



UNIVERSITÉ
Abdelhamid Ibn Badis
MOSTAGANEM

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem

Faculté Des Sciences de La Nature et de La Vie

Département de Biologie

Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCE BIOLOGIQUE

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Par

MOSTEFAOUI ZOULIKHA

&

BRAHIMI LYDIA

Thème :

Etude de quelques caractères probiotiques de ferments lactiques

Soutenue le 19/06/ 2023 devant le jury composé de :

Président	CHERIGUEN ABDERAHIM	Pr	Université de Mostaganem
Encadreur	BAHLOUL HALIMA AURASS	MCB	Université de Mostaganem
Examinateur	WARDA SIDHOM	MCA	Université de Mostaganem
Co- encadreur	ZERIOUH ILHEM FATIMA	MCB	Université de Mostaganem

Année Universitaire : 2022/2023



UNIVERSITÉ
Abdelhamid Ibn Badis
MOSTAGANEM



Dédicace

Je dédie ce travail à :

Mes parents, Je vous serai éternellement reconnaissante pour votre soutien, votre confiance et votre fierté.

Mon père, Tu es un pilier solide et incontournable pour ma personne et mon parcours, que Dieu te protège et te donne santé et longue vie.

Ma mère, qui m'a toujours donné plus qu'il ne le faudrait, amour, tendresse et sa constante présence à mes côtés dans les moments difficiles. Rien n'exprimera ma gratitude, je prie Dieu de prendre soin de toi et te bénir et de te laisser toujours à mes cotés

À mes très chers grands-pères qui auraient été fiers de ma réussite. Allah yerhamhoum Inchaâ'Allah

À ma grand-mère AYI, je suis tellement chanceuse de t'avoir dans ma vie, je voulais te dire à quel point tu es importante pour moi. Je t'aime plus que tout au monde.

À mes chers frères Ahmed et Mohamed et ma chère sœur Nesrine.

À mon mari Fazil, qui n'a pas cessé de me conseiller, encourager et soutenir du début jusqu'à la fin dans mon travail.

À mon binôme Zoulikha.

À l'accompagnante de mon chemin ma copine Khouloud et sa famille.

À mes très chères tantes et oncles.

À mes cousines Omnia, Nassima, Hadjer, Nihel et mes cousins Reda, Anis.

À toute ma famille parentale Brahimi et maternelle Oumouchi, chacun par son nom.

À qui m'ont accompagnaient durant mon chemin d'études Fatima et Radia.

À mes camarades de promotion Master Microbiologie appliquée 2023.

À tous les enseignants qui ont contribué à ma formation durant mon cursus.

À tous ceux que j'aime et ceux qui m'aiment

Merci !

Lydia



Dédicace

Je dédie ce travail :

A celle qui attend mon retour chaque jour

Je dédie ce travail, en signe de respect et de reconnaissance, à mes parents qui m'ont toujours poussé et motivé dans mes études et pour leur sacrifice, leurs soutien moral, financier et affectif tout au long de mon parcours scolaire

À mes chers frères

À mes grands-mères, que Dieu leur donne une longue et joyeuse vie

À mon binôme Lydia pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension

A ma famille, mes proches et aux personnes qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes côtés, et qui m'ont accompagné durant mon chemin d'études

Je remercie également mes amis et camarades : Gogo, Fatima, Sara et Radia qui ont jamais cessés de me soutenir

À toutes les personnes qui de près ou de loin ont participé à la réalisation de ce modeste travail.

À mes enseignants et mes amis de promotion Master Microbiologie appliquée 2023

À tous ceux que j'ai connus durant mon cycle d'étude

A tous ceux qui ont eu et ont confiance en moi.

Zoulikha

Remerciement

Notre mémoire représente trois mois de travaille durant lesquels l'appui et l'aide de plusieurs personnes ont facilité notre tache

J'adresse en premier lieu ma reconnaissance à notre DIEU tout puissant, de m'avoir permis d'en arriver là, car sans lui rien n'est possible.

*Tout d'abord on tient particulièrement à remercier notre promotrice **Mme BAHLOUL HALIMA.**, qui nous a fait l'honneur de nous encadrer et de nous orienter durant toute la période de réalisation de ce travail avec ses judicieux conseils et sa constante disponibilité. Merci de votre patience Madame!*

*Notre reconnaissance et nos remerciements s'adressent aussi à Monsieur **CHERIGUEN Abderahim** en étant président de jury ainsi que les membres du jury qui ont accepté d'évaluer notre mémoire, madame **SIDHOUM WARDA** et madame **Zeriouh Ilhem Fatima***

*L'ensemble des enseignants de l'université **Abdelhamid Iben Badis de Mostaganem** qui ont contribué à ma formation durant les 5 années particulièrement ceux de l'option biologie.*

Nous tenons à adresser, notre respect et nos vifs remerciements à toutes les personnes ayant apporté leur contribution, de près ou de loin à notre travail de recherche.

*Enfin, on ne saurait oublier d'exprimer toute notre sympathie à l'ensemble du personnel de laboratoire de Microbiologie surtout **Mme Hafida** et **Mr Djilali**.*

Lydia, Zoulikha

Liste des abréviations

GRAS: Generally Recognized As Safe

ADH: Arginine dihydrolase

OMS: l'Organisation Mondiale de la Santé.

FAO: L'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture.

CO₂: Dioxyde de Carbone

H₂O₂:Eau oxygénée

NaOH : Hydroxyde de sodium

MRS: Man-Rogosa et Sharp

MH : Gélose de Mueller-Hinton

GN : Gélose nutritive

BCP : La gélose bromocrésol pourpre

NaCl : Chlorure de sodium

Sp: Espèces

Ssp : Sous espèces

T°: Température

U.F.C:Unité formant colonie

pH: Potentiel d'hydrogène

VP: Voges proskauer

RM : méthyle rouge

G+ C: Guanine+ Cytosine

µL : Microlitre

Lb: *Lactobacillus*

Lc : *Lactococcus*

E.coli: *Escherichia coli*

MRS: Man, Rogosa, Sharpe

Liste des tableaux

Tableau 01 : Critères de sélection des probiotiques (Nousiainen <i>et al.</i>, 2004) ..	08
Tableau 02 :Micro-organismes considérés comme probiotiques (Hozalpfel <i>et al.</i>, 1998).....	09
Tableau 03 : Les principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques (Salminen <i>et al.</i>, 2004 ; Patterson, 2008).....	12
Tableau 04 : Caractéristique physiques et chimiques du Lben (Bendimerad, 2013) ..	23
Tableau 05 : Caractéristiques physique et chimiques du Zebda (Benkerroum <i>et al.</i>, 2004).....	24
Tableau 06 : Caractéristiques physiques et chimiques du fromage frais (Eck et Gillis, 2006) ..	25
Tableau 07 : Les caractéristiques d'échantillons ..	38
Tableau 08 : Différent aspects macroscopiques et microscopiques.....	40
Tableau 09 : Résultats des tests biochimiques et physiologiques.....	40
Tableau 10 : Résultat de la galerie Api 20 Strep (La souche L32) ..	43
Tableau 11 : Résultat de la galerie Api 20 Strep (La souche Z30) ..	43
Tableau 12 : Résultat de la galerie Api 20 A (La souche F22).....	43
Tableau 13 : Résultats de quelques effets probiotiques ..	44
Tableau 14 : Zone d'inhibition des souches à effet antagoniste.....	45
Tableau 15 : Zone d'inhibition des souches sécrétant une substance antibactérienne en mm (méthode indirecte).....	46

Liste des figures

Figure 01 : Composition du microbiote intestinal : les Firmicutes, les Bacteroidetes, les Actinobacteria et les Proteobacteria sont les quatre Phyla « standard » de notre microbiote intestinal. Chaque phylum comprend des bactéries aux structures, métabolismes et fonctions divers. (Léon Aguilera <i>et al.</i> , 2022).....	03
Figure 02 : Schéma simplifié décrivant les compartiments de l'appareil digestif de l'homme et leurs microflores. (Ouwehand& Vesterlund 2003).....	04
Figure 03 : fonctions du microbiote intestinal (Medjad, 2021)	05
Figure 04 : Le microbiote intestinal de l'individu sain (à gauche), le microbiote intestinal du patient atteint d'une dysbiose intestinale (à droite) et les effets pré, pro et symbiotiques (Khan <i>et al.</i> , 2019)	06
Figure05 :(A) : Bifidobacterium spp., (B) : Escherichia coli Nissle 1917 7 (Krammer <i>et al.</i> ,2006)	08
Figure 06 : Mécanismes d'action des probiotiques (Kim <i>et al.</i> , 2016).....	11
Figure 07 : Schéma montrant l'arbre phylogénique des bactéries lactiques y compris des genres apparentés (Axelsson, 2004).....	17
Figure 08 : <i>Lactobacillus bulgaricus</i> au microscope électronique. (Menad, 2018)	18
Figure 09 : <i>Bifidobacterium</i> sp. (Aibeche <i>et al.</i> , 2020)	21
Figure 10 : Morphologie en microscopie électronique de <i>Pediococcus sp</i> (Sylviane Lemarinier).....	21
Figure 11 : Schéma de fabrication des produits laitiers traditionnels (Zebda et Lben)	26
Figure 12 : schéma utilisé pour l'isolement et identification des bactéries lactiques	29
Figure 13 : Plaque d'Elisa 96 puits pour la fermentation	33
Figure 14 : méthode indirecte (méthode de Barefoot et Kaenhammer, 1983)	37
Figure 15 : Aspect macroscopique des isolats sur milieu MRS et M17 solide	39
Figure 16 : Aspect microscopique des isolats après coloration de gram (×100)	39
Figure 17 : Croissance à température 30°C	42

Figure 18 : Croissance à différentes concentrations NaCl 4% et 6.5 %	42
Figure 19 : Croissance en milieu lait de Sherman 1%	42
Figure 20 : Croissance en milieu lait de Sherman 3%	42
Figure 21 : Résultat d'hydrolyse d'arginine	42
Figure 22 : Croissance sur la bile 2%	42
Figure 23 : Type de fermentation.....	42
Figure 24 : Résultat de Fermentation des sucres.....	42
Figure 25 : Résultats de la galerie Api	43
Figure 26 : Schéma de différenciation entre les bactéries lactiques (Carr <i>et al.</i>, 2002)	44
Figure 27 : Zone inhibition des souches pathogènes par les souches lactiques (méthode directe).....	45
Figure 28 : Zone inhibition des souches pathogènes par les souches lactiques (méthode directe).....	46

Table des matières

Résumé	
Abstract	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	01
I. Partie bibliographique	
Chapitre 01 : La flore intestinale	
1.1. Définition	02
1.2. La composition du microbiote intestinal humain	02
1.3. Répartition topographique des espèces intestinales	03
1.3.1. Au niveau de la bouche et l'œsophage	03
1.3.2. Au niveau de l'estomac	03
1.3.3. Au niveau du l'intestin grêle	04
1.3.4. Au niveau du colon	04
1.4. Les facteurs influençant sur la flore	05
1.5. La fonction du microbiote intestinal.....	05
1.6. Dysbiose intestinale	06
Chapitre 02 : Les probiotiques	
2.1. Historique et définition	07
2.2. Critère de sélection des souches probiotiques.....	07
2.3. Les microorganismes utilisées comme des probiotiques	08
2.3.1. Les bactéries lactiques	08
2.3.2. Les bactéries non lactiques.....	08
2.3.3. Les levures	09
2.4. Mécanismes d'action des probiotiques	10
2.4.1. Inhibition de la croissance des microorganismes pathogènes	10

2.4.2. Amélioration de la fonction barrière.....	10
2.4.3. Modulation du système immunitaire	10
2.5. Les principaux effets bénéfiques des probiotiques	11
2.6. Les probiotiques et les prébiotiques	13
2.7. Application des probiotiques.....	13

Chapitre 03 : Les bactéries lactiques

3.1. Historique.....	15
3.2. Définition	15
3.3. Habitat.....	16
3.4. Taxonomie et classification.....	16
3.5. Des principaux genres des bactéries lactiques	17
3.5.1. Le genre <i>Lactobacillus</i>	17
3.5.2. Le genre <i>Streptococcus</i>	18
3.5.3. Le genre <i>Lactococcus</i>	18
3.5.4. Les genres <i>Leuconostoc</i> et <i>Weissella</i>	19
3.5.5. Les genres <i>Enterococcus</i> et <i>Vagococcus</i>	19
3.5.6. Le genre <i>Bifidobacterium</i>	20
3.5.7. Le genre <i>Pediococcus</i>	20
3.6. Intérêt des bactéries lactiques	21
3.6.1. Dans le domaine alimentaire	21
3.6.2. Dans le domaine de la santé	22

Chapitre 04 : Les produits laitiers traditionnels

4.1. Lben	23
4.1.1. Définition	23
4.1.2. Mode de fabrication	23
4.1.3. Caractéristiques physiques et chimiques	23
4.1.4. La microflore du Lben	24
4.2. Zebda	24
4.2.1. Définition	24

4.2.2. Mode de fabrication	24
4.2.3. Caractéristiques physiques et chimiques	24
4.2.4. La microflore du Zebda.....	25
4.3. Fromage frais	25
4.3.1. Définition	25
4.3.2. Mode de fabrication	25
4.3.3. Caractéristiques physiques et chimiques	25
4.3.4. La microflore du Fromage frais	26
II. Partie expérimentale : Matériel et méthodes	
1. Objectif de l'étude	27
2. Lieu et durée du travail	27
3. Les échantillons.....	27
4. Les milieux de culture utilisés	27
5. Isolement des souches lactiques	27
5.1. La préparation de la suspension mère et les dilutions décimales	27
5.2. Isolement et purification	28
6. Conservation des souches	28
6.1. A courte terme	28
6.2. A long terme.....	28
7. Identification des isolats sélectionnés.....	30
7.1. Pré-identification (test morphologiques)	30
7.1.1. Observation macroscopique	30
7.1.2. Observation microscopique (coloration de Gram)	30
7.2. Identification partielle (test biochimiques, physiologique).....	31
7.2.1. Test physiologique :	31
7.2.1.1. Test de croissance à différentes températures.....	31
7.2.1.2. Test de croissance à différents concentration de NaCl	31
7.2.1.3. Test de Thermorésistante.....	31
7.2.2. Test biochimiques :	31

7.2.2.1. Test d'amylose	31
7.2.2.2. Test de croissance sur le lait bleu de sherman	32
7.2.2.3. Test de production d'acétoïne (VP/RM)	32
7.2.2.4. Test d'hydrolyse d'arginine (ADH)	32
7.2.2.5. Test de production de CO ₂ à partir du glucose	32
7.2.2.6. Test de croissance sur bile 2 %	32
7.2.2.7. Test de fermentation des sucres	33
8. Identification des souches sélectionnées par la galerie API	34
8.1. Préparation de la galerie.....	34
8.2. Préparation de l'inoculum.....	34
8.3. Inoculation de la galerie	34
8.4. Lecture des résultats	35
8.5. Interprétation	35
9. Etude de quelques effets probiotiques	35
9.1. Test de croissance à différentes pH	35
9.2. Test de croissance à concentration de bile	35
9.3. Etude de l'activité antimicrobienne	36
III. Résultats et Discussions	
Résultats.....	38
1. Echantillonnages.....	38
2. Isolement et purification.....	38
3. Identification des isolats sélectionnés.....	38
3.1. Pré-identification (test morphologiques)	38
3.1.1. Observation macroscopique.....	38
3.1.2. Observation microscopique (coloration de Gram).....	39
3.2. Identification biochimique et physiologique.....	40
4. Identification des souches sélectionnées par galeries API.....	43
5. Répartition et l'identification des souches	44
6. Etude de quelques effets probiotiques	44

6.1. Etude de quelques effets probiotiques	44
6.2. Etude de l'activité antimicrobienne des souches isolées	45
Discussions	46
Conclusion	51
Perspectives	52
Références bibliographiques	53
Annexes	

Résumé

Les ferments lactiques, également connus sous le nom de bactéries lactiques, sont des micro-organismes bénéfiques présents dans de nombreux aliments fermentés comme les produits laitiers traditionnels tels que Zebda, Lben et le fromage frais, Certains de ses souches sont bénéfiques pour la santé et sont appelées probiotiques.

Les probiotiques confèrent des avantages pour la santé de l'hôte lorsqu'ils sont consommés en quantités adéquates. Les recherches ont démontré que les probiotiques peuvent avoir divers effets bénéfiques, notamment la régulation de l'équilibre de la flore intestinale et le renforcement du système immunitaire.

