été réalisée sur le milieu MRS avec un pH de 4.5, 6.5 et 8 et autre série a été réalisée sur le milieu MRS avec incubation à 5°C, 37°C et 44,5°C (**Badis et al., 2005**).

8.2.9- Thermorésistance :

Des tubes contenant 10 ml de MRS liquide sont inoculés par les souches isolées, ensuite les tubes sont déposés dans un bain marie à 63,5°C pendant 30 min, après refroidissement brusque, elles sont incubées à 30°C ±1° C pendant 48 à 72 h. Un résultat positif se traduit par un trouble (**Badis et al., 2005**).

8.2.10. Galerie API 20E (bio Mérieux):

La galerie API 20E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne (prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé, et homogénéiser dans un tube contenant 5 ml d'eau physiologique).

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture. L'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification.

NB : on a utilisé la galerie API 20E juste pour compléter et confirmer les tests de la galerie classique sachant que cette dernière est destinée à l'identification des entérobactéries.

9. Interactions microbiennes :

Dans cette partie, on a réalisé des interactions entre les souches isolées de produits laitiers traditionnels et sept bactéries pathogènes de références et une levure.

Les microorganismes utilisés dans notre étude sont mentionnés dans le tableau suivant :

Tableau 09 : Origines des souches utilisées dans les différents tests d'activité antimicrobienne.

| Bactérie | Gram | code | Origine |
|-------------------------------|-------------|-----------------|----------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | positif | ATCC6538 | MNHN |
| <i>Micrococcus luteus</i> | | ATCC9341 | MNHN |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | | ATCC19111 | LAPRONA |
| <i>Bacillus cereus</i> | | ATCC25921 | LAPRONA |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | négatif | ATCC27853 | MNHN |
| <i>Escherichia coli</i> | | ATCC8739 | MNHN |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | | IBMC Strasbourg | MNHN |
| <i>Candida albicans</i> | levure | IBMC Strasbourg | MNHN |

MNHN : Muséum National d'Histoire Naturelle(Paris)

LAPRONA : Laboratoire des Produits Naturels (Université de Tlemcen).

9.1- Interaction bactéries lactiques /bactéries pathogènes :

9.1.1-Préparation des précultures des bactéries tests (pathogènes) :

Les bactéries pathogènes sont cultivées dans 10 ml de bouillon BHIB à $37 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 18 à 24 h. Pour la levure, *Candida albicans* est cultivée dans 10 ml du bouillon Sabouraud à $30 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 48 à 72 h.

9.1.2- Méthode d'inhibition bactérienne en gélose superposée (double gélose) :

Pour étudier l'activité antimicrobienne des souches, la méthode décrite par **Fleming et al., (1975)** a été adoptée avec une légère modification.

L'activité antimicrobienne des bactéries lactiques est évaluée contre les souches pathogènes. Les bactéries lactiques sont mises en culture dans le milieu MRS et les pathogènes sont eux aussi initialement cultivées dans leurs milieux de prédilection (Bouillons : Infusion Cœur Cerveille et Sabouraud). Schématiquement, un spot de 5 μl de la suspension de bactéries lactiques à tester provenant d'une nuit et préalablement ajustée à une densité optique de $\text{DO}_{550\text{nm}} = 1 \pm 0.05$ est déposé à la surface de la gélose MRS. Pour permettre le développement de colonies visibles macroscopiquement, les géloses sont incubées pendant 24 à 48 h à 30°C en aérobiose. Les géloses sont ensuite recouvertes avec 10 ml de gélose molle Coeur-Cerveille (7g/l d'agar) qui avait préalablement étéensemencée avec 0.1 ml de la suspension bactérienne du pathogène à tester (calibrée à la densité optique de $\text{DO}_{550\text{nm}} = 1 \pm 0.05$ à partir d'une culture d'une nuit). L'incubation se fait à 37°C en aérobiose pendant 24h pour les bactéries et pendant 48 à 72h à 30°C pour la levure. Une zone claire autour du spot de bactéries lactiques est considérée comme une inhibition positive et ce traduit par la mesure des diamètres.

La nystatine (100 μg /disque) et l'ampicilline (10 μg /disque) sont utilisées comme des témoins pour la levure et les bactéries pathogènes, respectivement. (**Samot et Badet 2013, Fleming et al., 1975**).

9.2- Recherche des substances inhibitrices de nature protéique :

Dans le but de vérifier que l'effet antimicrobien est de nature protéique, un traitement avec une protéase est évalué.

Les souches de bactéries lactiques ont été remises en culture 24 h dans 10 mL du bouillon MRS et incubées à 30°C . Cette suspension bactérienne est centrifugée à 10.000 g pendant 10 minutes. Le surnageant est alors séparé du culot et filtré à l'aide

d'un filtre Millipore de 0.20 μm (*Minisarts*[®], *Sartorius Stedim Biotech*), ceci afin d'éliminer toute éventuelle cellule bactérienne persistante dans le surnageant. Ce dernier a été neutralisé à un pH égal à 6,8 à l'aide d'une solution de NaOH 5N.

Un volume de 250 μL d'une solution de protéinase K (0,2 mg/mL, Sigma-Aldrich) est ajouté à 10 mL du bouillon MRS. Le tout est incubé à 37°C pendant une nuit.

Des cultures microbiennes des microorganismes cibles ont été réalisées sur bouillon BHIB à 37°C pendant la nuit pour les bactéries et sur bouillon Sabouraud à 30°C pendant 24 à 48h pour la levure. Les microorganismes cibles ont été cultivés jusqu'à ce que l'absorbance $A_{620\text{nm}}$ soit comprise entre 0,08 et 0,1. Ensuite, un étalement de ces souches sur les géloses Mueller-Hinton (bactéries) ou Sabouraud (levure) a été réalisé à l'aide d'un écouvillon stérile.

Des disques de papiers Wattman stériles de 06 mm de diamètre sont imbibés avec 10 μl du surnageant filtré et déposés sur la gélose qui a été préalablement ensemencée avec la souche pathogène. Les géloses sont laissées à incuber à 37°C et à 30°C en aérobiose pour les bactéries et la levure, respectivement. La lecture se fait après 24h pour les bactéries et 48 à 72h à pour la levure.

La nystatine (100 μg /disque) et l'ampicilline (10 μg /disque) sont utilisées comme des témoins pour la levure et pour les bactéries pathogènes, respectivement. (**Samot et Badet, 2013, Balcázar et al., 2008**).

Résultats et discussion



I. pH des échantillons :

Les résultats de mesure de pH des trois échantillons que nous avons obtenus sont représentés dans la figure suivante :

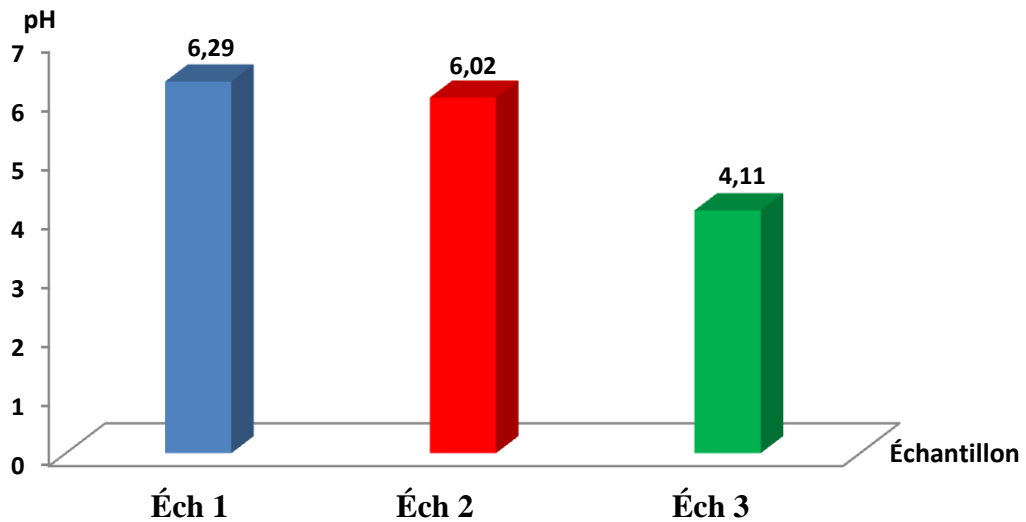


Figure 03. Les valeurs de pH des trois échantillons.

En observant la figure ci-dessus nous remarquons que les deux échantillons (1 et 2) de “Jben” provenant de la même région “Méchria” possèdent presque la même valeur de pH qui égale à 6.29 pour l’échantillon 1 et 6.02 pour le deuxième échantillon.

Ces résultats sont similaires avec ceux reportées par **Belyagoubi et Abdelouahid (2013)**. Ces auteurs ont révélés pour le “Jben” de la région de “Méchria”, une valeur de 6.38.

Contrairement, pour l’échantillon 3 on a trouvé un pH de 4.11, cette valeur est perpétuellement inférieure aux résultats des deux échantillons de la région de Méchria et à ceux rapportés dans les études des auteurs précédents.

Par contre, cette valeur du pH, que nous avons trouvé, concorde avec celle déjà rapportée par **Hamama(1997)**, qui a trouvé des résultats de 3.70 à 4.80.

Nous concluons que la différence trouvée entre les valeurs de pH peut être due à plusieurs facteurs tels que la méthode de préparation, la période de préparation, le transport et la méthode de conservation,

II. Dénombrement de la flore mésophile totale

Le résultat de dénombrement de la flore mésophile totale des trois échantillons est mentionné dans la figure suivante.

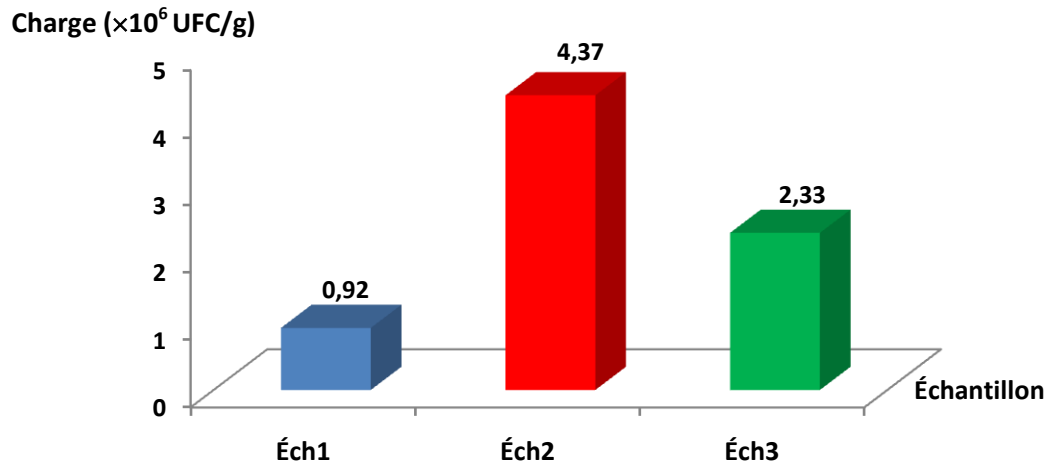


Figure 04. Dénombrement de la flore mésophile totale à 30°C



Photo 02. Dénombrement de la flore mésophile totale sur le milieu P.C.A à 30°C

En observant la figure 04 du dénombrement de la flore mésophile totale à 30°C sur le milieu P.C.A, nous remarquons que le “Jben 2” possède la plus grande charge microbienne (4.37×10^6 UFC/g), puis le troisième échantillon qui a une charge microbienne de 2.33×10^6 UFC/g, et enfin la plus faible c’est celle de l’échantillon 1 (0.92×10^6 UFC/g).

Ces valeurs obtenues sont plus élevées par rapport aux résultats mentionnés par **Mennane et al., (2007)**, où le “Jben” a une charge de 7.5×10^4 UFC/g.

Par contre sont moins élevée par rapport aux travaux de **Belyagoubi et Abdelouahid (2013)** où la charge est de 3.47×10^7 UFC/g.

III. Isolement des bactéries lactiques

Nous avons utilisé trois milieux MRS à pH 6.2 et à 5.6 et M17 pour le dénombrement de la flore lactique (**Figure 05**).