L'objectif de notre travail était l'isolement et l'identification des souches lactiques à partir des produits laitiers traditionnels. Après leur isolement, des tests de caractérisations phénotypiques qui ont été réalisé, des différents tests biochimiques et physiologique ont été accompli pour l'identification des isolats suivi par des tests établi afin d'étudier quelques effets probiotiques de nos isolats.

Au total 5 souches de bactéries lactiques ont été isolé et identifier. Les résultats montrent la présence de différents genres : *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*.

Les 5 isolats ont résisté aux conditions de la flore intestinale et possèdent un bon pouvoir inhibiteur vis-à-vis de quelques espèces de bactéries pathogènes responsables de différentes maladies chez l'homme.

Mots clés : produits laitiers traditionnels, les bactéries lactiques, les probiotiques

Abstarct

Lactic ferments, also known as lactic bacteria, are beneficial microorganisms present in many fermented foods like traditional dairy products such as Zebda, Lben and fresh cheese. Some strains of lactic bacteria beneficial to health are called probiotics.

Probiotics confer health benefits when consumed in adequate amounts. Research has shown that probiotics can have a variety of beneficial effects, including regulating the balance of gut flora and boosting the immune system.

The objective of our work was the isolation and identification of lactic strains from traditional dairy products. After their isolation, phenotypic characterization tests were carried out for purification. Then, the different biochemical and physiological tests that should be performed for the identification of isolates. In the end, tests were established to study some probiotic effects.

A total of 5 strains of lactic bacteria were isolated and identified. The results show the presence of different genera: *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*.

The 5 isolates resisted the conditions of the intestinal flora and have a good inhibitory power against some species of pathogenic bacteria responsible for various diseases in humans.

Keywords: traditional dairy products, lactic acid bacteria, probiotics

ملخص

تعتبر الخميرة اللبنية ، والمعروفة أيضًا باسم بكتيريا حمض اللاكتيك ، كائنات دقيقة مفيدة موجودة في العديد من الأطعمة المخمرة مثل منتجات الألبان التقليدية مثل الزبدة والجبن الطازج. تسمى سلالات معينة من بكتيريا حمض اللاكتيك المفيدة للصحة البروبيوتيك.

تمنح البروبيوتيك فوائد صحية عند استهلاكها بكميات كافية. أظهرت الأبحاث أن البروبيوتيك يمكن أن يكون لها مجموعة متنوعة من الآثار المفيدة ، بما في ذلك تنظيم توازن فلورا الأمعاء وتقوية جهاز المناعة.

كان الهدف من عملنا هو عزل وتحديد سلالات اللاكتيك من منتجات الألبان التقليدية. بعد عزلهم ، تم إجراء اختبارات التوصيف المظهرى للتنقية. ثم يتم إجراء الاختبارات البيوكيميائية والفسولوجية المختلفة التي يجب إجراؤها لتحديد العزلات. في النهاية ، تم إجراء اختبارات لدراسة بعض تأثيرات الكائنات الحية المجهرية.

تم عزل وتحديد 5 سلالات من بكتيريا حمض اللاكتيك. أظهرت النتائج وجود أجناس مختلفة:

Bifidobacterium و *Lactobacillus* و *Lactococcus* و *Leuconostoc*

قاومت العزلات الخمسة ظروف الجراثيم المعوية ولها قدرة مثبطة جيدة ضد بعض أنواع البكتيريا المسببة للأمراض المسؤولة عن الأمراض المختلفة لدى الإنسان.

الكلمات المفتاحية: منتجات الألبان التقليدية ، بكتيريا حمض اللاكتيك ، البروبيوتيك

Introduction

Introduction

Introduction

La flore intestinale, également connue sous le nom de microbiote intestinal, est un écosystème complexe composé de milliards de micro-organismes qui résident dans notre tube digestif. Ces micro-organismes, tels que les bactéries, les levures et les virus. Parmi ces micro-organismes on a les probiotiques.

Les probiotiques sont des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantités suffisantes, ont un effet positif sur l'hôte (**Mahrous, 2011**), ces micro-organismes peuvent également influencer la diversité et la composition du microbiote intestinal. Ils peuvent augmenter la présence de certaines espèces bénéfiques et réduire la prévalence de micro-organismes potentiellement pathogènes.

La majorité des bactéries probiotiques aujourd'hui sur le marché international, sont majoritairement des bactéries lactiques (**Heymanetal., 2006**), Elles jouent un rôle bénéfique dans l'environnement intestinal de l'hôte en produisant des substances antibactériennes telles que l'acide lactique, l'acide acétique, le peroxyde d'hydrogène et la bactériocine, qui inhibent la croissance des bactéries concurrentes (**Ouwehand et Vesterlund, 2004**).

Pour prouver l'efficacité d'une souche ou d'un produit probiotique, des tests doivent être effectués en utilisant des systèmes de plus en plus complexes, allant des études *in vitro* aux études *in vivo* sur les animaux et sur l'homme (**Bouguerra, 2021**).

L'objectif de ce modeste travail consiste à isoler, purifier et identifier les ferments lactiques à partir des produits laitiers traditionnels et d'étudier leurs caractères probiotiques.

Partie Théorique

Chapitre 01:

La flore intestinale

1.1. Définition

La flore ou microbiote est un ensemble de micro-organismes dits commensaux non pathogènes, qui résident dans un environnement spécifique appelé microbiome, chez un hôte qui peut être animal ou végétal ou une matière pouvant être elle-même d'origine animale ou végétale. Les microbiotes font partie intégrante de notre corps, se retrouvant notamment au niveau de la peau, de la bouche et du vagin. Cependant, le microbiote intestinal est considéré comme le plus crucial parmi eux (**Burcelin et al., 2016**).

Il est considéré comme un organe à part entière, et s'associe aux autres organes humains pour former un hétéro-organisme ou un super-organisme complexe (**Gill et al., 2006**).

Le microbiote intestinal, également appelé flore intestinale, se définit comme un ensemble complexe de micro-organismes, vivant à l'intérieur du tractus digestif humain et exactement au niveau de l'intestin. Cette communauté microbienne, non pathogène pour l'homme, recouvre la surface de la muqueuse intestinale (**Corblin, 2020**).

Le microbiote intestinal (ou microflore intestinale) abrite environ 10^{14} micro-organismes en symbiose avec l'hôte. Les nouvelles techniques d'analyses moléculaires ont montré que chaque individu est caractérisé par un microbiote qui lui est propre et dont la composition est stable au cours du temps (**Dolié, 2018**).

1.2. La composition du microbiote intestinal humain

Le tube digestif d'un nouveau-né est exempt de micro-organismes. Au fil du temps, l'écosystème microbien s'installe progressivement, et il lui faut plusieurs années pour atteindre sa pleine maturité. Ce développement se fait suite aux contacts du nouveau-né, puis de l'enfant, avec les différents environnements qui vont l'entourer (**Coppé, 2018**).

La composition du microbiote intestinal résulte d'une co-évolution des microorganismes et de l'hôte ayant favorisé le maintien de relations de mutualisme entre les organismes. A part quelques espèces de champignons, archées et virus, le microbiote intestinal est composé essentiellement de bactéries. L'ensemble de ces

Chapitre 01 : La flore intestinale

bactéries ne peuvent survivre en présence d'oxygène donc ce sont des bactéries majoritairement anaérobies strictes (Jaglin, 2013).

Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria et Verrucomicrobia sont les principaux micro-organismes du microbiote intestinal, avec une nette prédominance de Firmicutes et Bacteroidetes représentant 90% du microbiote intestinal humain (Léon Aguilera *et al.*, 2022).

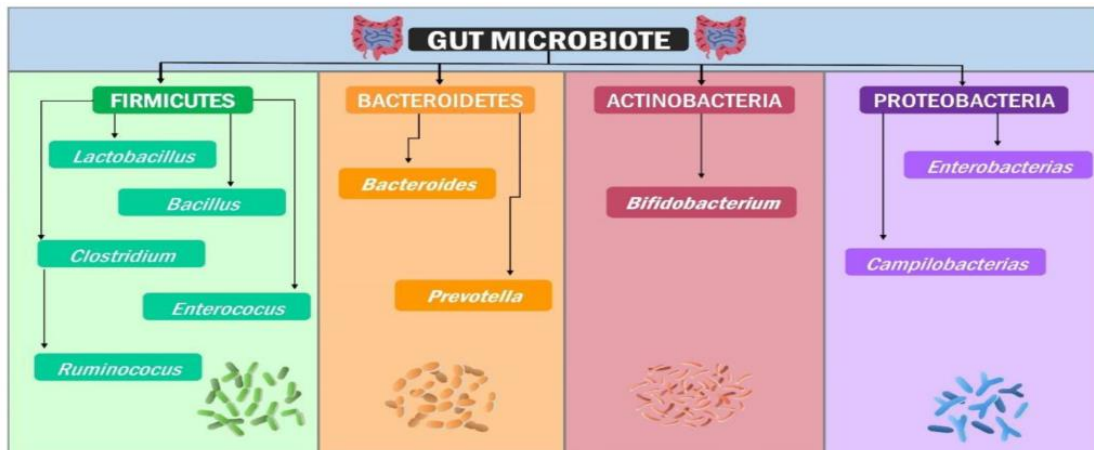


Figure 01 : Composition du microbiote intestinal : les Firmicutes, les Bacteroidetes, les Actinobacteria et les Proteobacteria sont les quatre Phyla « standard » de notre microbiote intestinal. Chaque phylum comprend des bactéries aux structures, métabolismes et fonctions divers. (Léon Aguilera *et al.*, 2022)

1.3. Répartition topographique des espèces intestinales

1.3.1. Au niveau de la bouche et l'œsophage on retrouve de nombreux germes et en grande quantité. On considère cette flore comme transitoire issue des aliments ingérés même si dans sa partie distale, l'œsophage dispose d'une flore résidente c'est-à-dire qui est toujours la même (Bellon, 2011).

1.3.2. Au niveau de l'estomac présente une quantité bactérienne de 10 cellules par gramme de contenu liminal. Le pH de l'estomac, acide chez l'Homme (entre 2,5 et 3,5), a un effet délétère pour la majorité des bactéries ingérées au cours des repas. Seuls les micro-organismes à Gram positif aérobie ou anaérobies facultatifs acido-tolérants sont capables de survivre et sont composés de lactobacilles, de

Chapitre 01 : La flore intestinale

streptocoques ainsi que d'espèces de levures. Cependant, des bactéries anaérobies strictes résistantes à l'acidité gastrique peuvent s'y implanter, comme le pathogène *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), capable de se loger dans la couche de mucus (**Da Silva, 2013**).

1.3.3. Au niveau de l'intestin grêle : on observe une variation quantitative (duodénum $10^3 - 10^4$ UFC/g, jéjunum $10^4 - 10^6$ UFC/g, iléon $10^6 - 10^8$ UFC/g) et qualitative : diminution progressive des bactéries aérobies au profit des bactéries anaérobies strictes notamment les bifidobactéries, les bactéroïdes et les clostridies. Il y a peu de bactéries dans l'intestin grêle où elles ne jouent pratiquement aucun rôle (**Metlef et al., 2008**).

1.3.4. Au niveau du colon : La microflore du colon est très complexe et dominée par les bactéries anaérobies strictes (*Bacteroides spp.*, *Clostridium spp.*, *Bifidobacterium spp.*). Tandis que les bactéries anaérobies sont moins nombreuses et représentées par les lactobacilles, les entérocoques, les streptocoques et les entérobactéries. Les levures (ex. *Candida albicans*) sont faiblement représentées (**Isolauro et al., 2004**).

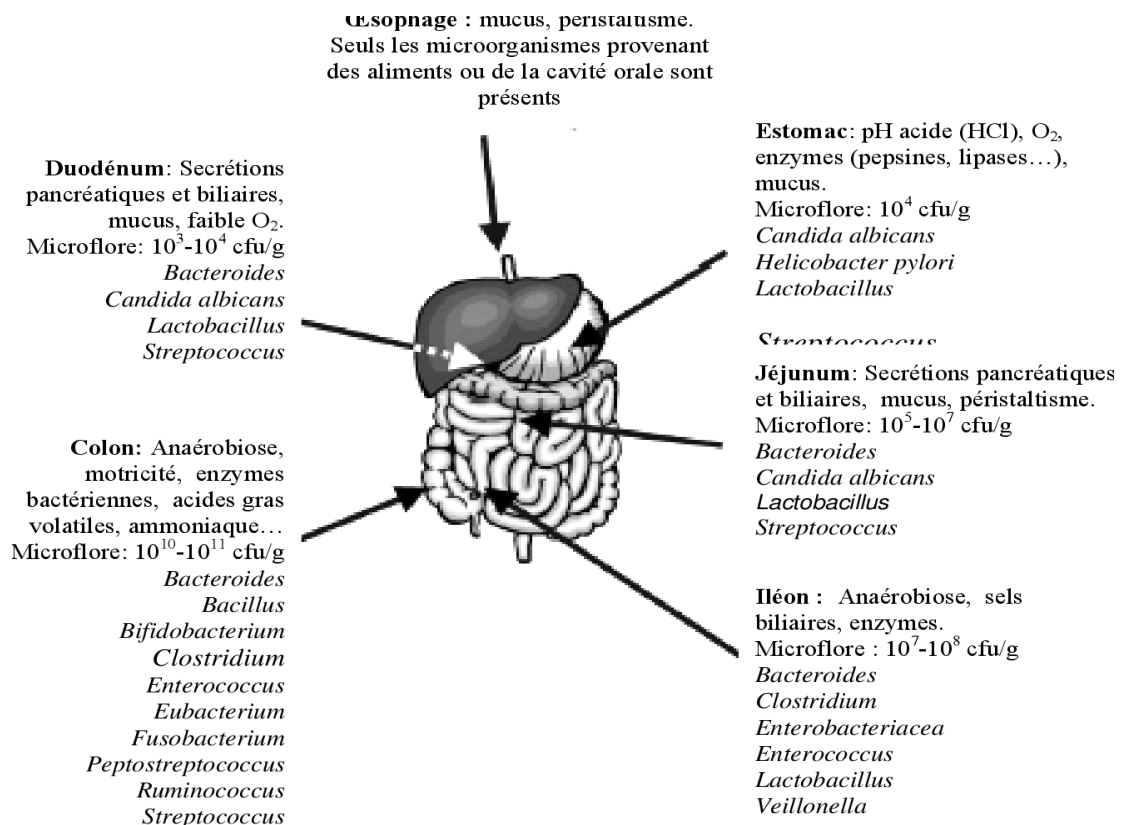


Figure 02 : Schéma simplifié décrivant les compartiments de l'appareil digestif de l'homme et leurs microflore. Adapté et modifié d'Ouwehand & Vesterlund (2003).

1.4. Les facteurs influençant sur la flore

Divers facteurs exercent une influence sur la composition de la flore intestinale qui s'installe : l'âge gestationnel, le mode d'accouchement, par voie vaginale ou par césarienne ainsi que l'environnement du lieu de naissance. L'hygiène de plus en plus stricte entourant les accouchements dans les pays développés soit à l'origine d'une moindre colonisation par les bactéries de la flore maternelle par rapport à la colonisation par des bactéries de l'environnement (Goulet, 2009).

1.5. La fonction du microbiote intestinal :

Le microbiote intestinal joue un rôle primordial en offrant deux fonctions essentielles: d'une part, il assure une meilleure efficacité digestive et porte des activités de synthèse, en particulier celles de vitamines. D'autre part, il constitue une barrière physique, microbiologique et immunologique sélective vis à vis d'agents potentiellement nuisible pour l'organisme (Qin, *et al.*, 2010).

Le microbiote intestinal

100 000 milliards de bactéries vivant dans l'intestin

Fonctions :

- digestive
- métabolique
- immunitaire
- neurologique

Propre à chaque individu :

160 espèces de bactéries environ par individu
La moitié se retrouve d'une personne à l'autre

15 à 20 espèces en charge des fonctions essentielles du microbiote

Sources : CNRS, Inra

Participent à

- ➔ Assimilation des nutriments
- ➔ Synthèse de vitamines
- ➔ Absorption des acides gras, calcium, magnésium, etc.

Déséquilibres du microbiote peuvent être des facteurs favorisant :

Maladies neuro-psychiatriques

Obésité

Diabète

Cancer

Maladies intestinales chroniques inflammatoires

© AFP

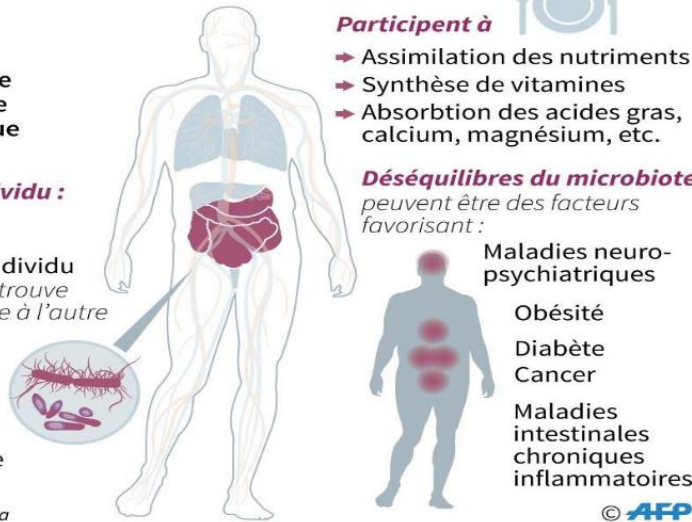


Figure 03 : Les fonctions du microbiote intestinal (Medjad, 2021)

1.6. Dysbiose intestinale

Une dysbiose est une perturbation de l'homéostasie du microbiote intestinal résultant d'un déséquilibre de la flore elle-même, de modifications de sa composition fonctionnelle et de ses activités métaboliques, ou de modifications de sa distribution locale (DeGruttola *et al.*, 2016).

Le déséquilibre du microbiote intestinal, se manifeste par une réduction de la biodiversité et une prolifération de bactéries potentiellement pathogènes au détriment d'autres micro-organismes (fig 04) (Lamas *et al.*, 2016).

Les facteurs de risque de dysbiose comprennent le Stress, utilisation d'antibiotiques ou la prise d'autres médicaments (comme les inhibiteurs de la pompe à protons, les laxatifs, les ralentisseurs de transit par exemple...), pathologie infectieuse digestive, régime restrictif et le manque d'enzymes digestives plus ou moins associée à une intolérance alimentaire par exemple intolérance au lait ou à la viande (Gagliardi *et al.*, 2018 ; Levy *et al.*, 2017).

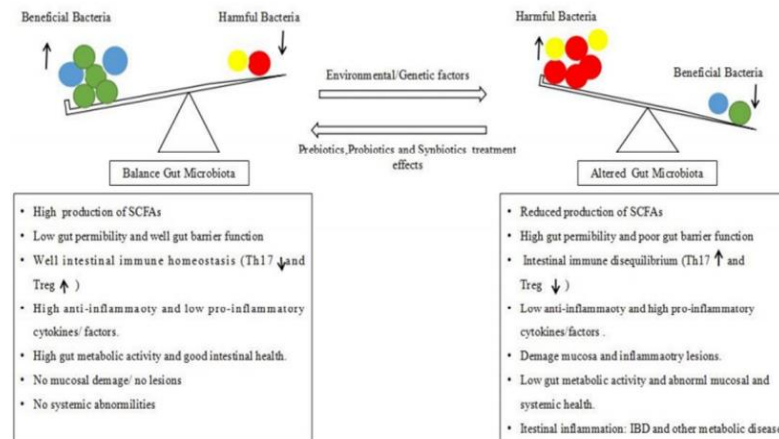


Figure 04 : le microbiote intestinal de l'individu sain (à gauche), le microbiote intestinal du patient atteint d'une dysbiose intestinale (à droite) et les effets pré, pro et symbiotiques (Khan *et al.*, 2019).

Chapitre 02 :

Les probiotiques

2.1. Historique et définition

La FAO/OMS donne la définition des probiotiques comme étant des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantités suffisantes, ont un effet positif sur l'hôte (**Mahrous, 2011**).

Le concept des probiotiques provient d'un chercheur et Prix Nobel Russe, Elie Metchnikoff (1907) qui avait pour théorie que la longévité des paysans bulgares était directement liée à leur consommation de laits fermentés (**Sanders, 2000**). Ainsi, Metchnikoff (1907) avait suggéré l'ingestion de bactéries vivantes, en particulier de bactéries lactiques (**Gournier-Chateau et al., 1994**).

2.2. Critères de sélection des souches probiotiques

Afin qu'une souche bactérienne soit qualifiée de probiotique, elle doit avoir des caractéristiques précises pour atteindre l'intestin et pouvoir agir pleinement tout en étant sans risque pour l'hôte. Ces caractéristiques ont été établies par la **FAO /WHO (2002)** comme suite:

- **Désignation du genre / espèce / souche** par une identification phénotypiques et génotypiques : pour qu'une espèce bactérienne soit considérée comme probiotique, il est nécessaire d'identifier le genre, l'espèce et la souche, car les effets probiotiques varient selon la souche microbienne. Le probiotique doit être désigné par un nom scientifiquement reconnu, et son identification doit être effectuée à l'aide de méthodes récentes et valides qui combinent des tests phénotypiques et génotypiques.
- **Innocuité de la souche probiotique** : Aucun effet secondaire indésirable : infections systémiques, activités métaboliques délétères, stimulation immunitaire excessive chez des personnes sensibles et transfert de gènes entre les espèces bactériennes probiotiques et celles de la flore intestinale.
- **Réalisation de tests in vitro spécifiques à l'effet santé recherché.**
Exemple : résistance à l'acidité gastrique et aux acides biliaires, enzymes digestives, adhérence au mucus et/ou cellules épithéliales humaines, activité antimicrobienne contre les bactéries pathogènes, propriétés d'immuno-modulation, diminution des espèces réactives de l'oxygène,...

- **Etudes in vivo et cliniques** : l'étude clinique doit être menée en double aveugle, contreplacébo, contrôlée et randomisée. Elle doit utiliser la version finale du produit vecteur du probiotique

Tableau 01 : Critères de sélection des probiotiques (Nousiainen et al., 2004).

Critères	But recherché
Résistance à l'acidité gastrique	Survie pendant le passage par l'estomac et duodénum
Résistance aux sels biliaires	Survie pendant le passage par l'intestin grêle
Production d'acide (à partir de glucose et lactose)	Production (de barrière acide) efficace dans l'intestin
Adhésion au mucus et /ou aux cellules épithéliales humaines	Colonisation efficace, réduction des sites d'adhésion des pathogènes à la surface
Production de substance antimicrobienne	Inhibition du développement des germes pathogènes
Résistance à la chaleur	Survie pendant le processus de transformation
Bonnes propriétés technologiques	Stabilité, croissance sur une large échelle, survie dans le produit, résistance aux bactériophages

2.3. Les microorganismes utilisés comme probiotiques

2.3.1. Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des bactéries à Gram-positif qui comprenant 12 genres bactériens dont les plus étudiés sont *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* et *Pediococcus* (Salimen et al., 1999). Ces bactéries non sporulant fermentent les sucres pour produire de l'acide lactique (Hamedi, 2009).

2.3.2. Les bactéries non lactiques

D'autres bactéries font également preuve d'intérêt en tant que probiotiques. En particulier la souche *Escherichia coli* Nissle 1917 {figure 05 (B)} et de bactéries sporulées y compris *Bacillus subtilis* et *Bifidobacterium cereus* (Krammer et al., 2006).



Figure 05: (A): *Bifidobacterium* spp., (B): *Escherichia coli* Nissle 1917 (Krammer et al., 2006).

Chapitre 02 : Les probiotiques

2.3.3. Les levures

Les levures appartiennent au groupe des champignons, caractérisés par leur forme unicellulaire qui est prédominante. Les cellules végétatives peuvent être sphériques, ovoïdes, allongées, cylindriques, apiculées, ogivales ou en forme de citron. La longueur des cellules s'étend de 2-3 μm à 20-50 μm , tandis que leur largeur varie de 1 à 10 μm . Le bourgeonnement est le mode de reproduction végétative le plus courant chez les levures.

Les levures sont également utilisées en additifs alimentaires depuis de nombreuses années, chez les animaux pour améliorer les performances zootechniques et comme régulateur de la flore intestinale chez l'homme. Ils apportent des effets positifs en termes de performances de productions chez plusieurs espèces des ruminants et monogastriques, mais ne peuvent pas coloniser le tractus digestif.

Les levures utilisées comme probiotiques sont des souches de *Saccharomyces cerevisiae*. Une souche bien déterminée de cette levure est dénommée *Saccharomyces boulardii* (Chafai, 2006).

Tableau 02 : Micro-organismes considérés comme probiotiques (Hozalpfel et al., 1998)

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Autres bactéries lactiques</i>	<i>Autres micro-organismes</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus spp,</i>
<i>L. amylovirus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli strain Nissle</i>
<i>L. brevis</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Propionibacterium</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>freudenreichii</i>
<i>L. cellobius</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilis</i>	
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. thermophilum</i>	<i>Streptococcus diacetylactis</i>	
<i>L. farciminis</i>		<i>Streptococcus intermedius</i>	
<i>L. fermentum</i>			
<i>L. gallinarum</i>			
<i>L. gasseri</i>			
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

2.4. Mécanismes d'action des probiotiques

Il existe différents mécanismes d'action par lesquels les probiotiques exercent un antagonisme vis-à-vis plusieurs microorganismes (Yan et Polk, 2009). Parmi ces mécanismes, on peut citer :

2.4.1. Inhibition de la croissance des microorganismes pathogènes

Les probiotiques exercent à la fois des effets antagonistes directs, par la production de substances antimicrobiennes telles que les bactériocines, l'acide, le peroxyde d'hydrogène et les défensives, et des effets indirects, en créant un environnement peu propice à l'implantation et à la prolifération des bactéries pathogènes spécifiques grâce à des modifications du pH intestinal (Yan et Polk, 2009).

Les probiotiques favorisent la production d'acides gras à chaînes courtes, tels que l'acide lactique, acétique, propionique, acide succinique, etc., ce qui entraîne l'acidification de l'environnement intestinal, empêchant ainsi la croissance des microorganismes sensibles à l'acidité (Faure *et al.*, 2013).

Les probiotiques rivalisent avec les pathogènes pour l'accès aux nutriments disponibles dans l'environnement (Coudeyras et Forestier, 2010).

2.4.2. Amélioration de la fonction barrière

Les probiotiques renforcent l'effet barrière contre les pathogènes en empêchant l'implantation des micro-organismes pathogènes dans le tractus digestif. Ils accomplissent cela en compétition pour les sites d'adhésion grâce à leur capacité d'adhérer à la muqueuse intestinale (Faure *et al.*, 2013). Certains probiotiques contribuent à l'effet barrière des muqueuses et à l'exclusion des agents pathogènes en stimulant la production de mucines et de peptides antimicrobiens. De plus, ils améliorent l'intégrité de l'épithélium, notamment en favorisant la formation de jonctions serrées (Coudeyras et Forestier, 2010).

2.4.3. Modulation du système immunitaire

Les bactéries probiotiques sont capables d'exercer un effet d'immunomodulation. Des études ont révélé que ces bactéries jouent un rôle dans le maintien de l'équilibre

intestinal en interagissant avec le système immunitaire inné ou adaptatif (**Kim et al., 2016**).

Les bactéries probiotiques présentent la capacité d'interagir avec différentes cellules, telles que les cellules épithéliales, les cellules dendritiques, les monocytes, les macrophages et les lymphocytes. La réponse immunitaire adaptative repose sur les lymphocytes B et T, qui sont capables de reconnaître spécifiquement des antigènes particuliers. En revanche, le système immunitaire inné répond aux motifs moléculaires associés aux pathogènes qui sont des structures communes partagées par la plupart des agents pathogènes (**Bermudez-Brito et al., 2012**).

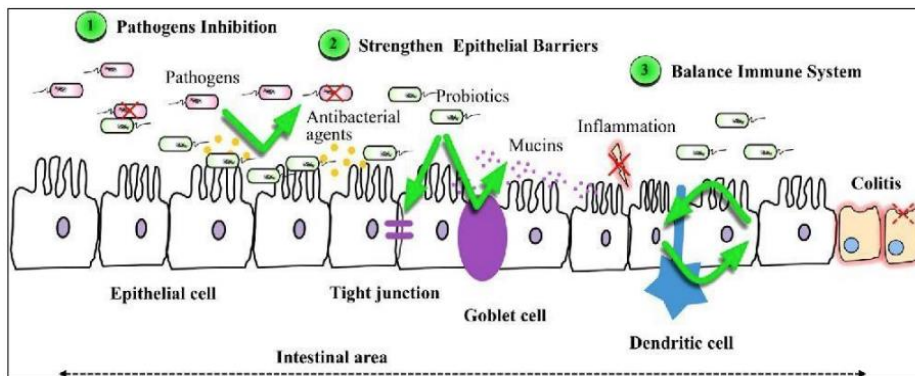


Figure 06 : Mécanismes d'action des probiotiques (Kim et al., 2016).

- (1) Les probiotiques inhibent les pathogènes en se faisant concurrence pour la nutrition et le site de liaison, ou en sécrètent des agents antibactériens.
- (2) Les probiotiques améliorent la jonction serrée et favorisent la sécrétion de mucines.
- (3) Les probiotiques contribuent à l'homéostasie intestinale par un effet d'immunomodulation.

2.5. Les principaux effets bénéfiques des probiotiques

Certains effets bénéfiques sur la santé ont été associés à la consommation de probiotiques. Dont plusieurs ont été prouvés par des études cliniques sur l'homme. Cependant, d'autres ne sont pas avérés ou sont simplement basés sur des tests in vitro ou sur des essais avec des animaux (**Izquierdo, 2009**).

Chapitre 02 : Les probiotiques

Les probiotiques ont été largement étudiés et ont démontré leur capacité à prévenir les maladies intestinales, à atténuer l'intolérance au lactose, à améliorer l'équilibre des micro-organismes dans l'intestin, présentant des effets anti-hypercholestérolémies et antihypertenseurs, soulager des troubles post-ménopausiques et réduire la diarrhée du voyageur. De plus des recherches récentes ont exploré leur utilisation potentielle dans le traitement des affections cutanées et buccales. (Shi *et al.*, 2016).

Ils contribuent également à la modulation du système immunitaire et au renforcement de la muqueuse intestinale) (Matsuzaki and Chin 2000;Madsen, Cornish *et al.*, 2001).

Les effets bénéfiques majeurs des probiotiques, ainsi que les mécanismes qui leur sont associés, sont répertoriés dans le tableau présenté.

Tableau 03 : Les principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques (Salminen *et al.*, 2004 ; Patterson, 2008).

Effets intestinaux	Effets sur le système Immunitaire	Autres effets
Contrôle des troubles suivants : -Mauvaise digestion du lactose. -Diarrhée due aux <i>rotavirus</i> et Diarrhée -associée aux antibiotiques. -Syndrome du côlon irritable -Constipation. -Infection par <i>Helicobacter pylore</i> . -Prolifération bactérienne dans l'intestin grêle. -Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin Prévention de l'entérocolite Nécrosante du nouveau-né	-Modulation immunitaire -Répression des réactions allergiques par réduction de l'inflammation. -Réduction des risques d'infection par des agents pathogènes courants (<i>Salmonella, Shigella</i>)	Réduction du risque de : -Certains cancers (colorectal, vessie, col utérin, sein) -Coronaropathie. -Maladie des voies urinaires -Infection des voies respiratoires supérieures et infections connexes Réduction du cholestérol sérique et de la pression artérielle.

2.6. Les probiotiques et prébiotiques

Effectivement, les prébiotiques diffèrent des probiotiques en ce sens qu'ils ne sont pas des micro-organismes, mais plutôt des substances fermentescibles. Autrement dit, ce sont des composés alimentaires qui résistent à la digestion lors des différentes étapes du processus digestif (**Laffarague, 2015**).

Il s'agit « d'ingrédients alimentaires qui influencent de façon bénéfique l'hôte en stimulant sélectivement la croissance et/ou l'activité d'un ou d'un nombre limité de groupes bactériens dans le colon, et qui améliorent ainsi la santé de l'hôte » (**Favre, 2004**).

Selon les critères énoncés par Robertfroid en 2007, les prébiotiques peuvent être classés en fonction des éléments suivants.

- La résistance à l'acidité gastrique
- L'hydrolyse par le mammifère enzyme gastro-intestinal et l'absorption
- La fermentation par la microflore intestinale et la stimulation sélective de la croissance et /ou de l'activité de l'intestine bactérie associées à la santé et au bien-être (**Robertfroid, 2007**).

Pour qu'un ingrédient alimentaire soit classifié comme prébiotique, il est nécessaire de vérifier la validation de cinq critères spécifiques (**Wang, 2009**) :

- Il doit être résistant aux différents processus de digestion pour atteindre le colon
- Il doit pouvoir être fermenté par la microflore intestinale
- Il doit être bénéfique pour la santé de l'hôte
- Il doit stimuler de façon sélective les probiotiques
- Il doit rester stable durant les différents traitements alimentaires du procès

2.7. Applications des probiotiques

Les produits commercialisés en tant que probiotiques, que ce soit pour les humains ou les animaux, se présentent sous deux principales formes : les mono-souches et les pluri-souches. Les mono-souches sont composées d'un seul microorganisme, tandis que les pluri-souches sont des associations de plusieurs espèces. De nos jours, les produits probiotiques sont commercialisés sous trois formes courantes :

- Un concentré de culture ajouté à des aliments et boissons à base de produits laitiers, de fruits et de céréales.