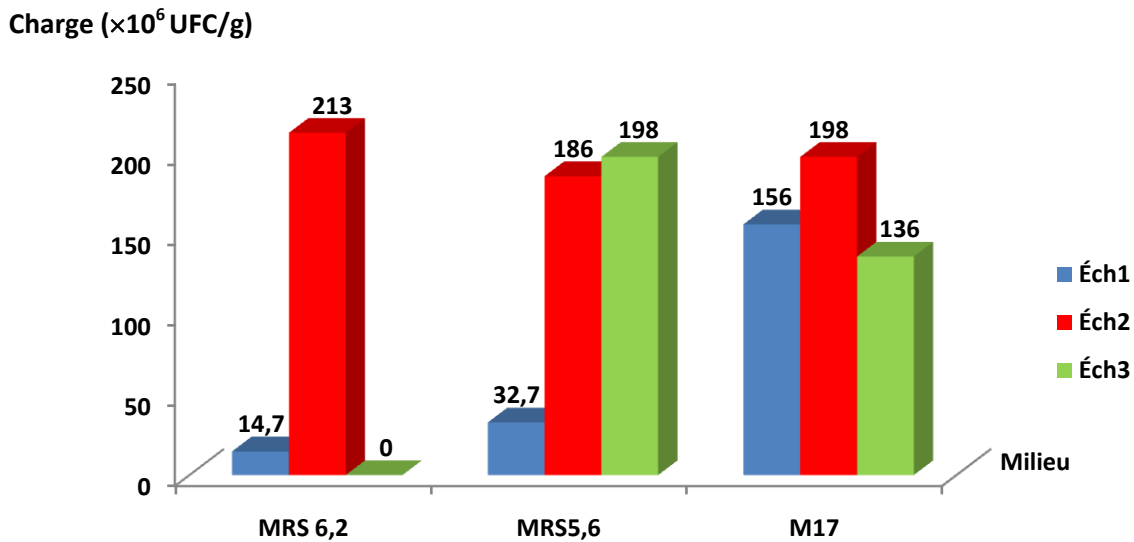


Figure 05. Dénombrement des bactéries lactiques à 30°C.

D'après l'histogramme précédent, nous distinguons qu'à une température d'incubation de 30°C, l'échantillon 1 de Jben possède une charge de bactéries lactiques qui égale à 14.7×10^6 UFC/g, 32.7×10^6 UFC/g et 156×10^6 UFC/g, sur les trois milieux respectivement.

L'échantillon 2 à une charge en bactéries de 213×10^6 UFC/g, 186×10^6 UFC/g, 198×10^6 UFC/g, sur les trois milieux respectivement.

Pour le troisième échantillon nous avons trouvé une valeur de 198×10^6 UFC/g et 136×10^6 UFC/g, sur milieux MRS 5.6 et M17, respectivement avec une absence de microorganismes sur le milieu MRS 6.2.

Les résultats obtenus indiquent que le Jben 2 possède la plus grande charge microbienne, puis le Jben 3, par contre, la plus faible charge est celle du Jben1.

À la température d'incubation de 45°C, nous avons trouvé les résultats introduits dans la figure 06 suivante :

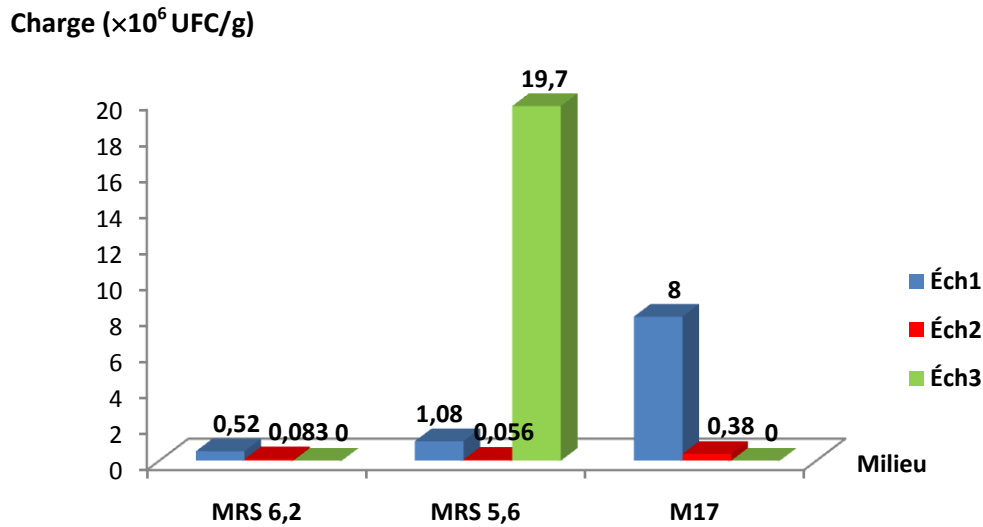


Figure 06. Dénombrement des bactéries lactique à 45°C

En observant l'histogramme, nous remarquons une charge très élevée pour l'échantillon 3 qui atteint la valeur de $19,7 \times 10^6$ UFC/g sur le milieu MRS 5.6, par contre une absence totale des bactéries sur les autres milieux.

L'échantillon 1 possède une charge élevée sur milieu M17 (8×10^6 UFC/g) par rapport aux autres milieux de MRS (6.2 et 5.6). Cependant pour le deuxième échantillon la charge est moins élevée.

Les résultats du dénombrement de la flore lactique à 30°C et 45°C montrent que les bactéries lactiques sont présentes dans tous les échantillons de « Jben » sont en accord avec celle déjà décrite par **Ouadghiri (2009)** qui a trouvée des dénombrements de 10^8 à 10^9 UFC/g dans le Jben du Maroc.

Ces valeurs sont plus élevées par rapport aux résultats mentionnées par **Mennane et al., (2007)**, où le « Jben » possède une charge de $7,5 \times 10^4$ UFC/g.

D'après les travaux de **Bekhouché et Boulahrouf (2005)**, la charge lactique varie entre $0,579 \times 10^7$ et $11,40 \times 10^7$ UFC/ml

Cette différence de la charge est peut être due à plusieurs facteurs tels que la méthode de préparation, la période d'échantillonnage, ainsi que l'origine du lait etc....

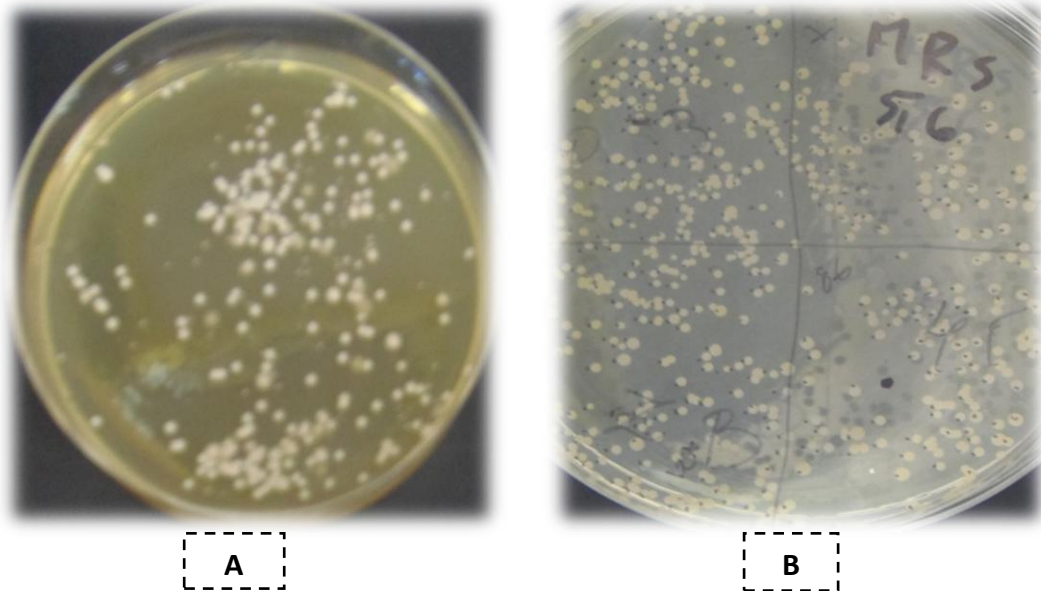


Photo 03. Dénombrement de la flore lactique sur le milieu M17 [A] et MRS 5.6 [B] à 30°C.

IV. Identification des souches

IV.1. Examen macroscopique

Le résultat de l'examen macroscopique est illustré dans le tableau 10 suivant.

Tableau 10 : Aspects macroscopiques et milieux d'isolement des souches

| Origine | Code de la souche | Milieu d'isolement | Observation macroscopique |
|-------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|
| Méchria | S1 (S1 JMZ) | MRS 10 ⁻² 45°C | Blanche très petite |
| | S2 (S1 JMZ) | MRS 10 ⁻¹ 45°C | Blanche petite |
| | S3 (S3 JMZ) | M17 10 ⁻⁵ 30°C | Blanche petite |
| | S4 (S2 JM2) | M17 10 ⁻³ 45°C | Blanche très petite |
| | S5 (S3 JM2) | M17 10 ⁻⁴ 45°C | Blanche petite |
| | S6 (S4 JM2) | MRS 10 ⁻¹ 45°C | Blanche très petite |
| | S7 (S5 JM2) | MRS 10 ⁻⁴ 45°C | Blanche petite |
| | S8 (S6 JM2) | MRS 10 ⁻⁴ 30°C | Blanche très petite |
| | S9 (S8 JM2) | MRS 10 ⁻¹ 45°C | Blanche très petite |
| | S10 (S9 JM2) | MRS 10 ⁻¹ 45°C | Blanche petite |
| El –Bayadh | S11 (S1JBZ) | MRS 10 ⁻⁷ 30°C | Blanche petite |
| | S12 (S2JBZ) | MRS 10 ⁻⁵ 30°C | Blanche petite |
| | S13 (S3JBZ) | MRS 10 ⁻⁶ 30°C | Blanche très petite |
| | S14 (S4JBZ) | MRS 10 ⁻³ 30°C | Blanche petite |
| | S15 (S5JBZ) | MRS 10 ⁻⁴ 30°C | Blanche petite |
| | S16 (S6JBZ) | M17 10 ⁻⁵ 30°C | Blanche petite |

Les cultures obtenues sur boîtes de Pétri sont observées à l'œil nu pour caractériser la forme, la taille, l'aspect ainsi que la couleur des colonies (**Badis et al., 2006**). L'examen macroscopique des cultures sur milieux MRS (6.2, 5.6) et M17 montre que toutes les colonies sont de couleur blanchâtre et la plupart d'entre eux possèdent une taille petite jusqu'à très petite pour certaines.

IV.2.Examen microscopique

Le résultat de cet examen est résumé dans le tableau 11 ci-dessous.

Tableau 11 : résultats des tests catalase, oxydase et coloration de Gram et aspect microscopique des souches.

| Souche | Coloration de Gram | Catalase | Oxydase | Etat frais | |
|------------|--------------------|----------|---------|------------|------------------------|
| | | | | Forme | Regroupement |
| S1 | + | - | - | Coque | Chainettes / isolées |
| S2 | + | - | - | Coque | Chainettes / isolées |
| S3 | + | - | - | Coque | Chaînettes / isolées |
| S4 | + | - | - | Coque | Chaînette /diplocoques |
| S5 | + | - | - | Bacille | isolées |
| S6 | + | - | - | Coque | Chainettes en amas |
| S7 | + | - | - | Bacille | isolées |
| S8 | + | - | - | Coque | Chaînette / isolées |
| S9 | + | - | - | Coque | Chaînette/tétracoques |
| S10 | + | - | - | Coque | Chaînette / isolées |
| S11 | + | - | - | Coque | Chaînette / isolées |
| S12 | + | - | - | Coque | Chaînette / isolées |
| S13 | + | - | - | Coque | Chaînettes / isolées |
| S14 | + | - | - | Coque | Chaînette/diplocoques |
| S15 | + | - | - | Coque | Chaînettes |
| S16 | + | - | - | Coque | Chaînettes/tétracoques |

+ : positif ; - : négatif.