Chapitre 02 : Les probiotiques

- Un ingrédient ajouté à un aliment à base de lait ou de soja et auquel on permet d'atteindre une concentration élevée par fermentation.
- Des cellules séchées, concentrées, en poudre, en capsule ou en comprimés **(Patterson, 2008)**.

Les probiotiques sont généralement associés aux produits laitiers de culture. la gamme de produits probiotiques comprend maintenant des fromages, des crèmes glacées et des yogourts glacés de même que des aliments et boissons non laitiers **(Patterson, 2008)**.

Chapitre 03 :
Des bactéries lactiques

3.1. Historiques des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont décrites pour la première fois par Orla Jenson au début du vingtième siècle. Elles sont des microorganismes utiles à l'homme lui participant à l'élaboration de nombreux produits alimentaires fermentés. Elles jouent plusieurs rôles relatifs aux caractéristiques organoleptiques, nutritionnelles et sanitaires de l'aliment (**Pilet et al., 1998**).

Il faudra attendre Pasteur et ses travaux sur la fermentation en 1857 pour établir un lien entre la fermentation lactique et les bactéries. La première culture bactérienne pure sera d'ailleurs une culture de *Lactococcus lactis* obtenue et décrite par Joseph Lister en 1873 cité par Penaud, (2006). Metchnikoff isole en 1904 le « bacille bulgare » (*Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*) présent dans le yaourt. Il étudie les propriétés acidifiantes des bactéries du yaourt et il développera l'idée que les bactéries contenues dans les laits fermentés ont un effet bénéfique sur la santé (**Mechai, 2009**).

3.2. Définition

Ce sont des bactéries à Gram positif, asporulantes, micro aérophiles ou anaérobies, catalase négative, oxydase négative, acidotolérantes, non motiles, de forme coccoïde ou bâtonnet (**Bouguerra, 2021**).

Ces bactéries sont mésophiles avec une croissance de 10 °C à 40 °C et un optimum entre 25 et 35 °C, mais certaines sont capables de se développer à 5 °C ou 45 °C, elles supportent des pH de 4 à 8 (exceptionnellement de pH 3.2 à 9.6) Ces bactéries exigeantes ne possèdent pas de cycle de Krebs, ni de cytochromes, ni porphyrines (composants de la chaîne respiratoire) ni catalase, ni nitrate réductase et leur croissance requiert des acides aminés, des bases azotées et des vitamines (**Dribine et al, 2018**).

Les bactéries lactiques produisent de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme en fermentant les sucres (glucose, fructose, mannose, galactose, saccharose et lactose) chez les bactéries homofermentaires, en plus de l'éthanol et CO₂ chez les bactéries hétérofermentaires. Leur ADN présente un pourcentage de G + C compris entre 30 et 60% (**Stiles & Holzapfel, 1997**).

Chapitre 03 : Les bactéries lactiques

Les BAL sont bien tolérés par les animaux et l'homme ayant le statut GRAS 'Generally Recognized As Safe' (khodja, 2018).

3.3. Habitat :

Les bactéries lactiques sont très fréquentes dans la nature. Elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples. Elles peuvent être isolées du lait, du fromage, de la viande, des végétaux. Elles se développent avec la levure dans le vin, la bière et le pain. Quelques espèces colonisent le tube digestif de l'homme et des animaux (Hassan et Frank, 2001).

Le tractus gastro-intestinal des mammifères est colonisé par des BAL telle que *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconstoc* et *Weissella*. Par ailleurs, l'appareil génital chez la femme est principalement colonisé par des bactéries lactiques, telles que *Lactobacillus*, auxquelles il apporte des nutriments comme le glycogène. En acidifiant le milieu, ces bactéries apportent une protection contre des pathogènes responsables d'infections vaginales comme *Trichomonas vaginalis* (*T .vaginalis*), pathogène responsable de la trichomonase vaginale et/ou *Candida albicans* à l'origine de la vulvo-vaginite (Makhloufi, 2011).

Dans l'environnement, les bactéries lactiques sont souvent retrouvées dans le lait et ses dérivés (lait fermenté, fromages, ...). Les différentes espèces de *Lactobacillus*, *Lactococcus lactis* (*Lc. lactis*) et/ ou *Lc. garvieae*, les plus rencontrées dans le lait et le fromage, sont communément utilisées comme ferments (« starter culture ») par l'industrie agroalimentaire pour la production de produits laitiers (Belyagoubi, 2014).

3.4. Taxonomie et classification

La classification des bactéries lactiques peut être réalisée en utilisant des critères phylogénétiques basés sur des méthodes moléculaires. Cependant, dans une première étape d'identification des micro-organismes, la caractérisation phénotypique/biochimique classique reste une approche pratique. Certaines caractéristiques phénotypiques sont utilisées pour identifier les espèces au sein des genres comme la capacité à: fermenter les hydrates de carbone, tolérer différentes concentrations en bile, produire des polysaccharides extracellulaires, exiger des facteurs de croissance, produire de l'acétoïne et synthétiser certaines enzymes. La composition en G+C de l'ADN, la composition en acides

Chapitre 03 : Les bactéries lactiques

gras, la mobilité électrophorétique du lactate déshydrogénase sont également d'autres critères qui peuvent être étudiés pour l'identification des espèces lactiques (**Menad, 2017**).

D'après la dernière édition de Bergey's manual of systematic bacteriology (2009), les bactéries lactiques sont classées dans le phylum des Firmicutes, la Classe des Bacilli et l'ordre des Lactobacillales renfermant trente-cinq genres répartis sur six familles. Parmi ces genres, seulement treize sont utilisés dans la biotechnologie alimentaire, il s'agit de : *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus*, *Weissella* (**Drider et Privost, 2009**) et *Bifidobacterium* (**Leveau et Bouix, 1993**).

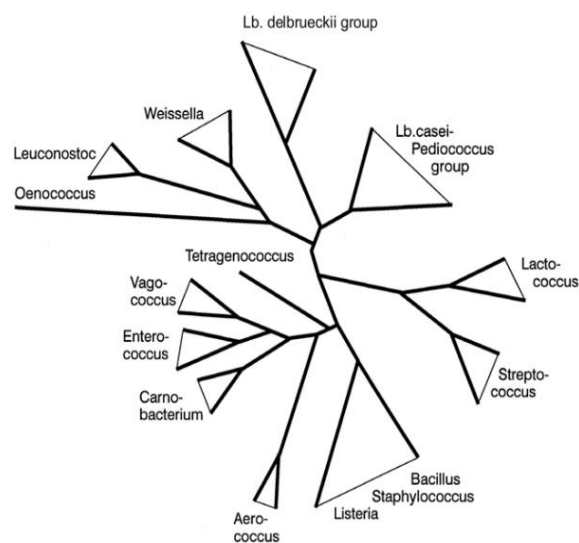


Figure 07 : Schéma montrant l'arbre phylogénique des bactéries lactiques y compris des genres apparentés (Axelsson, 2004).

3.5. Des principaux genres des bactéries lactiques

3.5.1 Le genre *Lactobacillus*

Le genre *Lactobacillus* a été créé par Beijerinck en 1901 (**Corrieu ; Luquet, 2008**). *Lactobacillus* est le genre principal et de loin le plus grand et le plus diversifié de la famille des Lactobacillaceae (**Zhang et Cai, 2014**).

Les lactobacilles sont souvent associés au tractus gastro-intestinal des mammifères ainsi qu'aux végétaux. Beaucoup d'espèces sont utilisées en tant que probiotiques pour la santé animale ou humaine (**Hammes et Hertel, 2009; Lysiane, 2012**).

Chapitre 03 : Les bactéries lactiques

On rencontre chez les lactobacilles une variabilité de forme (fins, incurvés, coccobacilles,...) et de longueur. La longueur des bacilles et le degré de courbure dépend de l'âge de la culture, la composition du milieu (par exemple, la disponibilité des esters d'acide oléique) et le taux d'oxygène. Cependant, les principales différences morphologiques entre les espèces restent habituellement clairement reconnaissables ; certaines espèces de lactobacilles produisant du gaz (Par exemple, *Lactobacillus fermentum* et *Lactobacillus brevis*) présentent toujours un mélange de bacilles longs et courts (De Vos et al, 2009).

La production de l'acide lactique issu du métabolisme fermentaire représente au moins 50% des produits de fermentation (Axelsson, 1993).



Figure 08 : *Lactobacillus bulgaricus* au microscope électronique (Menad, 2018)

3.5.2 Le genre *Streptococcus*

Le genre *Streptococcus* présente une diversité importante et sa classification est sujette à des changements fréquents. Il est généralement divisé en trois groupes distincts : le groupe pyogène (les espèces pathogènes et hémolytiques), oral (tel que *Streptococcus Salivarius*, *Streptococcus Bovis*) et les autres streptocoques (Les cellules de ce genre sont immobiles, sphériques ou ovoïdes qui ont un diamètre inférieur à 2µm avec une disposition en paires ou en chaînes longues. La fermentation des carbohydrates produit principalement de l'acide lactique mais il n'y a pas de production de gaz. Le peptidoglycane est du groupe A et leur température optimale de croissance est 37°C. Elles sont incapables de se développer à 15°C et à pH : 9.6. Des nombreuses espèces de streptocoques sont des commensaux ou des parasites chez l'homme et les animaux, tandis que certaines sont hautement pathogènes (Scheilfer, 1987).

3.5.3. Le genre *Lactococcus*

Les *Lactococcus* sont des bactéries mésophiles qui se présentent sous forme de coques isolées, en paires ou en chaînettes de longueur variable, allant de 0,5 à 1

Chapitre 03 : Les bactéries lactiques

µm. Ce sont des microorganismes homofermentaires, ce qui signifie qu'ils produisent uniquement de l'acide lactique de type L (+). Leur contenu en G+C varie de 34 % à 43 % (Amensag, 2019), leur température de croissance est située entre 25 et 45°C (Boudersa *et al*, 2017).

3.5.4. Les genres *Leuconostoc* et *Weissella*

Les espèces de ce genre sont isolées des viandes stockées, des végétaux, des produits laitiers fermentés et des vins (Thunell, 1995).

La famille des Leuconostocaceae comprend des bactéries de forme ovoïde, qui peuvent être allongées ou elliptiques. Ces cellules sphériques se disposent en paires ou en chaînes. Les bactéries de cette famille se distinguent par leur métabolisme hétéro-fermentaire, 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 hétéro-fermentaires (Gonzalez *et al.*, 2007).

La classification de ses espèces basée sur G+C % a permis de distinguer quatre espèces : *Leuconostoc mesenteroides* (et ses trois sous espèces: subsp. mesenteroides, subsp. dextransicum et subsp. cremoris), *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc paramesenteroides* et *Leuconostoc ænos* (Yang et Woese, 1989 ; Leveau et Bouix, 1993 ; Corrieu et Luquet, 2008).

La distinction entre les *Weissella* et d'autres bactéries lactiques hétérofermentaires dans la famille des Leuconostocaceae reste un défi, les espèces du genre *Weissella* sont constituées de courts bacilles, de coccobacilles ou des coques ovoïdes, à Gram positif, se présentant de manière isolée ou groupés par deux ou en courtes chaînes, non sporulés, immobiles, catalase négative (*Weissella paramesenteroides* peut produire une pseudocatalase lorsqu'elle est cultivée sur un milieu pauvre en glucose), oxydase négative, aéro-anaérobies ou micro-aérophiles, chimio-organotrophes, hétérofermentaires stricts, qui peuvent être cultivées à 15°C. Elles ont des exigences nutritionnelles complexes (Menad, 2017).

3.5.5. Les genres *Enterococcus* et *Vagococcus*

Les entérocoques sont des bactéries à Gram positif qui se trouvent généralement sous forme de diplocoques ou de coques alignées en chaînes. Ce sont des bactéries anaérobies facultatives qui peuvent vivre avec ou sans oxygène.

Chapitre 03 : Les bactéries lactiques

Elles sont immobiles et ne possèdent pas de capsule protectrice. Cette famille englobe une trentaine d'espèces qui ont longtemps été classées dans le genre des streptocoques au vu de leurs similitudes avec les streptocoques du groupe D. Les deux principales espèces importantes en clinique sont l'*enterococcus faecalis* et l'*enterococcus faecium*, le premier étant plus fréquent que le second (90% vs 10% environ).

Ces microorganismes sont très résistants et peuvent survivre dans des environnements difficiles, tels que des milieux très alcalins ou riches en sel (par exemple, sels biliaires), ou des températures extrêmes (10 °C à 60 °C) (**Bouvet ; Couvry, 1994**).

Les espèces du genre *Vagococcus* peuvent être facilement confondues avec les lactocoques sur le plan morphologique mais ces deux genres se distinguent clairement par leur composition en acides gras (**Ho, 2008**).

3.5.6. Le genre *Bifidobacterium*

C'est le genre le plus connu et le mieux étudié dans l'ordre des bifidobactériales. Les *Bifidobacterium* se sont des bâtonnets, Gram positives, asporulées, immobiles, ont des formes variées (incurvées, rarement ramifiées) celles de formes bâtonnets peuvent généralement être isolées ou en amas et en paires ou en forme de V (**Lansing et al., 2003**).

Ces microorganismes sont présents dans la flore intestinale des nouveau-nés, ainsi que dans les intestins des humains et de diverses espèces animales. Ils sont couramment utilisés dans la production de yaourts et de produits laitiers fermentés en tant que probiotiques. Leur présence est associée à une protection contre les agents infectieux au niveau intestinal, grâce à la présence d'un facteur bifidogène (**Sondergaard, 2005**).



Figure 09: *Bifidobacterium* sp. (Aibeche et al, 2020)

3.5.7. Le genre *Pediococcus*

Les *Pediococcus* sont des bactéries mésophiles qui se présentent sous forme de coques homofermentaires. Ce qui les distingue des genres précédents est leur groupement en tétrades, c'est-à-dire qu'elles se regroupent en quatre cellules. Elles fermentent les sucres en produisant de l'acide lactique DL ou L(+), leurs exigences nutritionnelles, leur faible activité protéolytique et chez la plupart des espèces leur incapacité d'utiliser le lactose ne leur permettent pas d'acidifier et de coaguler le lait (Levau et al., 1993).

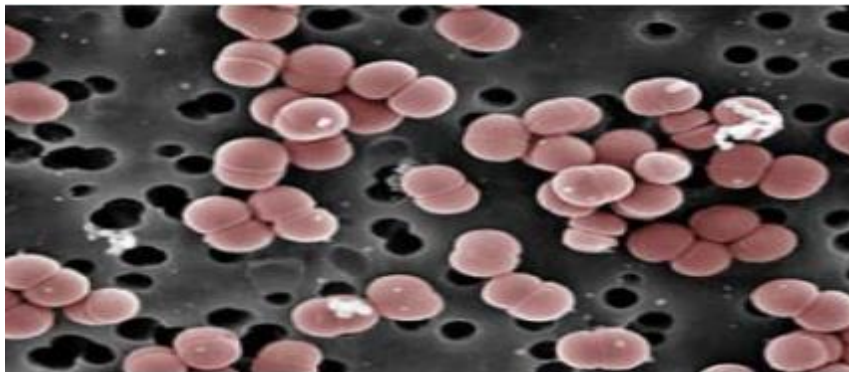


Figure 10: Morphologie en microscopie électronique de *Pediococcus* sp (Sylviane Lemarinier)

3.6. Intérêt des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont utilisées dans plusieurs secteurs d'activités, en particulier dans le domaine de la santé et de l'industrie agroalimentaire.

3.6.1. Dans le domaine d'alimentaire :

Les bactéries lactiques, du point de vue de leurs caractéristiques physiologiques, jouent un rôle important dans l'industrie alimentaire en raison des propriétés qu'elles

Chapitre 03 : Les bactéries lactiques

possèdent. Selon **Monnet et al. (2008)**, ces propriétés peuvent être résumées comme suit :

- Production d'acide lactique à partir du glucose, Cela entraîne une acidification qui a plusieurs conséquences selon le produit considéré: coagulation du lait, synérèse des caillés fromagères, saveur acide, inhibition des flores d'altération.
- Génération d'un large éventail de composés d'arômes qui contribuent à l'établissement des propriétés organoleptiques.
- Production d'exopolysaccharides : Certaines souches de bactéries lactiques sont capables de produire des exopolysaccharides, qui sont des polymères de sucres. Ces exopolysaccharides peuvent agir comme des agents de texture et sont particulièrement recherchés dans l'industrie alimentaire.
- Production de CO₂ contribuant à la formation d'ouvertures dans les fromages et au caractère pétillant des aliments fermentés.