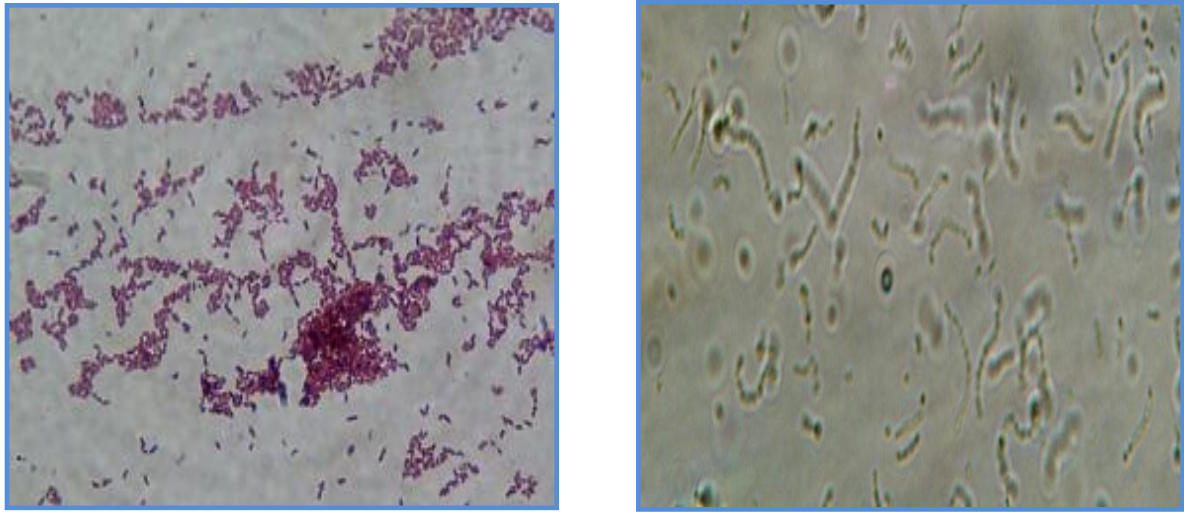


Photo 04. Observations microscopiques des bactéries lactiques avec un grossissement x 1000 ([A] : coloration de Gram, [B] : état frais).

Après la coloration de Gram, on a passé à l'observation microscopique au (Gx10), (Gx40) et (Gx100) avec l'huile à immersion, où on a pu observer que les bactéries étaient Gram positives et catalase plus oxydase négatif apparaissant généralement sous formes de coques sauf deux souches S5, S7 qui apparaissent comme étant des bacilles, avec différents modes d'associations généralement en chaînette sous forme diplocoques, tétracoques ou bien isolées et ainsi en amas.

IV.3. Tests de : Température, pH, NaCl et Thermorésistance.

Le résultat de ces tests est résumé dans le tableau 12

Tableau 12 : Tests de : Température, pH, NaCl et Thermorésistance.

| Souche | Température [°C] | | | pH | | | NaCl (%) | | | | Thermorésistance (63,5°C/30min) |
|-----------------------|---------------------|----|------|-----|-----|---|-------------|---|-----|----|------------------------------------|
| | 5 | 37 | 44.5 | 4.5 | 6.5 | 8 | 2 | 4 | 6.5 | 10 | |
| S₁ | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + |
| S₂ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| S₃ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| S₄ | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| S₅ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| S₆ | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| S₇ | + | + | + | - | + | + | + | + | + | - | + |
| S₈ | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| S₉ | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| S₁₀ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| S₁₁ | - | + | + | - | + | + | + | + | + | - | - |
| S₁₂ | - | + | + | - | + | + | + | + | - | + | + |
| S₁₃ | - | + | + | - | + | + | + | + | + | - | + |
| S₁₄ | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + |
| S₁₅ | - | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + |
| S₁₆ | - | + | + | - | + | + | + | + | + | - | + |

+ : croissance ; - : pas de croissance.

- Toutes les souches isolées sont capable de se croitre sur le bouillon MRS avec une concentration de 2% et 4%.

Il y a un nombre limité de souches de bactéries lactiques qui n'ont pas pu croitre sur le milieu dont les concentrations sont de 6.5% et 10% ; c'est le cas des souches **S12** et **S15** pour la concentration de 6.5% et les quatre souches **S7**, **S11**, **S13**, **S16** pour la concentration de 10%.

- Une croissance de toutes les souches de bactéries sur le bouillon MRS à pH 6.5 et 8 a été remarquée. Par contre, seulement neuf souches (**S2, S3, S4, S5, S6, S8, S9, S10**) qui possèdent la capacité de se croître à pH 4.5.

- Toutes les souches de bactéries lactiques sont capables de se multiplier à la température de 37°C et 44.5 °C.

Par contre à une température de 5°C nous avons signalé le développement de seulement six souches qui sont : **S1, S2, S3, S5, S7, S10**.

- La plus part des souches isolés sont thermorésistantes, ou nous avons observé une croissance sur le bouillon MRS après un traitement thermique pendant 30 minutes à 63.5°C à l'exception d'une seule souche **S11** parmi les autres qui est dépourvue de la thermorésistance.

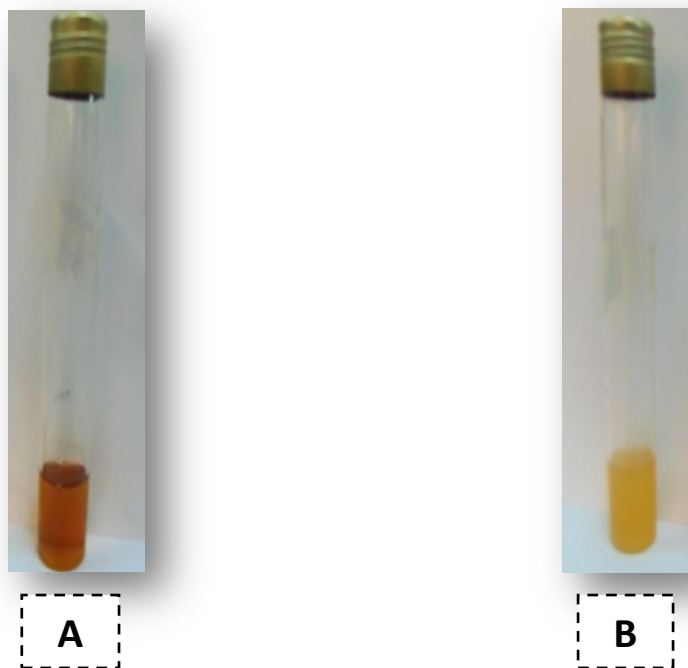


Photo 05. Effet de pH sur la croissance des bactéries lactiques isolées

(**[B]**: pH 6.5, **[A]**: témoin).

IV.4. Tests biochimiques classiques

Le tableau 13 mentionné ci-dessous représente les résultats des tests biochimiques classiques d'identification.

Tableau 13 : Résultats des tests biochimiques classiques d'identification des souches isolées.

| Souche | Mannitol Mobilité | | Clark et Lubs | | Urée Indole | Citrate de Simmons | TSI | | | | |
|-----------------|----------------------|----------|---------------------|----|-------------|-----------------------|--------|---------------------------|------------------|-----|---------|
| | Mannitol | Mobilité | RM | VP | | | Indole | Utilisation du citrate | H ₂ S | Gaz | Glucose |
| S ₁ | + | + | + | - | - | - | - | - | + | + | + |
| S ₂ | + | + | + | - | - | - | - | - | + | + | + |
| S ₃ | + | + | + | - | - | - | - | - | + | + | + |
| S ₄ | + | + | + | - | - | + | - | - | + | + | + |
| S ₅ | + | + | + | - | - | - | - | - | + | + | + |
| S ₆ | + | - | + | - | - | - | - | - | + | + | + |
| S ₇ | + | + | + | - | - | - | - | - | + | + | + |
| S ₈ | + | - | + | - | - | + | - | - | + | + | + |
| S ₉ | + | - | + | - | - | + | - | - | + | + | + |
| S ₁₀ | + | - | + | - | - | + | - | - | + | + | + |
| S ₁₁ | - | - | + | - | - | - | - | + | + | + | + |
| S ₁₂ | + | - | + | - | - | - | - | - | + | + | + |
| S ₁₃ | + | + | + | - | - | + | - | + | + | + | + |
| S ₁₄ | + | - | + | - | - | - | - | - | + | + | + |
| S ₁₅ | + | + | - | + | - | + | - | - | + | + | - |
| S ₁₆ | + | - | + | - | - | + | - | - | + | + | + |

+ : test positif; - : test négatif.



A



B

Photo 06. Test de Citrate de Simmons [A], et témoin [B].



A



B

Photo 07. Résultat de test de Mannitol Mobilité [A] et le témoin [B].

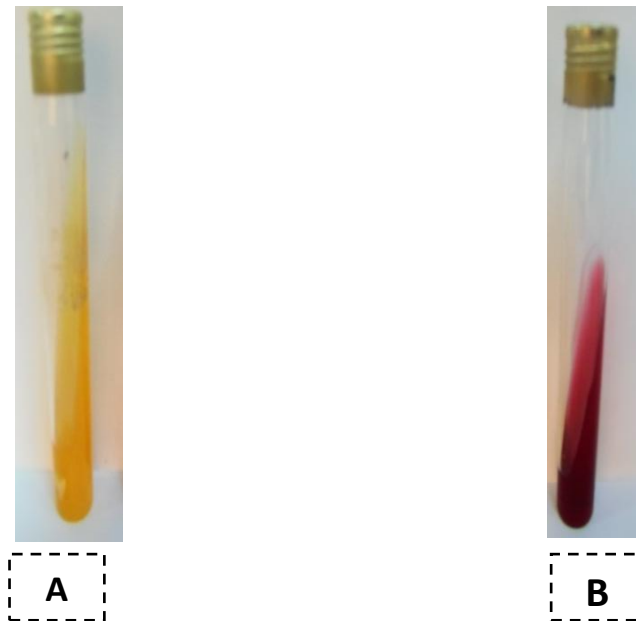


Photo 08. Résultat de test de TSI [A] et le témoin [B].

IV.5. Résultats de la Galeries API 20E :



Photo 09 : Résultat de la Galerie API20 E

Le résultat de ce test est résumé dans le tableau 14.

Tableau14 : résultats d'identification des souches par la galerie (API 20 E).

| Test | Souche S1 | Souche S4 | Souche S5 | Souche S6 | Souche S8 | Souche S9 | Souche S10 | Souche S11 | Souche S15 | Souche S16 |
|------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|------------|
| ONP G | - | + | + | - | + | + | + | - | + | + |
| ADH | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| LDC | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ODC | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| CIT | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| H ₂ S | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| URE | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| TDA | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| IND | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| VP | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| GEL | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| GLU | + | - | - | - | - | + | + | - | - | - |
| MAN | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - |
| INO | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| SOR | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| RHA | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| SAC | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| MEL | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| AMY | + | - | + | + | + | - | - | - | + | - |
| ARA | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

+ : croissance positive ; - : croissance négative

Selon le schéma général de différenciation des genres appartenant aux bactéries lactique (Carr et al., 2002) et d'après l'utilisation des tests d'identifications morphologiques et biochimiques classiques et de la Galerie API 20 E, nos souches bactériennes isolées à partir du produit laitier différent « Jben » peuvent être apparentées probablement au genres :

Lactobacillus : S5 et S7.

Pediococcus : S9 et S16

Enterococcus : S1, S2, S3, S4, S6, S8, S10, S11, S12, S13, S14, S15.