3.6.2. Dans le domaine de santé :

L'intérêt des bactéries lactiques pour la santé humaine a été proposé pour la première fois au début du siècle par le scientifique russe Metchnikoff. Selon lui, les *Lactobacillus sp* étaient capables de réduire la putréfaction intestinale en modifiant la flore intestinale. Le rôle des bactéries lactiques dans la santé s'est ensuite développé dans le contexte des probiotiques. Les bienfaits des bactéries lactiques sont de plus en plus étudiés, certains sont bien établis d'autres restent encore controversés :

- Améliore la digestion de lactose.
- Le traitement de certaines infections ou diarrhées.
- Diminution du cholestérol sérique et dé-conjugaison des sels biliaires.
- Utilisation dans l'élaboration des vaccins (**Calvez et al, 2009**).

Chapitre 04 :
Les produits laitiers
traditionnels

4. Les produits laitiers traditionnels

4.1. Lben

4.1.1. Définition

L'ben est un produit phare de la transformation traditionnelle du lait en Algérie et est largement consommé aux côtés d'autres plats comme le célèbre couscous.

Le Lben est le petit lait issu du barattage puis de l'écémage du Rayeb. Il est également appelé laban, leben ou lban (**Bendimerad, 2013**).

4.1.2. Mode de fabrication

L'origine de ce produit remonte probablement à l'époque où l'homme a commencé à maîtriser les espèces laitières et à leurs laits. Sa fermentation lactique produit son arôme naturel et sa saveur unique. Sa préparation maison est simple, le lait est simplement laissé à lui-même jusqu'à ce qu'il coagule. Celle-ci se fait à température ambiante et dure 24 à 48 h selon la saison. Le barattage qui lui succède dure 30 à 40 minutes. A la fin du barattage, une quantité spécifique d'eau est généralement ajoutée (environ 10% du volume du lait), chaude ou froide, selon la température ambiante, de façon à ramener la température de l'ensemble à un niveau convenable au rassemblement des grains de beurre (**Ouadghiri, 2009 ; Benkerroum et al., 2004**).

4.1.3. Caractéristiques physiques et chimiques

Tableau 04 : Caractéristique physiques et chimiques du Lben (Bendimerad, 2013)

Paramètres	Valeur moyenne
Humidité	90
Acidité	60
pH	4.2
NaCl	0.08
Matière grasse	0.2
Lactose	2.14
Protéine	1.93

4.1.4. La microflore du Lben

La microbiologie de L'ben À présent, des espèces de bactéries lactiques des genres *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *peddiococcus streptococcus* et *bifidobacterium* ont été caractérisés dans les laits fermentés, ces bactéries sont particulièrement utilisées dans les cultures commerciales (**Mogensen et al., 1993**).

4.2. Zebda

4.2.1. Définition

Le **Codex Alimentarius** indique que Zebda est une matière grasse dérivée exclusivement du lait et/ou de ses produits, notamment sous la forme d'une émulsion dans l'eau et l'huile. Il est fabriqué à partir de la crème de lait barattée. (**Benkerroum, 2013**)

4.2.2. Mode de fabrication

Le beurre frais de Zebda est formé par barattage de Rayeb. Ce dernier est parfois augmenté d'une petite quantité d'eau (40-50 °C) à la fin du barattage pour favoriser l'agglomération des globules lipidiques et accroître le rendement en beurre. Les globules gras qui apparaissent à la surface sont séparés avec une cuillère perforée.

Le beurre frais obtenu présente une consistance molle en raison de sa forte concentration en eau (**Benkerroum et al., 2004 ; Ouadghiri, 2009**).

4.2.3. Caractéristiques physiques et chimiques

Tableau 05 : Caractéristiques physique et chimiques du Zebda (Benkerroum et al., 2004)

Paramètres	Valeurs moyennes
Humidité	14,0%
NaCl	1,5%
Lactose	1,2 g/100g
Matières grasse	81,0 g/100g
Protéines	3,2 g/100g
Lipides insaponifiables	0,3 g/100g
Indice d'acide	52,0 mg KOH/g lipide
Indice peroxyde	3,7 mg KOH/g lipide

4.2.4. La microflore du Zebda

Les micro-organismes Zebda peuvent être divisés en deux catégories : Les bactéries lactiques provoquent une acidité aussi élevée, tandis que les bactéries lipolytiques détruisent et oxydent la teneur en graisse, provoquant la rancidité du Zebda, et les bactéries protéolytiques dégradent caséine du Zebda ce qui donne un goût de fromage. Les coliformes, les entérobactéries et d'autres bactéries sont responsables de la coloration et des goûts non-souhaitables dans le Zebda. La flore dominante du Zebda est constituée par la flore lactique naturelle ou introduite sous forme de levain. La flore naturelle est constituée par *Lactococcus diacetylactis* et *Lactococcus cremoris*. Ces deux espèces sont responsables de la production d'arôme dans le Zebda (**Bettach et al., 2012**).

4.3. Fromage frais

4.3.1. Définition

Le fromage frais est issu de la lente coagulation du lait via le procédé d'acidification seul ou en combinaison avec une petite quantité de présure. Les fromages frais présentent une grande diversité selon le degré d'égouttage du coagulum et de la teneur en matière grasse du lait utilisé (**Mahaut et al., 2003**).

4.3.2. Mode de fabrication

A propos, un fromage frais est fabriqué selon un protocole traditionnel qui comprend la coagulation présure de lait cru entier de vache, à laquelle a été additionné un sel dans une proportion de 10-20 NaCl par litre de lait (**Mennane et al., 2007**).

4.3.3. Caractéristiques physiques et chimiques

Tableau 06 : Caractéristiques physiques et chimiques du fromage frais (Eck et Gillis, 2006).

Constituants	Fromage frais
Eau (g)	80
Glucides (g)	4
Lipides (g)	7.5
Protéines (g)	8.5

Chapitre 04 : Les produits laitiers traditionnels

Calcium (mg)	100
Sodium (mg)	40
Vitamine A (UI)	70

4.3.4. La microflore du fromage frais

La microflore du J'ben : les bactéries lactiques (10^8 à 10^9 ufc.g-1). Telles *Lactococcus lactis biovar et diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroide lactis*, *Lactobacillus plantarum* et *brevis*, des *Enterococcus casei*. D'autre part une population moyenne en levures et moisissures a été détectée, et bien qu'elle ne représente aucun risque sur la qualité hygiénique du produit ; une teneur élevée peut provoqué des différentes altérations du fromage (décoloration et odeur alcoolisé...) (Benkerroum et al., 2004).

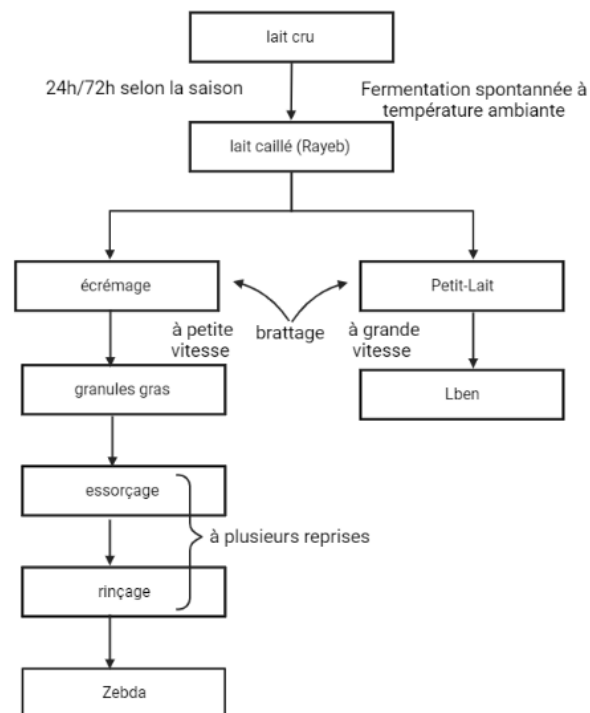


Figure 11: Schéma de fabrication des produits laitiers traditionnels (Zebda et Lben)

Partie expérimentale :

Matériel et méthodes

1. Objectif de l'étude

Etude de quelques caractères probiotiques des bactéries lactiques isolées à partir de différents échantillons (Zebda - Fromage frais - Lben).

2. Lieu et durée du travail

L'intégralité de ce travail a été réalisée au laboratoire pédagogique de la faculté science de la nature et de la vie, au niveau de laboratoire numéro I de microbiologie de l'université Abdelhamid IBN BADIS de Mostaganem.

3. Provenance des échantillons

Le prélèvement a été effectué de 3 types d'échantillons (Zebda, Fromage frais, Lben) provenant de la wilaya Mostaganem.

La collecte a été réalisée selon les règles d'hygiène recommandées en microbiologie. Les échantillons ont été recueillis dans des flacons et des boîtes stériles, transportés après dans une glacière à 4°C et acheminés directement au laboratoire pour analyse.

4. Les milieux de cultures utilisés

Dans notre travail, plusieurs milieux de culture ont été utilisés pour l'isolement, la purification, la réactivation des différentes souches au cours de cette étude expérimentale, il s'agit des milieux suivants :

- **Les milieux solides** : MRS, M17, GN, Müller Hinton, MRS/M17+amidon,
- **Les milieux liquides**: BN, MRS/M17 à différents pH (4.5, 6.5 et 9.3), bouillon MRS sans sucre, MRS/M17 à 4%, 6.5% de NaCl, bouillon Mœller à arginine, bouillon Clark et Lubs, lait de Sherman à 1% et 3% de bleu de méthylène

La composition et le mode de préparation de ces milieux sont indiqués dans l'annexe.

5. Isolement des souches lactiques

5.1. La préparation de la suspension mère et des dilutions décimales

1 ml de la solution mère a été pris de chaque échantillon et dissout dans 9 ml d'eau physiologique. Ensuite une série de dilution est préparée à partir de l'homogénat (10^{-1}) jusqu'à une dilution (10^{-6}).

5.2. Isolement et purification

L'isolement sélectif des bactéries lactiques par culture sur plusieurs milieux a été réalisé selon les méthodes décrites par **Carr *et al.*, (2002)**, 1 ml de chaque dilution de chaque échantillon est ensemencé dans la masse des milieux solides (MRS et M17) pour l'obtention des colonies bien séparées. Après incubation à 37° C pendant 24/72 heures.

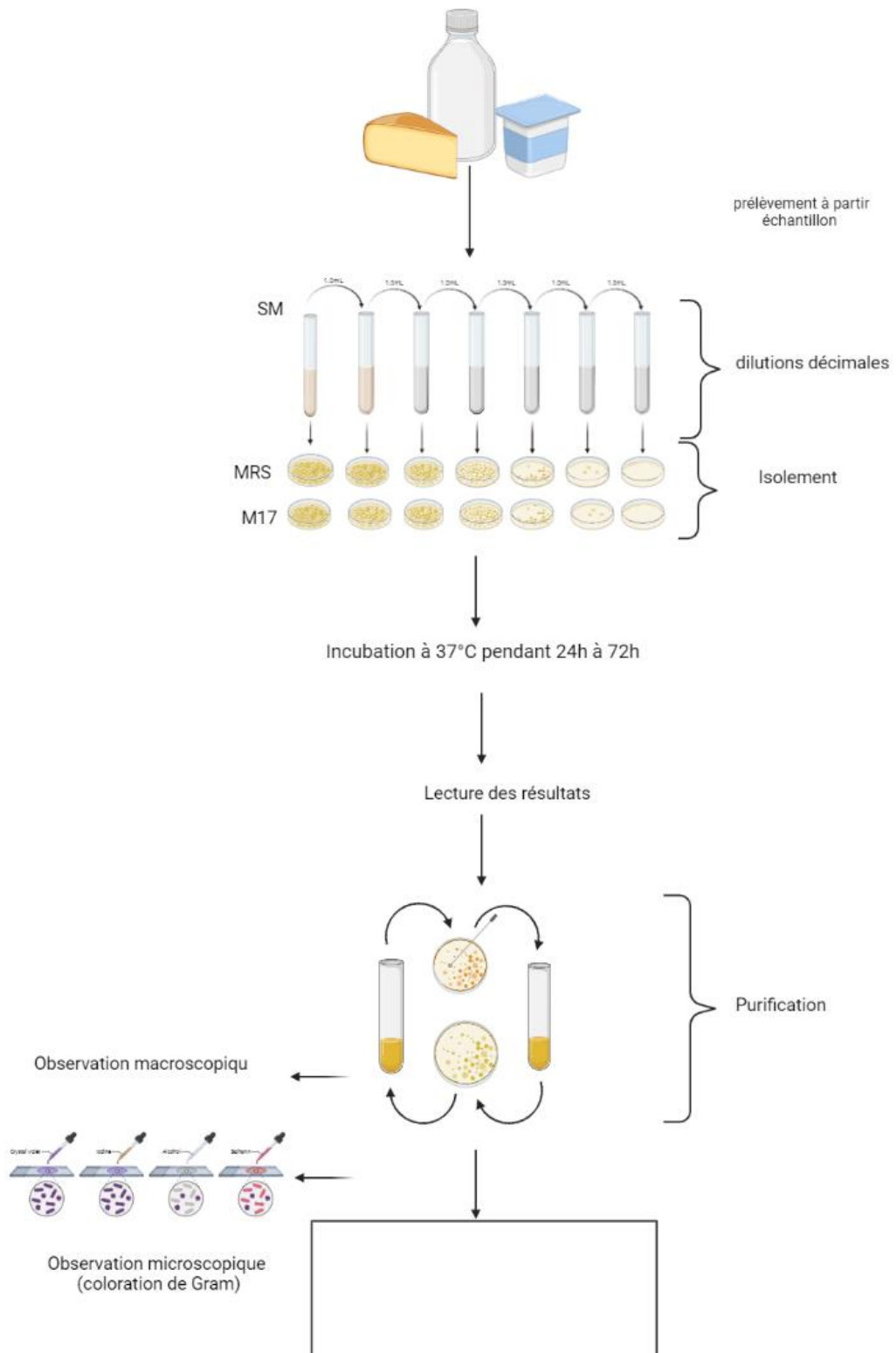
Un examen microscopique est effectué après coloration de Gram. La forme des cellules et leur mode d'association sont observés et notés. Les isolats à Gram (+) et catalase (-) sont repiqués de façon alternée sur milieu MRS liquide et solide (ou M17 liquide ou solide) jusqu'à la purification. A chaque fois, 7 à 10 colonies représentatives bien isolées sont prélevées du milieu MRS solide ou M17 solide et transférées sur MRS liquide ou M17 liquide et vice versa. La pureté de la souche est vérifiée par une observation microscopique [l'aspect des colonies (forme, couleur, taille)].

6. Conservation des souches :

6.1. A courte terme : la conservation des souches pures sont effectuée sur milieu solide incliné. Après croissance à la température optimale, les cultures sont maintenues à +4°C et leur renouvellement se fait par repiquage toutes les 4 semaines (**Devoyod et Muller, 1969**).

6.2. A long terme : A partir des cultures jeunes (18-48 h) sur milieu liquide, les cellules sont récupérées par centrifugation à 4000 t/min pendant 10 min. Une fois le surnageant éliminé, on ajoute le milieu de culture de conservation sur le culot. Le milieu de conservation contient du lait écrémé, 0,2% d'extrait de levure et 30% de glycérol. Les cultures sont conservées en suspension dense et en tubes eppendorf à -20°C. En cas de besoin, les cultures sont repiquées dans le lait écrémé à 0,5% d'extrait de levure, avant utilisation (**Saidi *et al.*, 2004**).