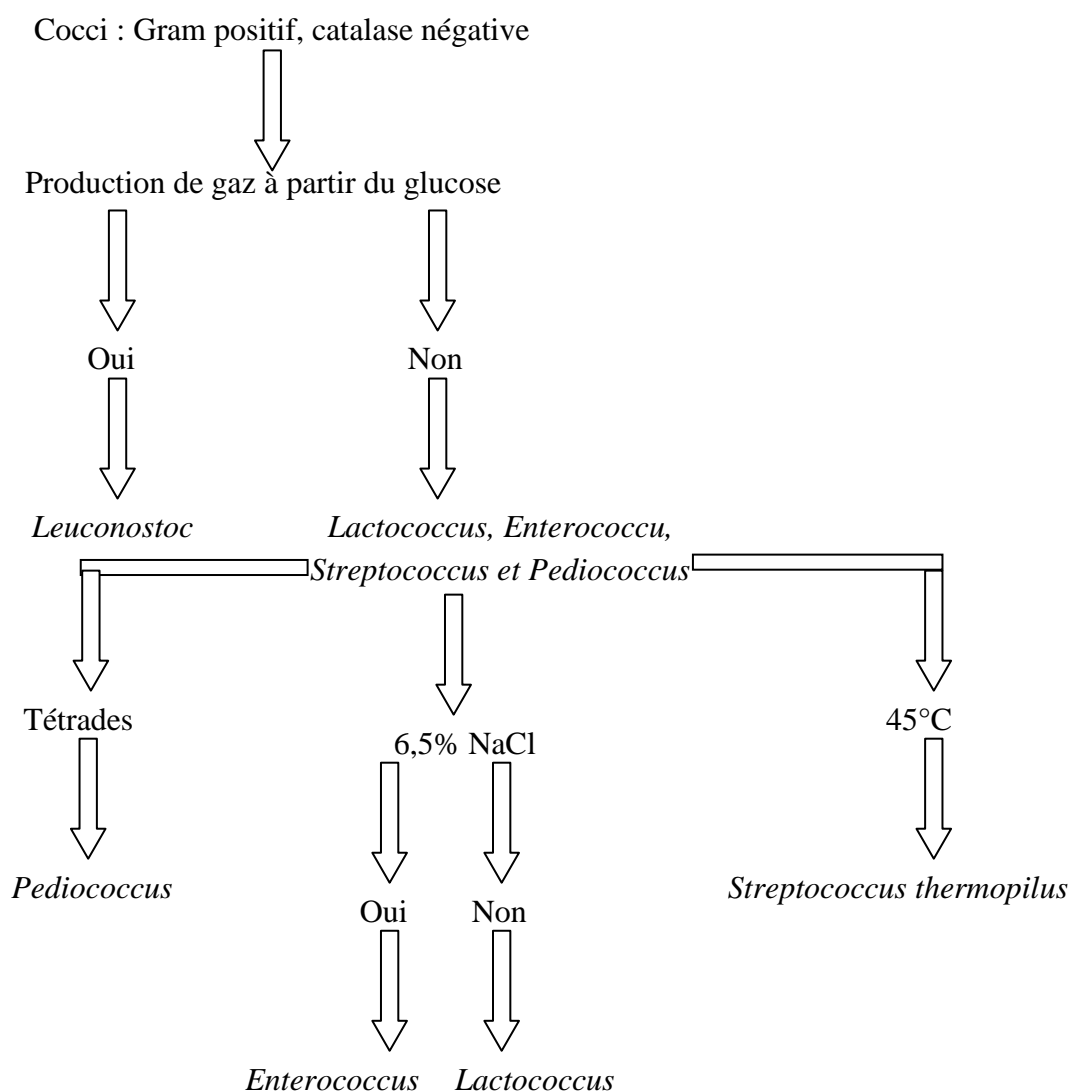


Figure 07: Schéma de différenciation entre les bactéries lactiques (Carr et al., 2002).

V. Résultats de l'activité antimicrobienne

V.1. Antagonisme bactéries lactiques et microorganismes pathogènes

La capacité de compétition de bactéries lactiques résulte de leurs activités fermentaires associées à la production de divers composés antimicrobiens dans le but d'inhiber la prolifération de microorganismes. De nombreuses substances à activité antagoniste produites par les bactéries lactiques ont régulièrement été mises en évidence (Rodrigues et al., 2002).

Les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyl et les bactériocines (Dortu et Thonart, 2009).

V.1.1. Antagonisme bactéries lactiques / *Escherichia coli* ATCC8739

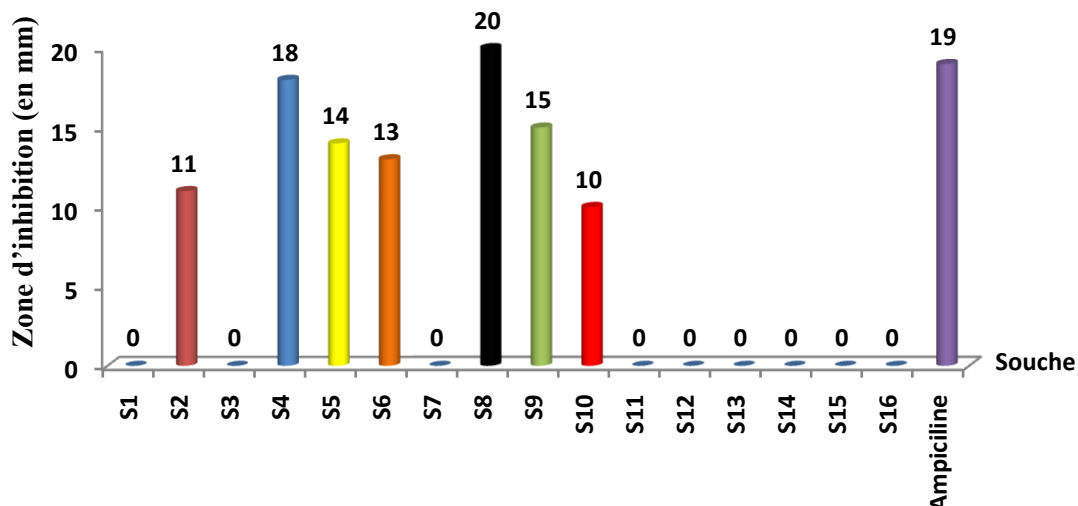


Figure 08. Interactions entre les souches de bactéries lactiques et *Escherichia coli*.

La figure 08 montre que les six dernières souches isolées de «Jben» de la région d'El-Bayadh (S11, S12, S13, S14, S15, S16) ne présentent pas une zone d'inhibition vis-à-vis d'*Escherichia coli*.

Par contre, pour les autres souches (S2, S4, S5, S6, S8, S9, S10) ont un diamètre de zone d'inhibition qui varie entre 10 à 20 mm pour la majorité des souches sauf les trois souches S1, S3 isolées d'échantillon1 et la souche S7 isolée d'échantillon 2 ou la zone d'inhibition est nulle.

Pour le contrôle positif, le diamètre d'inhibition est de 19 mm pour l'ampicilline, ce qui nous a permis de dire que cette souche est sensible (CASFM, 2012).

V.1.2. Antagonisme bactéries lactiques / *Listeria monocytogenes* ATCC19111

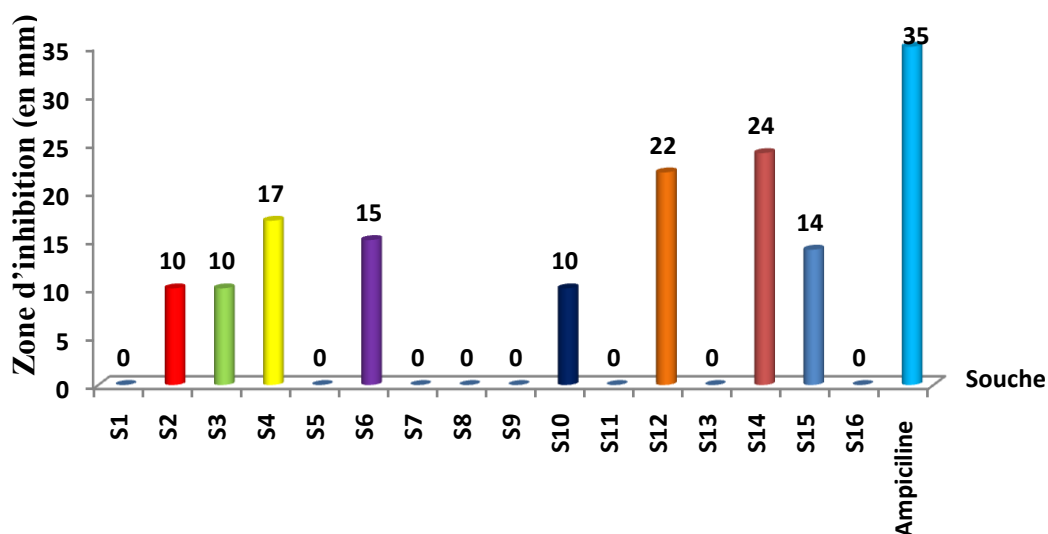


Figure09. Interactions entre les souches de bactéries lactiques et *Listeria monocytogenes*.

Dans la figure 09 citée en dessus, nous observons un diamètre de zone d'inhibition de 10 mm pour les trois souches (S2, S3, S10).

Nous remarquons que pour les 5 souches qui restent sont actives contre *L. monocytogenes* avec des diamètres d'inhibition varient entre 14 et 24 mm. Les autres souches (S1, S5, S7, S8, S9, S11, S13, S16) ne sont pas actif vis-à-vis à la souche pathogène *Listeria monocytogenes*.

Pour le contrôle positif, le diamètre d'inhibition est de 35 mm pour l'ampicilline, ce qui nous a permis de dire que cette souche est sensible (CASFM, 2012).

V.1.3. Antagonisme bactéries lactiques / *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

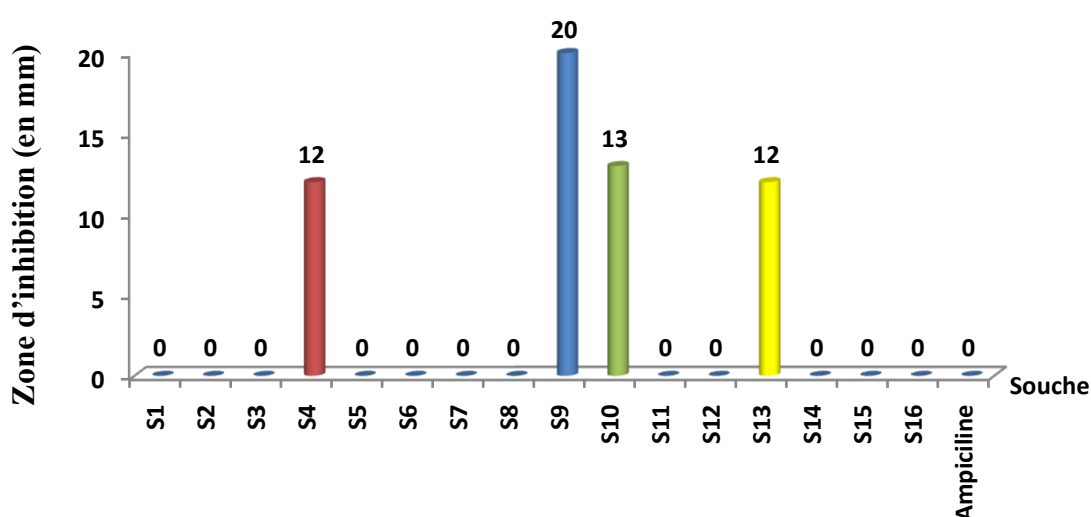


Figure 10. Interactions entre les souches de bactéries lactiques et *Staphylococcus aureus*.

En remarquant dans la figure précédente, nous distinguons un diamètre de zone d'inhibition qui égale à 12 mm pour les deux souches (S4, S13), ces dernières appartiennent à deux différents échantillons prélevés de deux régions différentes.

Les souches S9 et S10 présentent une zone d'inhibition d'un diamètre de 20 et 13 respectivement. Cependant, les autres souches sont dépourvues de zone d'inhibition.

Pour le contrôle positif, le diamètre d'inhibition est de 0 mm pour l'ampicilline, ce qui nous a permis de dire que cette souche est résistante (CASFM, 2012).

V.1.4. Antagonisme bactéries lactiques / *Micrococcus lutus* ATCC 9341.

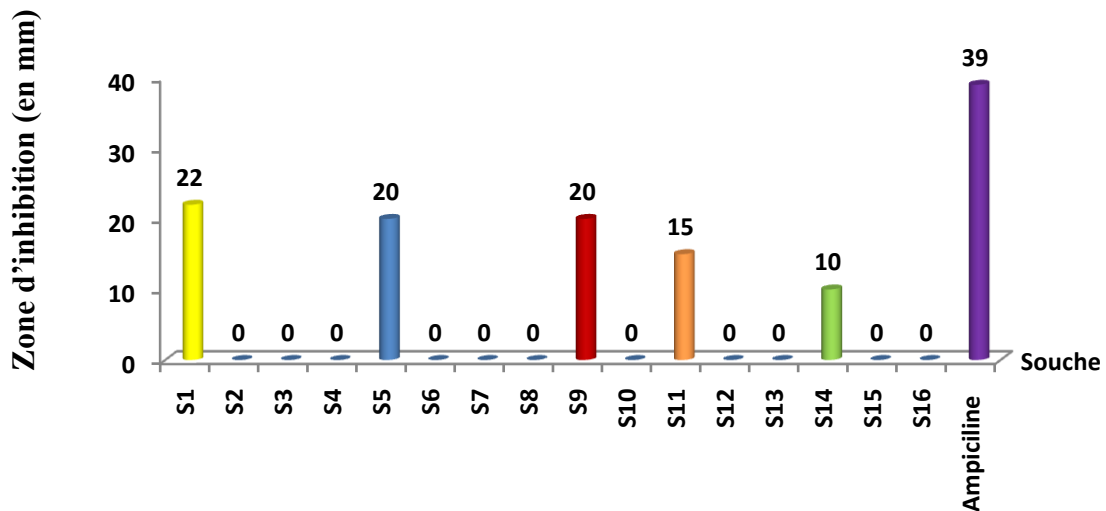


Figure 11. Interactions entre les souches de bactéries lactiques et *Micrococcus lutus*.

Nous avons constatés d'après la figure 11 que la souche *Micrococcus lutus* possède une résistance envers la plupart des souches (S2, S3, S4, S6, S7, S8, S10, S12, S13, S15 et S16), par contre les autres souches sont sensibles et actives avec un diamètre qui varie entre 10 à 20 mm.

Pour le contrôle positif, le diamètre d'inhibition est de 39 mm pour l'ampicilline, ce qui nous a permis de dire que cette souche est sensible (CASFM, 2012).

V.1.5. Antagonisme bactéries lactiques / *Bacillus cereus* ATCC 25921.

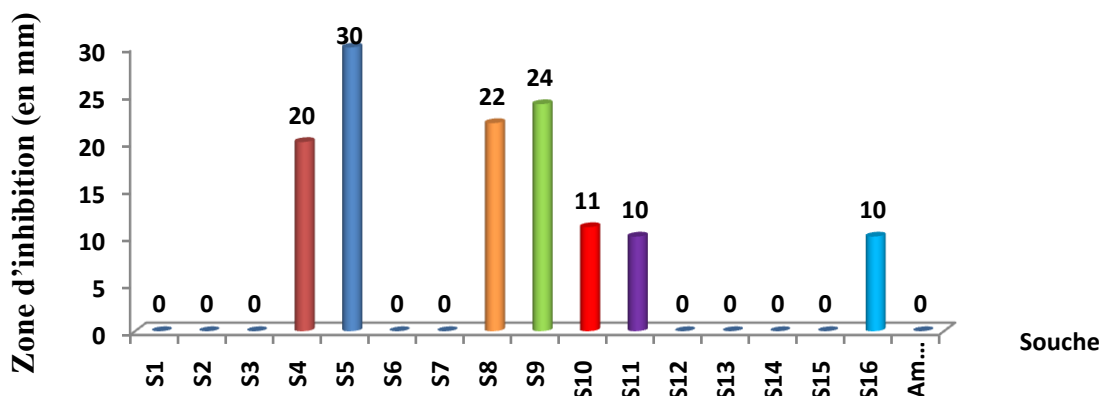


Figure 12. Interactions entre les souches de bactéries lactiques et *Bacillus cereus*.

Selon l’histogramme de la figure 12, nous remarquons que les souches (S4, S5, S8, S9, S10, S11 et S16) présentent des zones d’inhibition de diamètres de (20, 30, 22, 24, 11, 10 et 10) mm respectivement. Les autres souches semblent inactives vis-à-vis la souche pathogène *Bacillus cereus*.

Pour le contrôle positif, le diamètre d’inhibition est de 0 mm pour l’ampicilline, ce qui nous a permis de dire que cette souche est résistante (CASFM, 2012).

V.1.6. Antagonisme bactéries lactiques / *Klebsiella pneumoniae* IBMC Strasbourg

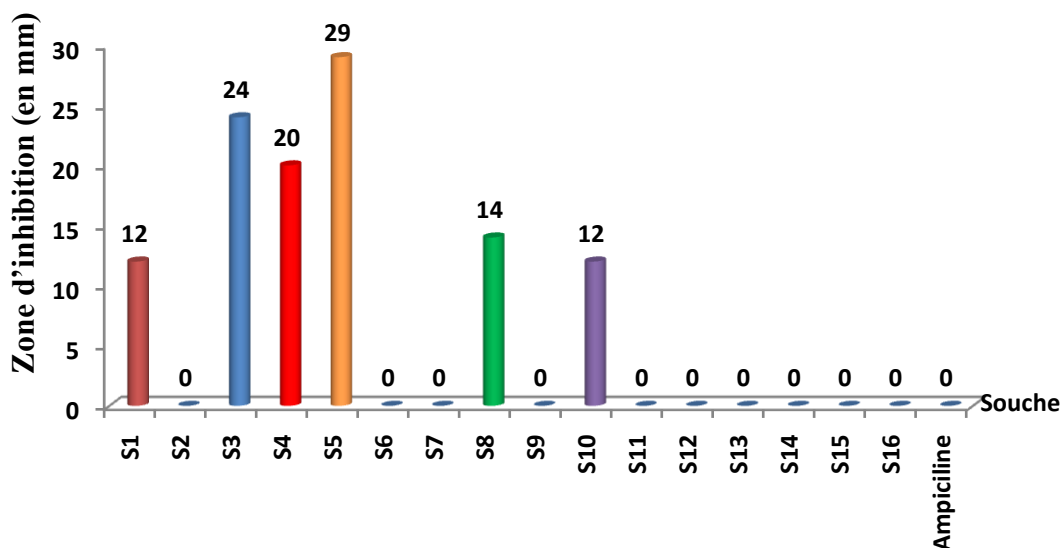


Figure13. Interactions entre les souches de bactéries lactiques et *Klebsiella pneumoniae*.

D’après les résultats cités dans l’histogramme précédant, nous remarquons que les souches isolées de l’échantillon 3 (S11, S12, S13, S14, S15, S16) ne possèdent pas une zone d’inhibition contrairement aux autres souches qui restent.

Les diamètres d'inhibition obtenus pour les autres souches varient entre 12 et 29 mm, La souche S5 possède le plus grand diamètre de zone d'inhibition qu'est de 29 mm.

Pour le contrôle positif, le diamètre d'inhibition est de 0 mm pour l'ampicilline, ce qui nous a permis de dire que cette souche est résistante (CASFM, 2012).

V.1.7. Antagonisme bactéries lactiques / *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853

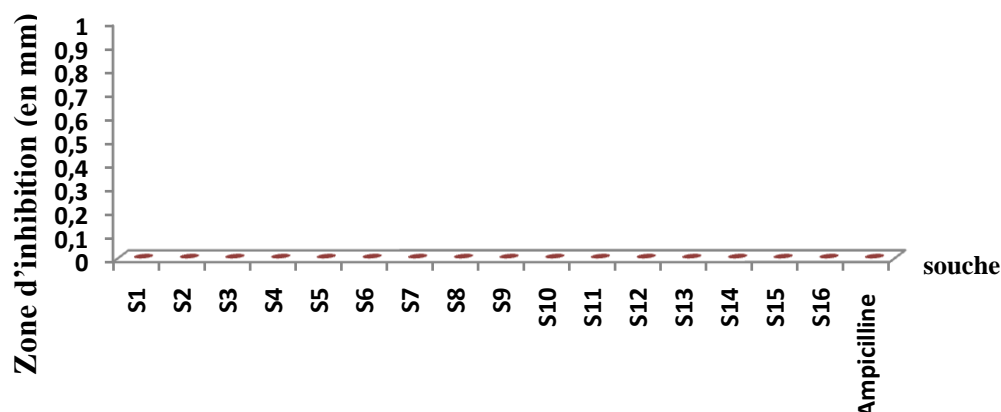


Figure14. Interactions entre les souches de bactéries lactiques et *Klebsiella pneumoniae*

V.1.8. Antagonisme bactéries lactiques / *Candida albicans* IBMC Strasbourg.

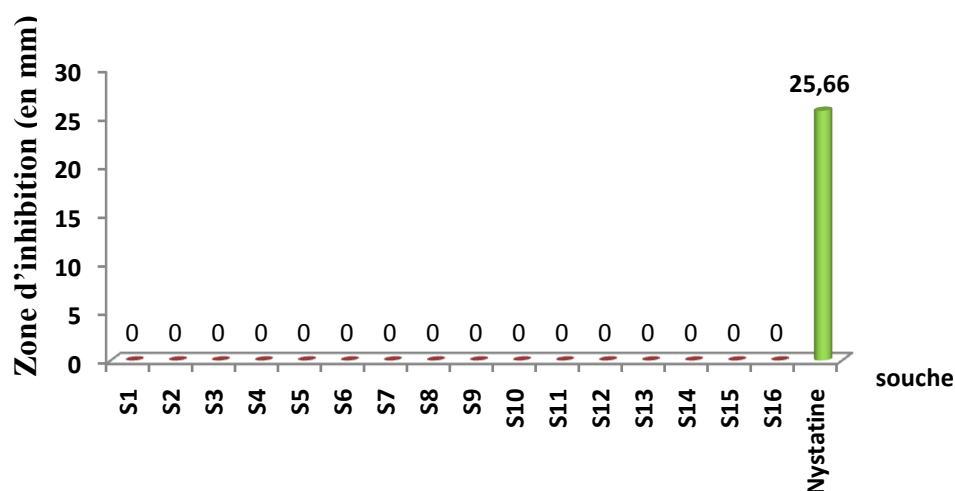


Figure14. Interactions entre les souches de bactéries lactiques et *Candida albicans*

En remarquant les résultats d'antagonisme des bactéries lactiques vis-à-vis à la souche pathogène *Pseudomonas aeruginosa* et la levure *Candida albicans*, nous constatons qu'elles ne présentent pas une zone d'inhibition.

Pour le contrôle positif, le diamètre d'inhibition de la souche *Pseudomonas aeruginosa* est de 0 mm pour l'ampicilline, ce qui nous a permis de dire que ce microorganisme est résistant (CASFM, 2012). Ainsi pour le contrôle positif du test antifongique, le diamètre d'inhibition est de 25.66 mm pour la nystatine sur *Candida albicans*, ce qui nous a permis de dire que cette souche est sensible (Drouhet et Dupont, 1978; Drouhet et al., 1981).

Enfin nous avons trouvés que nos résultats d'antagonisme concordent avec celles de Boudjani (2009), les diamètres des zones d'inhibition de bactéries lactiques isolées du lait cru de vache peuvent atteindre environ 20 mm.

Ces valeurs trouvées peuvent coïncident avec les travaux de Bouzid (2008), où les diamètres des zones d'inhibition de bactéries lactiques isolées du lait de chamelle sont de l'ordre de 11mm jusqu'au 17 mm.

Elles se diffèrent des travaux de Savadogo et al., (2004), où les diamètres des zones d'inhibition des bactéries lactiques isolées du lait fermenté sont de l'ordre de 9 à 10 mm vis-à-vis de *S. aureus* et de 8 à 9 mm vis-à-vis d'*E. coli*.

En comparaison avec les travaux de Benmammer et Hamsi (2003), qui ont trouvé des zones inhibition des souches de *Leuconostoc sp.* de lait cru de brebis sur *L. monocytogenes* (4 à 10mm), *S. aureus* (6 à 10 mm), *E. coli* (2 à 4mm), nos souches sont plus actives.

La photo 10 présentée ci dessous représente des exemples d'antagonisme entre les bactéries lactiques et des souches pathogènes.