Matériel et méthodes



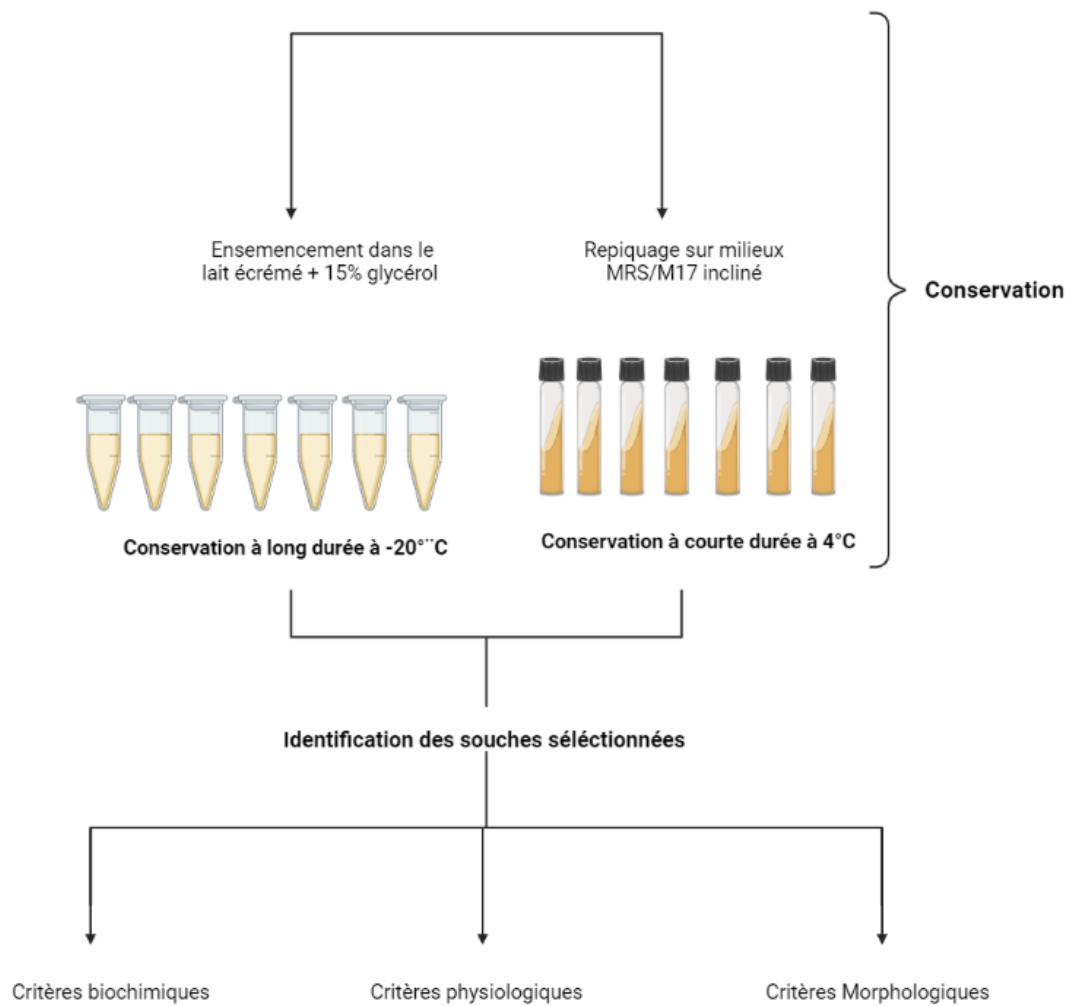


Figure 12 : schéma utilisé pour l'isolement et l'identification des bactéries lactiques.

7. Identification des isolats :

7.1. Pré-identification (tests morphologiques)

7.1.1. Observation macroscopique

Cette étude est basée sur l'observation des isolats cultivés sur gélose MRS/M17 cela permettra de caractériser la taille, la forme et la couleur des colonies (**Badis *et al*, 2005**).

7.1.2. Observation microscopique (coloration de gram)

Les isolats ont été soumis à la coloration de Gram (Voir l'annexe 03), Cette étude permet de distinguer les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif, les coques, les bâtonnets et le mode de regroupement (**Singleton *et al*, 1999**).

7.2. Identification partielle des souches sélectionnées (Tests physiologiques, biochimiques) :

7.2.1. Tests physiologiques

7.2.1.1. Test de croissance à différentes températures :

Les souches jeunes bactériennes ont été inoculées dans des bouillons MRS/M17 (pH 6,8) et testées leurs croissances à différentes températures (04, 30, 37 et 45 C°). Le développement des souches a été évalué après une semaine d'incubation pour les cultures à 04 C° et après 24/72 heures pour les autres cultures, par comparaison avec un tube de milieu MRS/M17 liquide non ensemencé (Témoin). L'apparition de trouble indique la croissance des souches (examen de la turbidité).

Ce test est important car il permet de différencier les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles (**Larpen, 1996**).

7.2.1.2 Test de croissance à différentes concentration de NaCl

Ce test permet de savoir si les bactéries ont la capacité de croître dans un milieu hypersalé, ce qui permet de différencier les entérocoques et les cocci. La méthode se résume à ensemencer des souches dans des tubes de milieu MRS/ M17 à 4% et 6,5% de NaCl après une incubation à 37°C pendant 24/ 72 heures. La croissance de ces bactéries se manifeste par un trouble du milieu (**Hassaine, 2013**).

7.2.1.3. Test de la thermo résistance

Des tubes contenant 10 ml de bouillon MRS/M17 sont ensemencés par les souches isolées, ensuite les tubes sont placés dans un bain marie à 63,5°C pendant 30 minutes. Après refroidissement, ils sont incubées à 37°C pendant 48/72h. La croissance de ces bactéries se manifeste par un trouble du milieu (**Badis et al., 2005**).

7.2.2. Tests biochimiques

7.2.2.1. Test d'amylase

L'amidon est une macromolécule glucidique. C'est un polymère de glucose (enchaînement de glucose). Ce milieu permet après culture de mettre en évidence la capacité de la bactérie à dégrader ce substrat l'amidon. Cela équivaut à déterminer si elle possède une enzyme spécifique (l'amylase). Ensemencer les souches lactiques dans le MRS/M17gélose contenant l'amidon (à base de 1,5 g/l), et on incube à 37°C pendant 72 heures. Après incubation, l'ajout de lugol (contenant du di-iode) sur les boites permettra de mettre en évidence la présence ou non d'halos d'éclaircissement autour des colonies et donc sa dégradation. Dans ce cas on dira que la bactérie possède l'amylase (**Guirraud, 1998**).

Matériel et méthodes

7.2.2.2. Croissance sur le lait bleu de sherman :

On vérifie le développement en présence 1 % et 3 % de bleu de méthylène. On ensemence dans le lait écrémé additionné de 0,1 % et 0,3 % de bleu de méthylène (1 ml de solution à 1 % et 3 % par tube de 9 ml de lait), ensuite l'incubation à 37 °C pendant 24/48 h (Menad, 2017).

7.2.2.3. Test de production d'acétoïne (VP/RM) :

La recherche de l'acétoïne est testée par la réaction de Voges Proskauer (VP) (Harrigan et McCance, 1976; Zourari *et al.*, 1991; Facklam et Elliot, 1995).

Les souches sélectionnées sont ensemencées dans des tubes contenant chacun 5 ml de milieu Clark et Lubs à l'aide d'une anse, On incube à 37°C pendant 18/48 h,

Après l'incubation, on ajoute trois gouttes de réactif VP1 (Solution de soude NaOH à 16% dans l'eau distillée) et le même volume du réactif VP2 (alphanaphtol à 6% dans l'alcool à 95°). On Agite soigneusement les tubes et on attend un temps au moins 10 min pour observer les résultats.

7.2.2.4. Hydrolyse de l'arginine (ADH) :

Pour chaque isolat ensemencé, il a été mis en évidence sur un milieu de Moëller; un tube de bouillon Moëller arginine et un tube témoin (Moëller sans arginine) recouvrir le milieu avec 4 à 5 mm d'huile de paraffine (V/V) stérilisé. On incube de 2 à 6 jours à 37°C la culture dans le tube témoin se manifeste par un virage au jaune dû à l'acidification du milieu (métabolisme du glucose). La dégradation de l'arginine aboutissant à la formation d'ammoniaque est révélée par alcalinisation du milieu qui devient violet (Larpen-Gourgau *et al.*, 1997; Carr *et al.*, 2002).

7.2.2.5. Test de production de CO₂ à partir du glucose :

Ce type permet de distinguer les bactéries lactiques comme homo ou hétérofermentaires. Les souches sont ensemencées dans des tubes contenant MRS/M17 liquide, avec une cloche de Durham. Après incubation à 37°C pendant 24 à 48 heures, la production de CO₂ se traduit par une présence de gaz dans la cloche (Hariri *et al.*, 2009).

7.2.2.6. Test de croissance sur bile 2% :

2 g de bile sont dissoutes dans 100 ml d'eau distillée et autoclavée 15 mn à 115°C. 0,5ml de cette solution sont ajoutés à 10ml de MRS liquide. Après inoculation avec les souches, l'incubation se fait à 37°C pendant 48 h.

La croissance dans le milieu contenant la bile se traduit par la présence du trouble (Bahloul, 2019).

Matériel et méthodes

7.2.2.7. Test de fermentation des sucres :

Ce test a été réalisé sur milieu MRS-Cys sans extrait de viande + pourpre de bromocrysol (BCP) comme indicateur de pH.

Le glucose du milieu est remplacé par le sucre à tester : cellobiose, glucose, galactose, mannose, saccharose, maltose. Les solutions sucres sont préparées à 20 % et stérilisées et mise au bain marie pendant 10 min.

Une plaque d'Elisa 96 puits est utilisée. Les puits de chaque ligne contiendront une source de carbone qui sera utilisée par les souches sélectionnées.

Une culture jeune de 24h des souches a été préparée, à l'aide d'une anse de platine on racle les colonies bien isolées puis les additionner à 5 ml du MRS BCP-EV pour former la solution bactérienne servant à ensemercer les puits. On dépose 10 µl de chaque sucre dans les puits de la plaque dans des conditions stériles puis ajouter 200µl de la solution bactérienne préparée au-dessus. Les préparations sont recouvertes de 50µl de l'huile de paraffine stérile afin d'obtenir l'anaérobiose. Les plaques d'Elisa sont incubées en anaérobiose pendant 24-48 h à 37°C.

On dépose dans certains puits seulement le sucre + MRS BCP-EV pour éviter des faux résultats.

Le milieu MRS BCP-EV sans sucre a été utilisé comme un témoin négatif et la fermentation du glucose a été incluses comme un résultat positif.

La lecture des résultats se fait après 24 et 48 heures d'incubation. La fermentation des sucres est révélée par le virement de l'indicateur le (BCP) du violet au jaune.

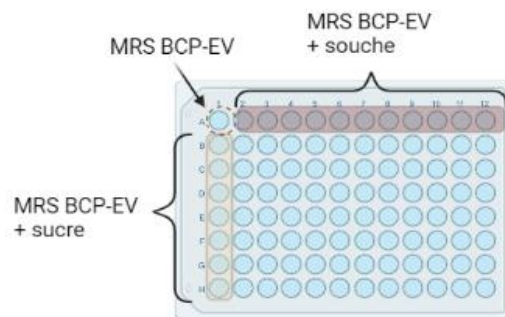


Figure 13 : Plaque d'Elisa 96 puits pour la fermentation

8. Identification des souches sélectionnées par la galerie API :

Le système API® BioMérieux (Appareillage et Procédé d'Identification) est une version miniaturisée et standardisée des techniques biochimiques conventionnelles pour l'identification des bactéries. Lorsqu'une suspension bactérienne de densité convenable est répartie dans les différentes alvéoles qui composent la micro galerie (contenant de substrats déshydratés), les métabolites produits durant la période d'incubation se traduisent par des changements de couleur spontanés ou révélés par addition de réactifs.

Les galeries API utilisées sont :

API 20 Strep : Identification des Streptocoques et apparentés en 4 ou 24 heures

Api 20 A : Identification des anaérobies

8.1. Préparation de la galerie

Chaque galerie comprend 20 microtubes contenant des substrats déshydratés

- Préparer une boîte d'incubation (fond et couvercle).
- Répartir environ 10 ml d'eau distillée ou déminéralisée dans les alvéoles du fond pour créer une atmosphère humide.
- Sortir la galerie de son emballage, et inscrire la référence de la souche sur la languette de la galerie.
- Les déposer dans le fond de la boîte d'incubation.

8.2. Préparation de l'inoculum

- Vérifier la pureté de la souche.
- Prélever la bactérie à partir d'une culture jeune de 18/24H
- Réaliser une suspension bactérienne dense dans 10ml d'eau physiologique stérile

8.3. Inoculation de la galerie

- Introduire la suspension bactérienne dans chaque tube à l'aide d'une micropipette en utilisant des embouts stériles.
- Pour les caractères soulignés ADH, LDC, ODC, H₂S, URE, ensemercer le tubule par la suspension et la cupule par l'huile de vaseline stérile.
- Pour les caractères encadrés VP, CIT, Gel, ensemercer le tubule et la cupule par la suspension.
- Pour les caractères non encadrés, non soulignés ensemercer uniquement le tubule par la suspension.

Matériel et méthodes

- Refermer la boîte d'incubation et la placer à 37°C pendant 18 à 24 heures (BioMérieux SA) (**Debabza, 2014**).

Remarque : il est important de veiller à ne pas créer de bulles lors de l'inoculation qui pourraient fausser le résultat. De plus l'apparition de bulles après incubation apportera un caractère d'identification supplémentaire.

8.4 Lecture de la galerie

- Lire après 24/48 heures d'incubation.
- Noter les résultats sur la fiche de résultats.
- Réaliser les tests nécessitant l'addition de réactifs : Test VP, TDA, IND, Nitrate réductase...

8.5. Interprétation

Le profil biochimique ainsi obtenu peut être identifié à partir de la base de données à l'aide du logiciel d'identification apiwebTM.

9. Etude de quelques effets probiotiques :

9.1. Test de croissance à différentes pH :

Une série d'essais a été réalisée sur le milieu MRS/M17 liquide avec un pH de 4,5, 6,5 et 9,3 avec incubation à 37°C pendant 24 heures. La croissance de ces bactéries se traduit par un trouble du milieu (**Badis et al., 2005**).

9.2. Test de croissance à concentration de bile

Préparation des solutions biliaires

Des différentes concentrations de bile sont préparées 0.2%, 0.5% dans du milieu MRS-M17. Les solutions sont préparées dans des tubes de 9 ml stérilisés et conservées à température ambiante avant leur utilisation. Par la suite, 1ml de la culture jeune de chaque souche testée est transféré dans les tubes contenant les solutions des sels biliaires puis effectuer des dilutions 10^{-1} jusqu'à 10^{-8} ; les trois dernières dilutions sontensemencées dans une gélose MRS-M17 en masse suivi d'incubation à 37°C pendant 48h .les tubes 10^{-1} de chaque souche sont incubés à 37°C pour 3h, le dénombrement est effectué aussi après 3hd'incubation.

D'autres concentrations de bile ont été préparées 3% et 5% dans un milieu MRS-M17gélisé avec une agitation manuelle, puis couler les boites ; après solidification ; l'ensemencement en surface est effectué à l'aide d'une anse de platine. Les boites de Pétri sont incubées à 37 °C .La résistance aux sels biliaires est exprimée par la présence ou l'absence des colonies (**Bahloul, 2019**).

9.3. Etude de l'activité antibactérienne

Méthode directe

Cette étude est réalisée par la méthode de culture en touche (Méthode de Fleming *et al.*, 1975)

L'activité antimicrobienne de nos souches a été évaluée sur milieu solide selon la méthode de culture en touche (**Fleming *et al.*, 1975**). A partir des pré-cultures de souches lactiques sélectionnées obtenues après 18 heures d'incubation à 37°C, 5µl sont ensemencées sous forme de spots sur gélose MRS. La boîte Pétri est laissée à sécher, à moitié ouverte, devant un bec benzen pendant 30 minutes. L'incubation se fait à 30°C durant 24 heures. Après incubation, la surface de la gélose est recouverte par 10ml de gélose nutritive semi solide (0.75% d'agar) inoculée par 1ml d'une pré-culture de 18h de chaque souche pathogène testée. L'incubation se fait pendant 24h à 37°C. L'observation se fait en vue de détecter les zones d'inhibition autour des spots et leur diamètre est mesuré.

Méthode indirecte

Cette étude est réalisée par la méthode des puits (méthode de Barefoot et Kaenhammer, 1983)

Cette méthode est réalisée sur les bactéries lactiques inhibitrices possédant les plus grande zones d'inhibition montrant la présence de substances inhibitrices, ces substances peuvent diffuser dans un milieu de culture solide. Les bactéries lactiques sont repiquées dans du milieu MRS ou M17 liquide et incubées pendant une période de 18h à 30°C. Après incubation une centrifugation réfrigérée (4°C) est réalisée à 4000 tr/min pendant 15 min. Des puits de 5 mm de diamètre sont creusés stérilement à l'aide d'un emporte -pièce (cloche de Durham) sur la gélose nutritive inoculé par la souche indicatrice (pathogène) et seront remplies avec 100 µL du surnageant de culture ou d'extrait cellulaire.

Les boîtes de Pétri sont mises à une température de +4°C/4h pour permettre la bonne diffusion de la substance antibactérienne (**Doumandji *et al.* , 2010**). Les boîtes sont incubées à 37°C et la présence de zones d'inhibition formées autour des puits est examinée après 24h d'incubation (**Hwanhlem *et al.*, 2011**).