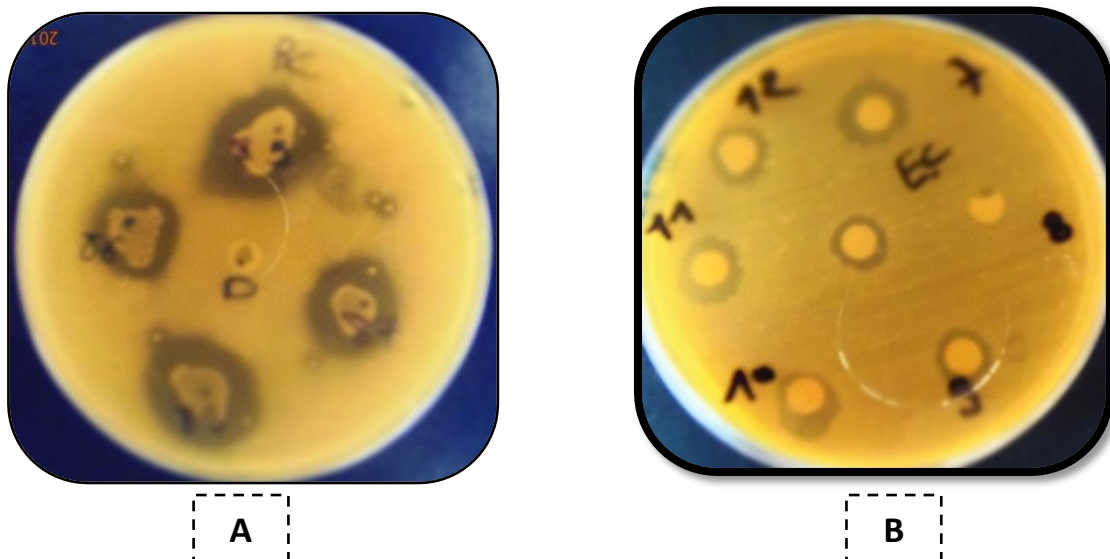


Photo 10 : Résultat d'antagonisme vis à vis de *Bacillus cereus* [A] et *Escherichia coli* [B].

V.2. Recherche des substances inhibitrices de nature protéique :

Les bactériocines font partie de ces composés antimicrobiens inhibiteurs qui confèrent aux souches productrices des avantages écologiques dans leur niche spécifique, telle que la nisine qui est utilisée comme additif bio-préservateur dans l'agroalimentaire (**Benhamouche, 2005**).

Les résultats obtenus ont montré que les 16 bactéries lactiques sont des producteurs de bactériocines avec des diamètres d'inhibition égale à 0 mm.

La perte de l'activité antimicrobienne après traitement avec protéase K indique la sensibilité des composés actifs sécrétés par les souches mises en culture qui peuvent être probablement des bactériocines. Puisque les bactériocines sont par définition des substances protéiques. Elles doivent être sensibles à au moins à une enzyme. En conséquence, la sensibilité aux enzymes protéolytiques est le critère principal dans leur caractérisation (**Çon et Gökalp, 2000**).

Ces valeurs sont concordantes avec les travaux de **Luo et al., (2011)**, où les souches T1, S2, S9, T11 et T14 isolées du lait traditionnel de Yack fermenté naturellement de plateau Qinghai Tibet, ont des diamètres d'inhibition de 0 mm contre les bactéries pathogènes utilisées.

D'autres résultats sont similaires selon les travaux cités dans la bibliographie réalisés par **Samot J. et Badet (2013)** et **Cizeikiene et al., (2013)** sur les bactéries lactiques.

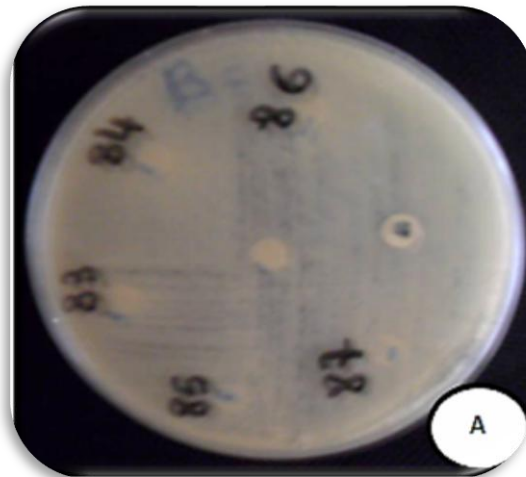


Photo11 : Résultat du test de la recherche de substances inhibitrices de nature protéique.

Conclusion

Cette étude nous a permis d'avoir une idée sur la composition de la flore microbienne en bactéries lactiques d'un produit laitier traditionnel "Jben". Ce fromage frais montre une très grande diversité d'espèces qui dépend des régions et des modes de fabrication.

Au cours de notre étude dont le but était d'identifier et de mettre en valeur les activités antimicrobiennes des bactéries lactiques, qui peuvent participer à la conservation des produits laitiers, en produisant des substances susceptibles d'inhiber les bactéries responsables de leur altération.

Les résultats obtenus lors de notre étude montrent que la charge de la flore mésophile totale est très élevée dans les trois échantillons, et celle de bactéries lactiques est remarquable dans les échantillons 2 et 3.

Selon les tests biochimiques classiques d'identification des bactéries réalisés et à l'aide des galeries biochimiques API 20E, nos souches de bactéries lactiques isolées peuvent être probablement apparentées aux genres *Lactobacillus* (souches S5 et S7), *Pediococcus* (souches S9 et S16) et les autres qui restent au genre *Enterococcus*.

Le test des interactions entre les souches lactiques isolées et les souches pathogènes a révélé des zones d'inhibition bien distincte dont le diamètre vari entre 10 à30 mm.

La comparaison des résultats obtenus dans ce travail avec ceux des autres travaux sur des produits similaires, mais dans d'autres pays, permet de conclure que l'Algérie dispose d'une biodiversité riche et particulière, et que ses produits laitiers traditionnels peuvent être une source précieuse de souches avec des propriétés antimicrobiennes intéressantes.

Nous espérons donner suites à ces travaux afin de :

- ✚ Compléter l'identification génotypique des souches de bactéries lactiques isolées.
- ✚ D'identifier les substances antimicrobiennes car pour cela la réalisation d'une série de test est impérative a savoir peroxyde, phage et l'effet des enzymes protéolytiques qui pouvant confirmer que la nature de cette substance pourrait être une bactériocine afin de l'intégrer dans le domaine pharmaceutiques ou agroalimentaires.

Références bibliographiques

A

- ❑ **AFNOR, 1996.** NF ISO 7218. Microbiologie des aliments. Règles générales pour les examens microbiologiques. 47 pages.
- ❑ **Aissaoui, Z. 2004.** Le fromage traditionnel algérien « bouhezza». séminaire d'animation régional. "technologies douces et procédés de séparation au service de la qualité et de l'innocuité des aliments", INSAT-Tunis (communication orale), Tunisie/27-28-29 novembre Actes des sommaires p 118 à 124.

B

- ❑ **Badis, A., Guetarni, D., Kihal, M., Ouzrout, R. 2005.** Caractérisation phénotypique des Bactéries lactiques isolées à partir de lait de chèvre de deux populations locales "Arabia et Kabyle». *Scien &Tech*, **23** : 30-37.
- ❑ **Balcázar, J., Vendrell, D., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Muzquiz, J., Girones, O. 2008.** Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture* 278: 188–191.
- ❑ **Bekhouche, F., Boulahrouf, A. (2005).** Etude quantitative et qualitative des bactéries lactiques de lait cru produits par des vaches locales appartenant à six stations d'élevage de Constantine. *Science &technologie*. Vol. 23, pp. 38-45.
- ❑ **Belyagoubi, L. 2014.**Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens.Thèse de doctorat en biologie. Université de Tlemcen, Algérie,79 p.
- ❑ **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
- ❑ **Benhamouche. 2005. In Boudjani, W. (2009).** Action de la flore lactique sur les bactéries contamination. Mémoire d'ingénieur, Institut de biologie, Université de Tlemcen, Algérie, 73 pages.
- ❑ **Benkerroum, N., Tamime, A.Y. 2004.**Technology transfer of some Moroccan traditional dairy products (lben, jben, smen) to small industrial scale. *Food Microbiol*. **21**: 399–314.
- ❑ **Benmammer, F., Hamsi, S. 2003. In Boudjani, W. (2009).** Action de la flore lactique sur les bactéries contamination. Mémoire d'ingénieur, Institut de biologie, Université de Tlemcen, Algérie, 73 pages.

- ❑ **Bernier, L. 2010.** Les probiotiques en 2010 : une revue de la littérature. 2010. Thèse Pharm: Université d'Angers, 166.
- ❑ **Bettache, G.,Adjoudj, F.,Hadadji,M., kihal, M. 2012.** Isolation and identification of Lactic Acid Bacteria from Dhan ,a traditional Butter and their major techhnological traits,world applied sciences journal 17(4).pp :480-488.
- ❑ **Boudjani, W. 2009.** Action de la flore lactique sur les bactéries contamination. Mémoire d'ingénieur, Institut de biologie, Université de Tlemcen, Algérie. Pages 73.
- ❑ **Bousnane ., Djadi . 2009.**Caractérisation d'un fromage traditionnel algérien « takammerite » de la région de Ghardaïa. Mémoire d'ingénieur d'état en industrie agro-alimentaire .Université Mentouri de Constantine, Algérie ,72p.
- ❑ **Bouzid. 2008.** Action de la flore lactique sur les bactéries contamination. Mémoire d'ingénieur, Institut de biologie, Université de Tlemcen. 73 pages.
- ❑ **Buist, G., Venema, G., kok, J. 1998.** Autolysis of *Lactococcus lactis* influenced by proteolysis. Journal of biotechnology. N° 22: 5974-5953.

C

- ❑ **Carr, F.J ., Chill, D., Maida, N . 2002.** Lactic Acid Bacteria :A Literature Survery.Crit.rev.microbiol ;28 :4,281-370.
- ❑ **CASFM.** Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. Edition janvier 2012.
- ❑ **Champagne et al., 1992. In Boudjani, W. 2009.** Action de la flore lactique sur les bactéries contamination. Mémoire d'ingénieur, Institut de biologie, Université de Tlemcen. 73 pages.
- ❑ **Cheriguene, A.,Chougrani, F.,Bekada, A.M.A.,El Soda, M., Bensoltane, A. 2007.** Enumeration and identification of lactic microflora in Algerian goat's milk. In African Journal of Biotechnology Vol. 6 (15), PP. 1854-1861.
- ❑ **Cizeikiene, D., Juodeikiene, G., Paskevicius, A., Bartkiene, E. 2013.** Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. Food Control 31 : 539-545.

- ❑ **Claps, S., Morone, G. 2011.** Produits laitiers et fromagers traditionnels de l'Algérie. In Développement de la Filière laitière et Fromagère en Algérie, CorFilac: 57-77.
- ❑ **Cniel. 2006.** Produit laitier. Maison de lait.
- ❑ **Collins, M.D., Jons, D. 1981.** Growth Bifidobacteria in milk and preparation of Bifidobacteria infantis for a dietary adjunct. *J. Dairy Sci*, 67: 1376-1380.
- ❑ **Çon, A.H., Gökcalp, H.Y. 2000.** Production of bacteriocin-like metabolites by lactic acid cultures isolated from sucuk samples. *Meat Sci.*, 55: 89-96.

D

- ❑ **Delarras, C. 2007.** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire : Aliments, produits cosmétiques, eaux, produits.
- ❑ **De Man, J.D., Rogosa, M., Sharpe, M.E. 1960.** A Medium for the Cultivation of Lactobacilli. – *J. Appl. Bact.* 23: 130-135.
- ❑ **De Roissart, H., Luquet, F.M. 1994.** Les bactéries lactiques. *Uriage, Lorica, France, 1* : 1- 286 pharmaceutiques. Éditions Médicales Internationales, Lavoisier 476 p.
- ❑ **Dellaglio, F., De Roissart, H., Torriani, S., Curk, M. et Janssens, C. 1994.** Bactéries lactiques aspects fondamentaux et technologiques, **1** : 25-114.
- ❑ **Desmazeaud, M. 1996.** L'état des connaissances en matériel de nutrition de bactéries lactiques. *le lait*, **63** : 267-16.
- ❑ **Dharam, P., Narender, R. P. .2007.** Indian traditional dairy products: an overview. International Conference on Traditional Dairy Foods. November 14-17. NDRI, KARNAL (INDIA).
- ❑ **Dillon, J.C. 2008.** Place du lait dans l'alimentation humaine en région chaude. Edition A. P.G (Agro Paris Tech).
- ❑ **Dortu, C., Thonart, P. 2009.** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 143-154.
- ❑ **Drouault, S., Corthier, G. 2001.** Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés.
- ❑ **Drouhet, E., Dupont, B. Bull. Soc. Fr. Mycol. Med. 1978.** 2, 165-170 – AntibioGramme Des Champignons Aux Antifongiques.

- ❑ **Drouhet E. et al., 1981**, Standardization of the Antifungal Sensitivity Tests. Report of the study group of the french society for medical mycology, Bull. Soc. Fr. Mycol. Med., 10, N°1, 131-134.
- ❑ **Duquesne, S. 2007**. Peptides antimicrobiens des entérobactéries. Etude de la voie de maturation et du mécanisme d'import de la microcine J25, peptide antimicrobien inhibiteur de l'ARN polymérase. Thèse de Doctorat en Biochimie. Université Pierre et Marie Curie-Paris 6. France. 190 p.

E

- ❑ **Ercolini, D., Russo, F., Ferrocino, I., Villani, F. 2009**. Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. *Food Microbiol*, **26**: 228–231.

F

- ❑ **FAO/WHO.2002**. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. In Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada, pp.1-11.
- ❑ **Fleming, H.R., Etschell, G.L., Costilow, R.N. 1985**. Microbial inhibition by isolate of pediococcus from cucumber brine. *Appl and Microbiology*, **30**:104-1042.

G

- ❑ **Georgalaki, M.D., Papadelli, M., Anastasiou, R., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E. 2002**. Purification and characterization of the X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase (PepX) from *Streptococcus macedonicus* and cloning of the pepX gene. *Le Lait*, 82, 657–671.
- ❑ **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.
- ❑ **Guiraud, J.P. 1998**. Microbiologie des principaux produits alimentaires, Microbiologie alimentaire. Ed ©Dunod, Paris.

H

- ❑ **Hamama, A. 1997**. Improvements of the manufacture of traditional fermented products in Morocco : case of jben (Moroccan traditional fresh cheese). In: H.A. DIRAR (éd): Emerging Technology Series - Food Processing Technologies for Africa, UNIDO, Vienna, 85-102.

- ❑ **Harris, L., Daeschel, M., Stiles, M., Klaenhammer, T. 1989.** Journal of food protection, 52, 384.
- ❑ **Hebboul, F.Z., Mazouzi, H., Soltani, S. 2005.** Etude comparative de la qualité alimentaire entre trois types de lait frais : bovin, caprin, camelin. Mémoire d'ingénieur, Département de Biologie, Université de Laghouat. 71 pages.
- ❑ **Hermier, J., Lenoir, J., Weber, F. 1997.** Rôle des bactéries lactiques dans la production des facteurs anti microbien, les groupes microbien d'intérêt laitier. Ed. Cepil. Paris. pp. 9-60.
- ❑ **Heyman, M., Heuvelin, E. 2006.** Micro-organismes probiotiques et régulation immunologique le paradoxe. *Nutrition clinique et métabolisme*, **20** : 85–9.
- ❑ **Holzappel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., Schillinger, U. 2001.** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.*, **73(suppl)**: 365S–73S.
- ❑ **Huyghebaert. 2006.** Stratégies des produits à base de lait cru. Bruxelles.

J

- ❑ **Jedidi, H. 2007.** Effet du stress gastro-intestinal sur la physiologie et le métabolisme des bactéries lactiques et probiotiques. Mémoire de Maître Es-Sciences, Institut de biologie, Université de Tlemcen. Université Laval Québec. 90 pages

K

- ❑ **Kacem, M., Karam, N.E. 2006.** Physicochemical and microbiological study of “shmen”, a traditional butter made from camel milk in the Sahara (Algeria): isolation and identification of lactic acid bacteria and yeasts. *Grasas y Aceites*, **57**, 198–204.

L

- ❑ **Lahsaoui, S. 2009.** Etude de procédé de fabrication d'un fromage traditionnel (klila). Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention de diplôme d'Ingénieur Université El Hadj Lakhdar Batna, Département d'Agronomie.
- ❑ **Larpent, J.P. 1997.** Mémento technique de microbiologie .3^{ème} Ed. Technique et Documentation Lavoisier. Paris. 910 pages.
- ❑ **Laurent, S. 1998.** Manuel de bactériologie alimentaire. *Poly technica Paris*. 307 pages.

- ❑ **Lemouchi, 2008** .Le fromage traditionnel Bouhezza : enquête dans la wilaya de Tébessa et suivie de l'évolution des caractéristiques physico-chimique de deux fabrication .mémoire d'ingénieur, INATAA, Constantine, 65p.
- ❑ **Luo, F., Feng, S., Sun, Q., Xiang, W., Zhao ,J., Zhang ,J., Yang, Z. 2011.** Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from kurut, a traditional naturally-fermented yak milk from QinghaieTibet plateau. Food Control 22 : 50-53.
- ❑ **Luquet, F.M., Corrieu, G. 2005.** Bactéries lactiques et probiotiques. Edition Lavoisier, Paris. 307 pages.
- ❑ **Leyral, G., Vierling, E. 2001.** Microbiologie et toxicologie des aliments .3^{ème} édition Doin. France. P. 87-114.

M

- ❑ **Mahaut, M., Korolczuk, J., Pannetier, R., Maubois, J.L., 1986.** Eléments de fabrication de fromage de type pâte molle de lait de chèvre à caractère lactique par ultrafiltration de lait acidifié et coagulé. Techn. Lait Market, 1011, 24-28.
- ❑ **Makhloufi, K.M. 2011.** Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Thèse de Doctorat en Microbiologie, Biochimie. Université Pierre et Marie Curie-Paris 6. France. 200p.
- ❑ **Marchal, N., Bourdon, J.L., Richard, C.L. 1991.** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries .3^{ème} Ed. , Doin éditeurs, Paris.
- ❑ **Mekentichi, Z. 2003.** Qualité physicochimique et bactériologique d'un fromage traditionnel (Bouhezza).mémoired'ingénieur. Dept Agronomie. Université de Batna. Algérie.
- ❑ **Mennane, Z., Khedid, K., Zinedine, A., Lagzouli, M., Ouhssine, M., Elyachioui, M. 2007.** Microbial characteristics of Klila and Jben traditional Moroccan cheese from raw cow's milk. World Journal of Dairy & Food Sciences, 2,23–27.

N

- ❑ **Nouani, A., Dako, E., Morsli, A., Belhamiche, N., Belbraouet,S ., Bellal, M.M., et Dadie,A..2009.** Characterization of the purified coaguland extracts derived from artichoke flowers(*Cynara scolymus*) and from the fig tree latex (*Ficus carica*) in light of their use in themanufacture of traditional cheeses in Algeria. International Journal of Food Technology 7:20-2

O

- ❑ **Ouadghiri, M. 2009.** Biodiversité des bactéries lactiques dans le lait cru et ses dérivés « lben » et « jben » d'origine marocaine. thèse de doctorat. université Mohammed V – agdal faculté des sciences Rabat. 26-28.
- ❑ **Ogunbanwo, S.T., Sanni, A.I., Omilude, A.A.2003.** Characterization of lactobacilli in cheese. *Journal of dairy research*, 25, 431-438.
- ❑ **Owusu-Kwarteng, J., Akabanda, F., Nielsen, D.S., Tano-Debrah, K., Glover, R.L. et Jespersen, L. 2012.** Identification of lactic acid bacteria isolated during traditional fura processing in Ghana. *Food Microbiology*, 32, 72–78.

P

- ❑ **Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., Kotzekidou, P., 2003.** Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Sci.* 65,859–867.
- ❑ **Paul Ross, R., Morgan, S. and Hill, C. 2002.** Preservation and Fermentation: present and future. *Int. J. Food. Microbiol*, 79: 3 – 16.
- ❑ **Pilet, M-F., Magras, C., et Federighi, M. 1998.** Bactéries lactiques. PP 235-260. In *Manuel de Bactériologie Alimentaire*. Sutra, L., Federighi, M., Jouve, J-L. (1998). Ed Polytechnica .Paris. P308.
- ❑ **Poznanski, E., Cavazza, A., Cappa, F., Cocconcelli, P. S. 2004.** Indigenous raw milk microbiota influences the bacterial development in traditional cheese from an alpine natural park. *Int. J. Food Microbiol*, 92: 141–151.
- ❑ **Priyanka, S., Prakash, A. 2009.** Screening of Lactic Acid Bacteria for Antimicrobial Properties Against *Listeria monocytogenes* Isolated from Milk Products at Agra Region. *Internet Journal of Food Safety*, 11:81-87

R

- ❑ **Rodrigues et al. 2002. In Boudjani, W.2009.** Action de la flore lactique sur les bactéries contamination. Mémoire d'ingénieur, Institut de biologie, Université de Tlemcen. Pages 73.
- ❑ **Randazzo, C.L., Caggia, C., Neviani, C.L.E. 2009.** Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. *J. Microbiol. Methods*, 78: 1–9

- ❑ **Rosset, R. 2001.** Etude du cas particulier de *Listeria monocytogenes*, croissance microbienne et froid.

S

- ❑ **Salmeron, J., de Vega, C., Pérez-Elortondo, F.J., Albisu, M., Barron, L.J.R. 2002.** Effect of pasteurisation and seasonal variations in the microflora of ewe's milk for cheese making. *Food Microbiol*, **19**: 167-174.
- ❑ **Salminen, S., Ouwehand, A.C, Benno, Y, Lee Y.K .1999 .**Probiotics: How should they be defined? *Trends Food Sci. Technol.* **10**:107-110.
- ❑ **Samot, J., Badet, C. 2013.** Antibacterial activity of probiotic candidates for oral health. *Anaerobe* **19** : 34-38.
- ❑ **Savadogo, A. Ouattara¹, C.A.T. Savadogo, P.W. Ouattara¹, A.S. Barro, N.,Traore, A.S. 2004.** Microorganisms Involved in Fulani Traditional Fermented Milk in Burkina Faso. *Pakistan Journal of Nutrition* **3** (2): 134-139.
- ❑ **Siegmund, H., Rechinger, K.B., 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.
- ❑ **Singleton, P. 1999.** Bactériologie. 4^{ème} Edition. Dunod, Paris. 317 pages.

T

- ❑ **Tagg et al. 1976. In Boudjani, W. 2009.** Action de la flore lactique sur les bactéries contamination. Mémoire d'ingénieur, Institut de biologie, Université de Tlemcen. 73 pages.
- ❑ **Touati, 1990.** Contribution à l'étude microbiologique et physico-chimique d'un fromage artisanal algérien « la klila ». mémoire d'ingénieur, INATAA, Constantine, Algérie, 83p.

V

- ❑ **Vilain, A.C 2010.** Qu'est-ce que le lait ? , *Revue française d'allergologie*, **50** : 124–127.
- ❑ **Vimahieu. 2005.** Composition du lait .Edition Université libre de Bruxelles.

Annexes

Annexe I : Composition des Solutions de titrage

• **Solution de NaOH 0,1N :**

| | |
|--------------------|-----|
| Eau distillé | 1l |
| NaOH | 40g |

• **Solution de HCL 1N:**

| | |
|-------------------|-------|
| Eau distilé | 100ml |
| Hcl..... | 4ml |

Annexe II: Composition des milieux de cultures (g/l)

➤ **Milieux solides**

• **Gélose nutritive standard Plate Count Agar (P.C.A)**

| | |
|--|---------|
| Hydrolysate tryptique de caséine | 2,5g |
| Extrait de viande | 5g |
| Glucose | 1g |
| Extrait de la levure | 2,5g |
| Agar..... | 15g |
| Eau distillé q.s.p..... | 1000 ml |

pH=7±0.2 à 37°C

• **Milieu MRS (de Man Rogosa et Sharpe, 1960) :**

| | |
|---------------------------------------|--------|
| Extrait de levure..... | 5g |
| Extrait de viande | 5g |
| Peptone..... | 10 g |
| Acétate de sodium..... | 5g |
| Citrate de sodium | 2g |
| Glucose | 20g |
| KH ₂ PO ₄ | 2g |
| MgSO ₄ | 0.1 g |
| MnSO ₄ | 0.05 g |
| Agar..... | 12g |
| Tween80..... | 1 ml |

Eau distillée q.s.p1000 ml

pH=6.5±0.2 à 37°C

Autoclavage : 121°C /15min.