Matériel et méthodes

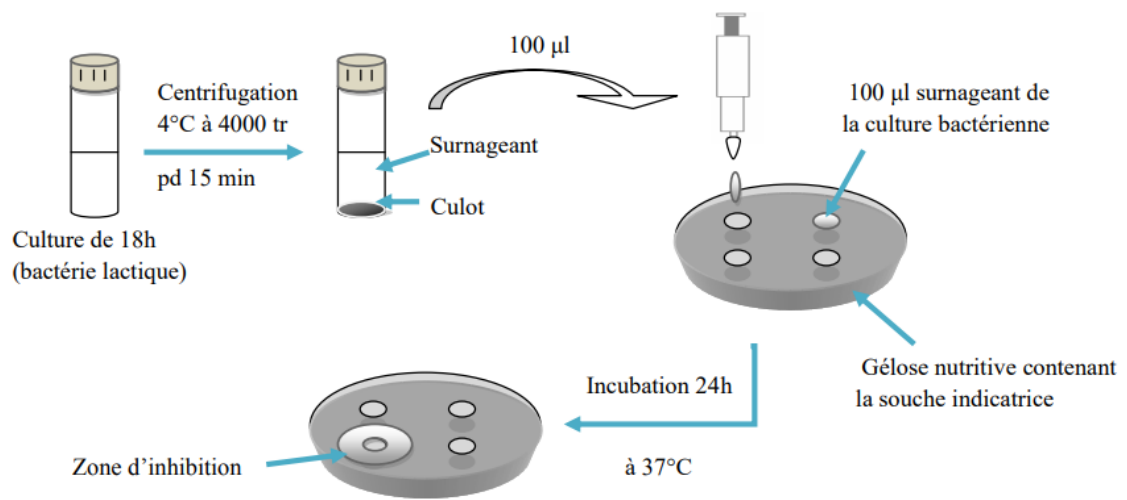


Figure 14: Méthode des puits (méthode de Barefoot et Kaenhammer, 1983)

Résultats et Discussion

Résultats

Un échantillonnage a été effectué à partir de Lben, Zebda et fromage frais. Au total, 18 isolats ont été obtenus à partir des échantillons analysés

Dans notre étude, nous sommes particulièrement intéressés aux bactéries lactiques qui exhibent les caractéristiques suivantes : Gram + et catalase -.

A l'issue d'une première identification macroscopique, microscopique et biochimique, 5 isolats appartenant aux bactéries lactiques (Gram positif, catalase négative, immobiles et se présentant sous forme coques ou bacilles) ont été retenus

1. Echantillonnages

Tableau 07 : Les caractéristiques d'échantillons

L'échantillon	Zebda	Lben	Fromage frais
Origine d'échantillon	Mostaganem-Khierddine	Mostaganem-Khierddine	Mostaganem
Date de fabrication	12.02.2023	12.02.2023	
Date de prélèvement	14.02.2023	14.02.2023	14.02.2023
pH	5.19	4.47	6.2
Température de conservation	4°C	4°C	4°C
Matière de production	Lait de vache	Lait de vache	Lait de vache
Observation	Matière très molle, couleur jaune	Matière liquide Couleur blanche	Matière très molle, couleur blanche

2. Isolement et purification des souches lactiques

Sur un milieu solide

L'observation directe des colonies sur le milieu solide MRS / M17 après 24 heures d'incubation, on le même aspect, forme et taille

Sur un milieu liquide

Après 24 heures d'incubation, on observe une apparition d'un trouble fumeux homogène au fond du tube dans le milieu liquide MRS / M17, accompagné d'une zone claire d'une épaisseur de 5 mm en surface du milieu liquide

3. Identification des isolats sélectionnés

3.1. Pré-identification (test morphologiques)

3.1.1. Observation macroscopique

Un ensemble de cinq souches a été isolé et purifié sur un milieu MRS ou M17.

En effet les colonies observées sont de petites colonies d'environ 1 à 3 mm de diamètre, de forme circulaire, de coloration blanchâtre avec un aspect lisse et crème et de contour régulier et irrégulier.

Résultats et discussion

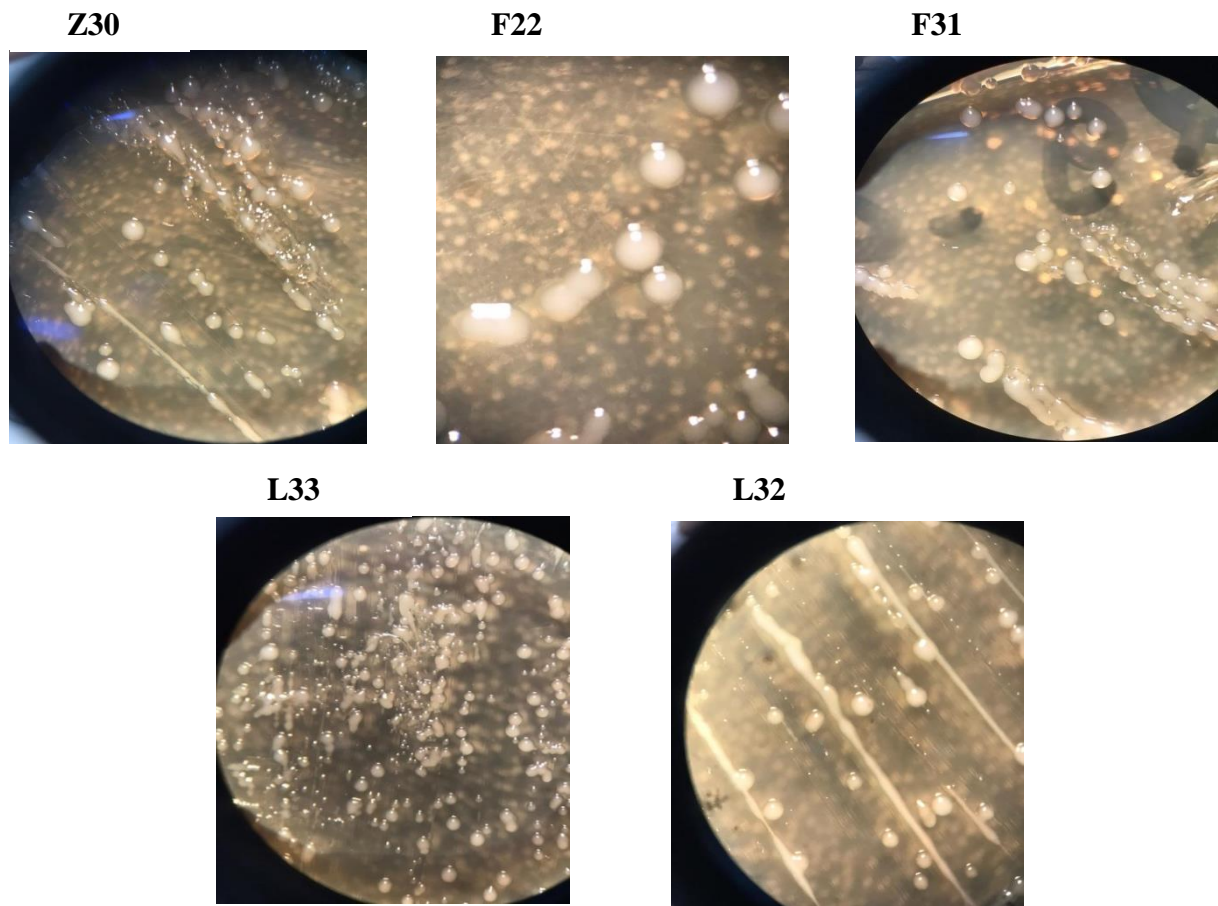
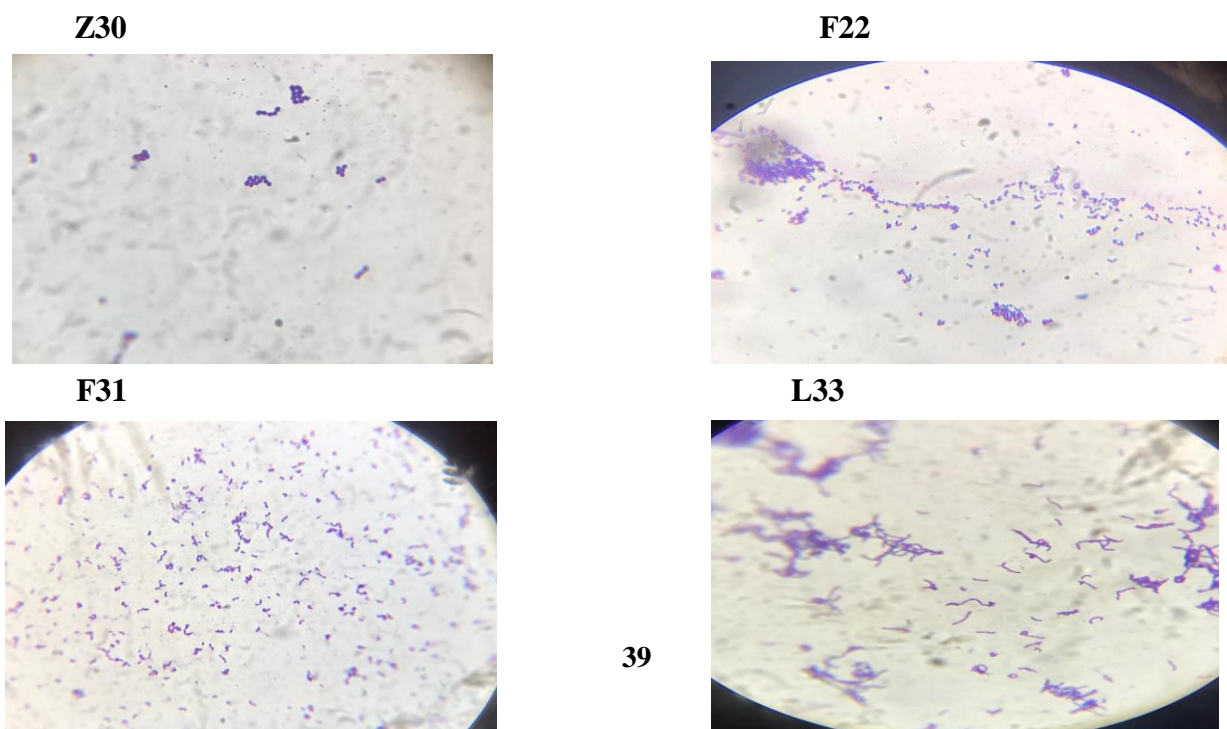


Figure 15: Aspect macroscopique des isolats sur milieu MRS et M17 solide.

3.1.2. Observation microscopique (coloration de Gram)

Seuls les isolats à Gram positif ont été sélectionnés avec leurs aspects microscopiques ont révélées trois formes de cellules : cocci, bacilles et coccobacilles. Pour les cocci et les coccobacilles sont disposé soit en paire, diploïde ou en courte chaînette, tandis pour les bacilles sont en longue chaînette



Résultats et discussion

L32

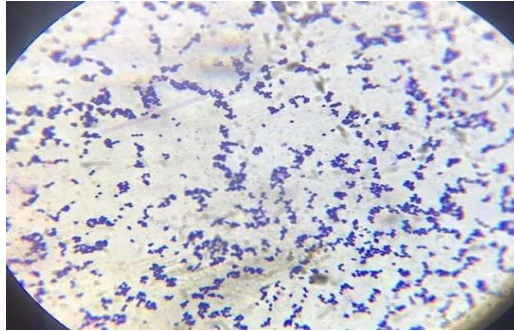


Figure 16 : Observation microscopique des souches lactiques après coloration de Gram (Gx100)

Tableau 08 : Différent aspects macroscopiques et microscopiques

Souche	Aspect macroscopique	Aspect microscopique
Z30 (Zebda)	Petite colonie de diamètre de 1 à 2 mm Blanchâtre et crème à surface lisse et contour régulier.	Des cocci associé en chaînette, en amas et en diploïdes.
F22 (Fromage frais)	Petite colonie de diamètre de 1 à 2 mm Blanchâtre et crème à surface lisse et contour régulier.	Des cocobacilles associée en amas, en chaînette.
F31 (Fromage frais)	Petite colonie de diamètre de 1 à 3 mm Blanchâtre à surface lisse et contour régulier.	Des cocci associé en diploïdes et en chaînette.
L33 (Lben)	Petite colonie de diamètre de 1 à 3 mm Blanchâtre et crème à surface lisse et contour irrégulier.	Des bacilles associés en chaînette.
L32 (Lben)	Petite colonie de diamètre de 1 à 2 mm Blanchâtre et crème à surface lisse et contour régulier .	Des cocci associé en chaînette et diploïde.

3.2. Identification biochimique et physiologique

Tableau 09 : Résultats des tests biochimiques et physiologiques

Les souches		Z30	F22	F31	L33	L32
Les Tests						
Test de croissance à différentes température	4°C	-	+	-	+	-
	30°C	+	+	+	+	+
	37°C	+	+	+	+	+
	45°C	-	-	+	+	+

Résultats et discussion

Test de croissance à différentes NaCl	4 %	+	+	+	+	+
	6,5%	+	+	-	+	-
Test de thermorésistant		+	-	-	-	+
Test de catalase		-	-	-	-	-
Test d'amylase		+	-	-	-	+
Croissance sur le lait de sherman	1%	+	+	+	+	+
	3%	+	+	+	+	+
Test d'acétoïne	VP	+	-	+	-	+
	RM	-	+	-	+	-
Hydrolyse de l'arginine ADH		-	+	+	+	+
Croissance sur la bile 2 %		+	+	+	+	+
Type de fermentation		Hétéro	Hétéro	Homo	Hétéro	Homo
Test de fermentation des sucres	Cellulose	+	+	+/-	+	-
	Saccharose	+	+	+	+	+
	Galactose	+	+	-	+	-
	Mannose	+	+	-	+	-
	Glucose	+	+	+	+	+
	Maltose	+	+	+	+	+

Résultats et discussion

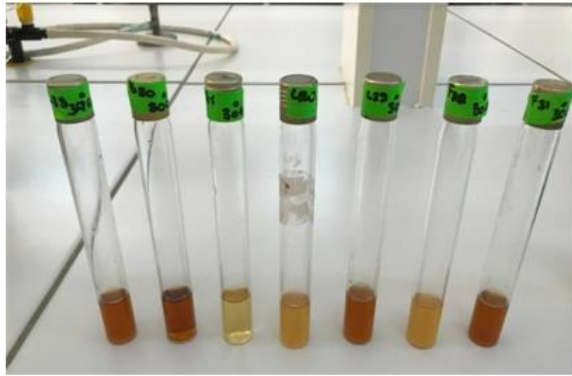


Figure 17 : Croissance à température 30°C



Figure 18 : Croissance à différentes concentrations NaCl 4%, 6.5%

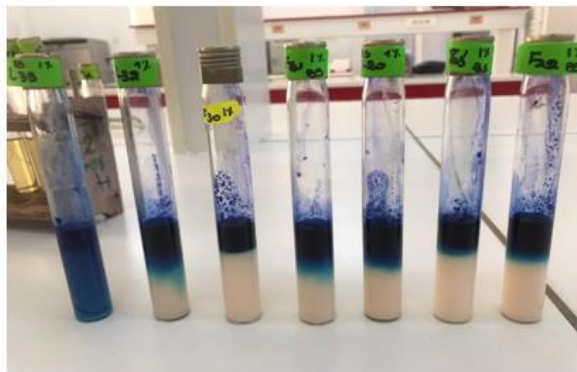


Figure 19 : Croissance en milieu lait de Sherman 1 %

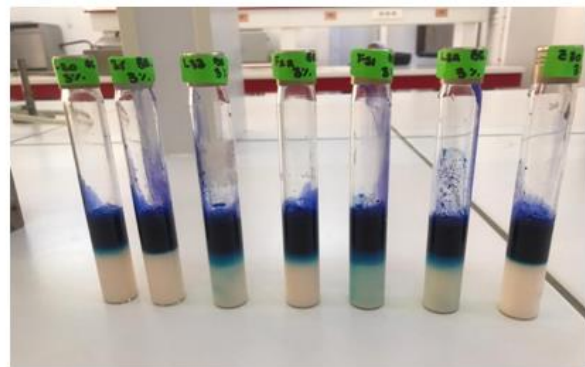


Figure 20 : Croissance en milieu lait de Sherman 3 %



Figure 21 : Résultat d'hydrolyse d'arginine



Figure 22: croissance sur la bile 2%



Figure 23 : Type de fermentation

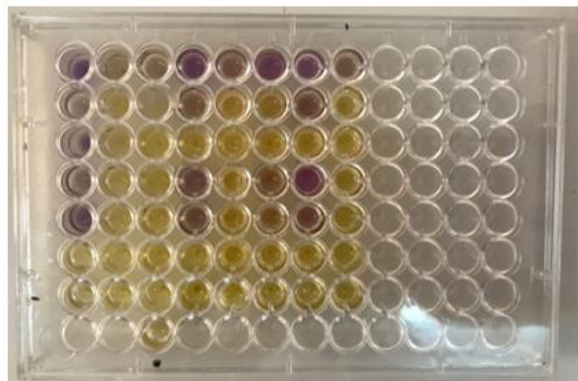


Figure 24 : Type de fermentation des sucres

Résultats et discussion

4. Identifications des isolats par la galerie Api

Tableau 10 : Résultat de la galerie Api 20 Strep (La souche L32)

Tests	VP	HIP	ESC	PYRA	α GAL	β GUR	β GAL	PAL	LAP	ADH
Résultat	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
Tests	RIB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF	AMD	GLYG
Résultat	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-

Tableau 11: Résultat de la galerie Api 20 Strep (La souche Z30)

Tests	VP	HIP	ESC	PYRA	α GAL	β GUR	β GAL	PAL	LAP	ADH
Résultat	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+
Tests	RIB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF	AMD	GLYG
Résultat	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tableau 12 : Galerie Api 20 A : (La souche F22)

Tests	IND	URE	GLU	MAN	LAC	SAC	MAL	SAL	XYL	ARA
Résultat	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Tests	GEL	ESC	GLY	CEL	MNE	MLZ	RAF	SOR	RHA	TRE
Résultat	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+



Figure 25 : Résultats de la galerie Api

5.Repartition et l'identification des souches :

Selon les caractéristiques morphologiques, physiologiques et la fermentation des sucres et en ce référant du schéma général de différenciation des genres appartenant aux bactéries lactique (Carr *et al.*, 2002) (fig 26) et d'après l'utilisation de la Galerie API 20 strep et 20A nos souches bactériennes isolées à partir de trois produits laitiers différents peuvent être apparentées probablement au genres : *Lactobacillus* (L33), *Leuconostoc* (Z30), *Lactococcus* (F31 et L32) et *Bifidobactérium*(F22).