• **Milieu M17 :**

Extrait de levure2, 5g

Extrait de viande5g

Peptone de caséine2, 5g

Peptone de viande2, 5g

Peptone de soja5g

Peptone de soja5g

Acide ascorbique.....0, 5g

B-glycérophosphate de sodium.....19g

Agar.....12, 75g

Sulfate de magnésium0.25g

Eau distillée q.s.p1000 ml

pH=7.1±0.2 à 37°C

Autoclavage : 121°C pendant 15min.

• **Sabouraud :**

Peptone de gélatine..... 10g

Glucose20g

Agar..... 17g

Eau distillée..... 1000 ml

pH5.6

• **Mannitol-mobilité :**

Peptone tryptique de viande 20 g

Agar.....4 g

Mannitol2 g

KNO₃..... 1 g

Rouge de phénol à 1 %4 ml

Eau distillée q.s.p1000 ml

pH=7.6-7.8

• **Gélose- Glucose – Lactose – Saccharose – H₂S(Ou milieu TSI):**

| | |
|---------------------------------|---------|
| Extrait de viande de bœuf | 3 g |
| Extrait de levure | 3 g |
| Peptone | 20 g |
| Chlorure de sodium..... | 5 g |
| Citrate ferrique | 0,3 g |
| Thiosulfate de sodium..... | 0,3 g |
| Lactose | 10 g |
| Glucose | 1 g |
| Saccharose..... | 10 g |
| Rouge de phénol | 0,05 g |
| Agar..... | 12 g |
| Eau distillée q.s.p | 1000 ml |

pH=7,4

• **Citrate de Simmons :**

| | |
|------------------------------------|---------|
| Ammonium dihydrogenophosphate..... | 1g |
| Phosphate de dipotassique | 1g |
| Chlorure de sodium..... | 5g |
| Citrate de sodium..... | 2g |
| Sulfate magnésium..... | 0,2g |
| Bleu de bromothymol..... | 0,08g |
| Agar | 15g |
| Eau distillée | 1000 ml |

pH 6,8

• **MRS Semi-solide :**

| | |
|---------------------------------------|--------|
| Peptone | 10,0 g |
| Extrait de viande | 8,0 g |
| Extrait de levure | 4,0 g |
| Glucose | 20,0 g |
| Acétate de sodium tri hydraté | 5,0 g |
| Citrate d'ammonium | 2,0 g |
| Tween 80 | 1,0 ml |
| Hydrogénophosphate de potassium | 2,0 g |

Sulfate de magnésium heptahydraté0,2 g
Sulfate de manganèse tétra hydraté0,05 g
Agar7,0 g
pH = 6,2

• **Mueller Hinton :**

Infusion de viande de boeuf2 g
Amidon..... 15 g
Hydrolysate de caséine17g
Agar17 g
Eau distillée..... 1000 mL
pH =7,3

➤ **Milieux liquides**

• **Eau physiologie :**

NaCl9g
Eau distillée1000 ml

• **Eau physiologique peptonée :**

Peptone.....1g
Chlorure de sodium.....8,5g
Eau distillée1000 ml

• **Bouillon MRS:**

Peptone10g
Extrait de viande8g
Extrait de levure4g
Glucose20g
Acétate de sodium trihydraté5,0 g
Citrate d'ammonium2,0 g
Tween 801,0 ml
Hydrogénophosphate de potassium2,0 g
Sulfate de magnésium heptahydraté0,2 g
Sulfate de manganèse tétrahydraté0,05 g
pH = 6.2

• **Bouillon BHIB :**

| | |
|---------------------------------|-------|
| Brain infusion solids | 12,5g |
| Beef heart infusion solids..... | 5,0g |
| Proteose peptone | 10,0 |
| Glucose | 2,0g |
| Sodium chloride..... | 5,0g |
| Disodium phosphate..... | 2,5g |
| pH 7.4 ± 0.2 | |

• **Bouillon Sabouraud :**

| | |
|---------------------------|--------|
| Peptone de gélatine | 10g |
| Glucose..... | 20g |
| Eau distillée..... | 1000mL |
| pH 5,6 | |

• **Clark et Lubs :**

| | |
|---|---------|
| Peptone tryptique ou poly peptone | 5 – 7 g |
| Glucose | 5 g |
| Phosphate dipotassique | 5 g |
| Eau distillée q.s.p | 1000 ml |
| pH =7 | |

• **Urée –Indole :**

| | |
|---------------------------------------|---------|
| L-tryptophane..... | 3 g |
| KH ₂ PO ₄ | 1 g |
| K ₂ PO ₄ | 1 g |
| NaCl | 5 g |
| Urée | 20 g |
| Alcool à 95° | 10 ml |
| Rouge de phénol à 1% | 2,5 ml |
| Eau distillée q.s.p | 1000 ml |

Annexe III : la composition des colorants utilisés

• **Violet de gentiane au cristal :**

Violet de gentiane 10g (ou 5g)

Phénol20g

Ethanol à 0.95 100 cm³

Eau distillée..... 1 dm³

Les 3 premiers composants sont dans un premier temps dissous ensemble d'eau est ajoutée ensuite.

• **Lugol :**

Iode5g

IO dure de potassium10g

Eau distillée qsp1g

Flacon brun

• **Fuchsine de Ziehl :**

Fuchsine bosique.....10g

Phénol50g

Ethanol à 0.5 10cm³

Eau distillée 1dm³

Annexe IV : Tableaux des résultats

Tableau N° 15 : Zones d'inhibition des bactéries lactiques vis-à-vis des microorganismes pathogènes (en mm).

| Souches | <i>Micrococcus luteus</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Listeria monocytogenes</i> | <i>Bacillus cereus</i> | <i>Escherichia coli</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>Candida albicans</i> |
|--------------------|---------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------|
| S1 | 22 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 12 | 0 |
| S2 | 0 | 0 | 10 | 0 | 11 | 0 | 0 | 0 |
| S3 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 | 24 | 0 |
| S4 | 0 | 12 | 17 | 20 | 18 | 0 | 20 | 0 |
| S5 | 20 | 0 | 0 | 30 | 14 | 0 | 29 | 0 |
| S6 | 0 | 0 | 15 | 0 | 13 | 0 | 0 | 0 |
| S7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S8 | 0 | 0 | 0 | 22 | 20 | 0 | 14 | 0 |
| S9 | 20 | 20 | 0 | 24 | 15 | 0 | 0 | 0 |
| S10 | 0 | 13 | 10 | 11 | 10 | 0 | 12 | 0 |
| S11 | 15 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S12 | 0 | 0 | 22 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S13 | 0 | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S14 | 10 | 0 | 24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S15 | 0 | 0 | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S16 | 0 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ampicilline | 39 | 0 | 35 | 0 | 19 | 0 | 0 | Nystatine = 25.66 |

Tableau N° 16 : Dénombrement de la flore mésophile totale sur le milieu P.C.A.

| Échantillon | Éch1 | Éch2 | Éch3 |
|-----------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| Charge x 10 ⁶ UFC/g | 0,92 | 4,37 | 2,33 |

Tableau N° 17 : Dénombrement des bactéries lactiques à 30°C (x10⁶ UFC/g).

| Échantillon | MRS 6.2 | MRS 5.6 | M17 |
|--------------------|----------------|----------------|------------|
| Éch1 | 14,7 | 32,7 | 156 |
| Éch2 | 213 | 186 | 198 |
| Éch3 | 0 | 198 | 136 |

Tableau N° 18 : Dénombrement des bactéries lactique à 45°C (x 10⁶ UFC/g).

| Échantillon | MRS 6,2 | MRS 5,6 | M17 |
|--------------------|----------------|----------------|------------|
| Éch1 | 0,52 | 1,08 | 8 |
| Éch2 | 0,083 | 0,056 | 0,38 |
| Éch3 | 0 | 19,7 | 0 |

ملخص

تستخدم بكتيريا حمض اللاكتيك في التخمير وحفظ الأغذية العضوية مع إنتاج أحماض عضوية ومواد مضادة للبكتيريا أخرى مثل bacteriocine من خلال منع بعض السلالات المسببة للأمراض. من أجل إظهار التأثير الكابح لهذه البكتيريا، درسنا قوة معادية من 16 سلالات معزولة من منتجات الألبان الجزائرية التقليدية "الجبن" وجها لوجه لثمانية سلالات مسببة للأمراض:

(*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus lutus*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*).

تم إحصاء و عد كل الميكروبات الموجودة في منتجات الألبان التقليدية في الأوساط التالية : PCA ، MRS (5.6, 6.2) ، M17 ، حيث كانت مرتفعة جدا في العينات الثلاثة و وصلت إلى: $(4,37 \times 10^6 \text{ UFC/g})$ في درجة حرارة 30°C أحصينا : $(213 \times 10^6 \text{ CFU / g})$ وفي 45°C وصل العدد إلى $(19,7 \times 10^6 \text{ CFU / g})$. وقد أدت تفاعلاتها إلى ظهور منطقة تثبيط كبيرة بقطر تتراوح ما بين 10-30 ملم . أظهرت النتائج أن هذه العوامل احتمال أن تكون bacteriocine. هناك حاجة لإجراء مزيد من الفحوصات لتحديد الطبيعة الدقيقة للمثبطات. منتجات الألبان التقليدية هي مصدر للسلالات الجديدة المضادة للميكروبات. **الكلمات المفتاحية :** الجبن، البكتيريا اللبنية ، البكتيريا الممرضة ، التضاد.

Résumé

Les bactéries lactiques sont utilisées dans la fermentation et la bioconservation des aliments grâce à la production des acides organiques et d'autres substances antibactériennes telles que les bactériocines en inhibant certaines souches pathogènes.

Dans le but de mettre en évidence l'effet inhibiteur de ces bactéries, nous avons étudié le pouvoir antagoniste de 16 souches isolées d'un produit laitier Algérien traditionnel le "Jben" qui est un fromage frais vis-à-vis de sept souches pathogènes (*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus lutus*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et la levure *Candida albicans*).

Des dénombrements de la flore mésophile totale et de la flore lactique de ce produit laitier traditionnel ont été effectués sur les milieux PCA, MRS, M17 où la charge de la flore mésophile totale est très élevée dans les trois échantillons atteint jusqu'à $(4,37 \times 10^6 \text{ UFC/g})$, et celle de bactéries lactiques est remarquable dans l'échantillon 2 et 3 qui atteint à 30°C une charge de $(213 \times 10^6 \text{ UFC/g})$ et à 45°C $(19,7 \times 10^6 \text{ UFC/g})$.

Leurs interactions à conduit à l'apparition de zones d'inhibition importantes d'un diamètre qui vari entre 10 à 30 mm.

Les résultats obtenus ont montré que ces agents sont probablement des Bactériocines. Des tests supplémentaires ont été nécessaires pour connaître la nature exacte des agents inhibiteurs.

Les produits laitiers traditionnels constituent une source de nouvelles souches antimicrobiennes.

Mots clés : Jben, Bactéries lactiques, Bactéries pathogènes, Antagonisme.

Abstract

Lactic acid bacteria are used in the fermentation and organic food preservation with the production of organic acids and other antibacterial substances such as bacteriocins by blocking some pathogenic strains.

In order to demonstrate the inhibitory effect of these bacteria, we studied the antagonistic power of 16 strains isolated from a traditional Algerian dairy product "Jben" overlooked seven pathogenic strains (*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus lutus*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and the yeast *Candida albicans*).

Counts of the total mesophilic lactic flora and fauna of traditional dairy products were performed on the PCA media, MRS, M17 were the burden of total mesophilic flora is very high in the three samples reached up $(4,37 \times 10^6 \text{ CFU / g})$, and the lactic acid bacteria is remarkable in sample 2 and 3. At 30°C the charge is of $(213 \times 10^6 \text{ CFU / g})$ and in 45°C $(19,7 \times 10^6 \text{ CFU / g})$.

Their interactions has led to the appearance of significant inhibition zone with a diameter which varied between 10 to 30 mm. . The results showed that these agents are likely bacteriocins. Additional tests were needed to determine the exact nature of the inhibitors.

The traditional dairy products are a source of new antimicrobial strains.

Key words : Jben , Lactic acid bacteria , pathogenic bacteria , Antagonism