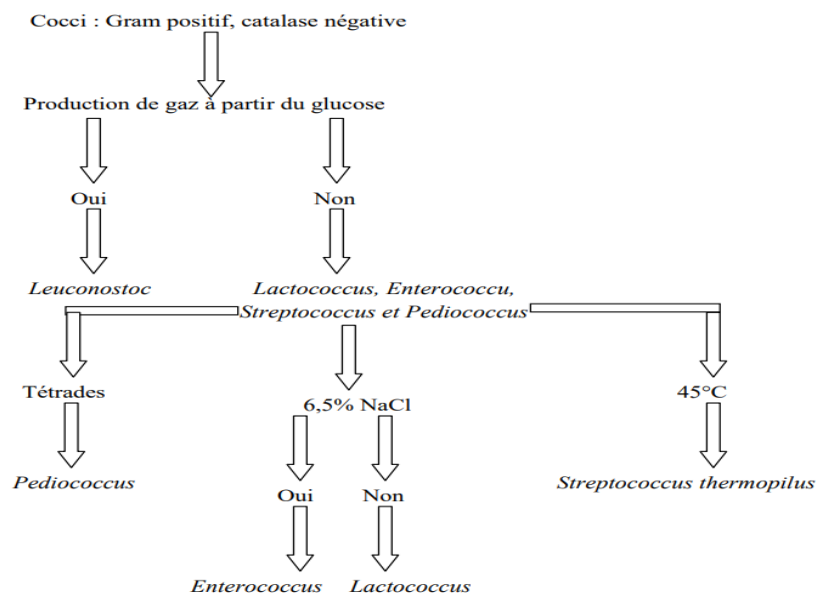


Figure 26: Schéma de différenciation entre les bactéries lactiques (Carr *et al.*, 2002).

6. Etude de quelques effets probiotiques

Tableau 13 : Résultats de quelques effets probiotiques

Les souches		Z30	F22	L33	L32	F31
Test de croissance à différents pH	4.5	-	+	+	+	+
	6.5	+	+	+	+	+
	9.3	+	+	-	-	+
Préparation des solutions biliaires	0,5%	10 ⁻¹	-	-	-	-
		10 ⁻⁶	+	+	+	+
		10 ⁻⁷	+	+	+	+
		10 ⁻⁸	+	+	+	+

Résultats et discussion

	0,2%	10 ⁻¹	-	-	-	-	-
		10 ⁻⁶	/	-	/	+	+
		10 ⁻⁷	+	-	-	+	+
		10 ⁻⁸	+	+	+	+	+
	3%	-	-	-	-	-	
	5%	-	-	-	-	-	

6.2. Etude de l'activité antimicrobienne des souches isolées

Méthode directe

Tableau 14 : Tableau : Zones d'inhibition des souches à effet antagoniste

Souches cibles	Les isolats tests (ayant une activité antibactérienne) en mm				
	Z30	F22	F31	L33	L32
<i>Staphylococcus aureus</i>	20	30	29	25	23
	20	25	/	25	15
	/	11	/	9	20
<i>Escherichia coli</i>	30	35	25	22	25
	25	28	15	21	15
	15	19	20	20	22

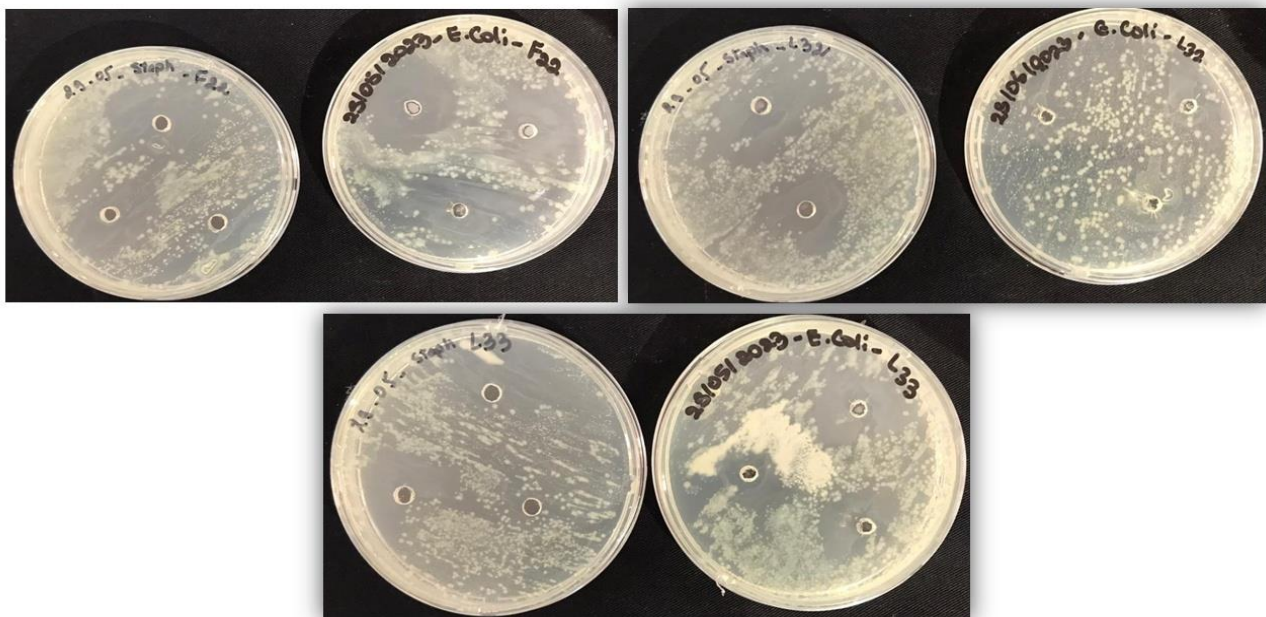


Figure 27: Zone inhibition des souches pathogènes par les souches lactiques (méthode directe)

Méthode indirecte

Tableau 15 : Zones d'inhibition des souches sécrétant une substance antibactérienne en mm

Souches cibles	Les isolats tests (ayant une activité antibactérienne)				
	Z30	F22	F31	L33	L32
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	16	1	4	18
	12				8
	18				
<i>Escherichia coli</i>	4	6	3		

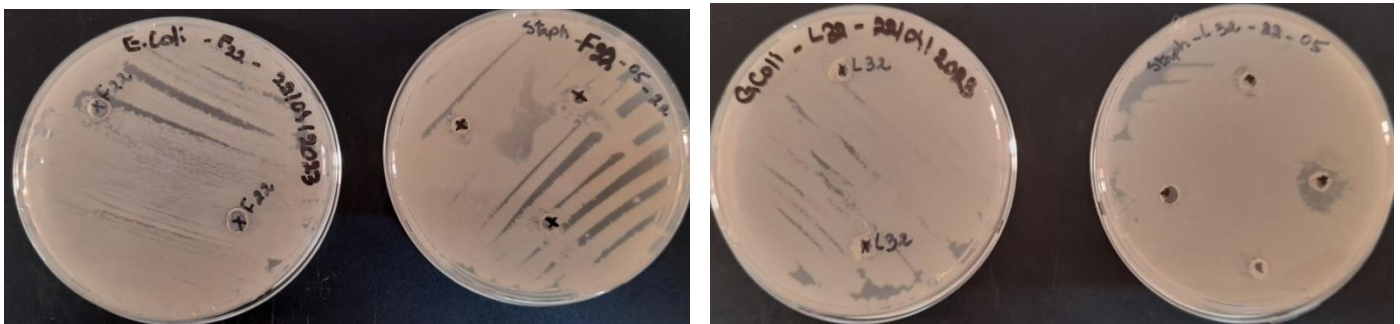


Figure 28 : Zone inhibition des souches pathogènes par les souches lactiques (méthode indirecte)

Discussions

1. isolement et identification des isolats

Cinq souches ont été extraites et purifiées à partir de produits laitiers traditionnels en utilisant le milieu MRS pour favoriser la croissance de *Lactobacillus*, *Pediococcus* et *Leuconostoc* et le milieu M17 pour permettre la croissance de *Lactococcus*, *Enterococcus* (Dworkin *et al.*, 2006).

En observant macroscopiquement les colonies obtenues après incubation sur milieu solide, il est possible de les décrire en les comparant aux critères spécifiques des colonies des bactéries lactiques. (Contour, taille, pigmentation, aspect...) (Ana Belen Florez *et al.*, 2006).

L'observation de la morphologie des isolats permet de distinguer les genres tels que *Lactobacillus*, *Carnobacterium* et certaines espèces de *Weissella* qui présentent une forme en bacille, des autres genres. En ce qui concerne les cocci, ils se présentent sous forme de diplocoques, de chaînettes ou de grappes, ce qui exclut les genres *Pediococcus*, *Aerococcus* et *Tetragenococcus* qui forment des tétrades.

L'apparence de la souche Z30 nous permis de dire que notre souche appartient au genre *leuconostocs*. Selon Devoyod et Poullain, 1988, Dans l'industrie laitière *Leuconostoc* fait partie de la microflore de la plupart des aliments comme le lait et

Résultats et discussion

les produits laitiers fermentés. Elles entrent couramment dans la composition de levains utilisés pour la fabrication de nombreux produits laitiers.

Les *Leuconostocs* ne produisent pas l'acétoïne, n'hydrolysant pas l'arginine, développant à 37°C, présence une croissance à 6,5% NaCl, la plupart des souches hydrolyse l'esculine (Novel G., 1993 ; Larpent J-P., 1996 ; Larpent G.M. et al., 1997 ; Badis, A. et al., 2004 ; Bjökroth J. et Holzapfel W., 2006 ; Ogier J.-C. et al., 2008). Ce qui était le même cas pour la souche Z30.

D'après Devoyod et Poullain en (1988) la mise en évidence en 1918 par Evans de la production de CO₂ à partir du glucose par les *Leuconostoc*, distingue le caractère hétérofermentaire. Toutefois, il le partage avec les genres *Weissella* et *Oenococcus*. (Dworkin et al., 2006). Les tests phénotypiques utilisés ne peuvent pas distinguer *Leuconostoc* de *Weissella*. Par ailleurs, il s'avère que les *leuconostocs* sont fréquemment associés au lait et aux produits laitiers que *Weissella* (Dworkin et al., 2006).

La comparaison du profil fermentaire de ces souches avec le profil fermentaire décrit par En Devoyod et Poullain en 1988 on trouve que nos souches appartient au l'espèce *Leuconostoc mesenteroides* subp *mesenteroides* puisque elle peut résister à 6.5% de NaCl et fermentent le galactose et le mannose.

Les souches F31 et L32 apparaissent comme des petites colonies de 1 à 2 mm de diamètre à contour régulier, de couleur blanchâtre, lisses et légèrement bombées.

Microscopiquement, elles sont des Gram positif, de forme cocci sphérique, associées en paires ou en chaines, Des résultats similaire sont obtenue par Teuber et Geis., 2006.

Selon les auteurs Stiles et Holzapfel, (1997) ; Teuber et Geis, (2006), Les lactocoques sont généralement des bactéries homofermentaires qui ne peuvent pas se développer à 45°C et en présence de 6,5% de NaCl. Cependant, au cours de cette étude, nous avons identifié une souche de lactocoques (L32, F31) qui présentait une particularité : elle ne pouvait pas se développer dans un milieu contenant 6,5% de NaCl, mais était capable d'hydrolyser l'arginine.

En ce référent aux travaux précédents et la galerie Api sa nous permis de classer nos souches au genre *lactococcus* et l'espèce *Lactococcus lactis* subsp *lactis*. Les mêmes résultats ont été apporté par Boudjerda et al., (2009).

Dans cette recherche nous avons identifié une seule *Lactobacillus* qui est la souche L33, D'après Lui et al., 2011 Les *lactobacillus* sont naturellement présents dans le lait et les produits fermentés. Ils sont couramment utilisés dans l'industrie

Résultats et discussion

alimentaire, surtout dans les fermentations lactières et végétales, grâce à leurs propriétés acidifiantes, aromatisantes et texturantes.

En ce réfèrent à l'observation macroscopique faite par (**Klein et al., 1998 ; Axelsson, 2004 ; Hammes et Hortel, 2006 ; Tabasco et al., 2009**) sur la souche de *Lactobacillus* développée sur milieu MRS (**Mann et Spoerry, 1974**), Des colonies de forme irrégulière et érodée, de couleur crème et d'un diamètre de 1 à 3 mm ont été obtenues. L'observation microscopique après coloration de Gram révèle la présence de bacilles apparents Gram positif.

Leur température de croissance optimale est souvent comprise entre 30 et 40°C bien que la température générale de croissance peut varier de 2 à 53°C; ils peuvent se développer sur un intervalle de pH allant de 3 à 8 (**Pot et al., 2014**).

En basant sur tous les travaux précédente et celle du **Prakash, 2011** la souche L33 appartient au l'espèce *Lactobacillus fermentum*.

L'observation microscopique de la souche F22 est Gram+ de forme cobacille qui est la forme typique au bifidobactéries (**Scardovi, 1986 ; Beerens, 1990; Tabasco et al, 2007**).

Les résultats ont démontré que la souche F22 fermente presque tous les sucres testés. cela se confère aussi par les travaux réalisés récemment par **Arboleya et al., 2018** ce qui était confirmé par le test de la fermentation des sucres et de la galerie Api.

En se référant aux travaux précédent et l'ensemble des résultats de la fermentation des différents sucres nous a permis de classier notre souche à l'espèce : *Bifidobacterium longum*.

2. Etude de quelques effets probiotiques

Pour qu'un microorganisme puisse être considéré comme un potentiel probiotique, il doit satisfaire à certains critères préalables. Tout d'abord, il doit être non pathogène en répondant aux aspects sécuritaires. En plus, il doit démontrer sa capacité à survivre et à se développer dans les conditions physiologiques du tube digestif, ainsi qu'avoir une bonne tolérance aux PH acides rencontré au niveau de l'estomac ainsi que les sels biliaires rencontrés au niveau du duodénum (**Dunne et al., 2001**).

Résultats et discussion

En se basant sur les études de **Maragkoudakis et al., 2006** les résultats du test de résistance à l'acidité ont montré que la résistance de tous les isolats. A pH 4 tous les cinq isolats ont donné une bonne croissance qui est une des caractéristiques importantes d'une bactérie lactique à effet probiotique.

Les souches testées ont toutes démontré une tolérance aux sels biliaires à des concentrations de 0,2% et 0,5%. De plus, elles ont non seulement survécu dans le milieu MRS solide contenant la solution de sels biliaires, mais ont également été capables de se développer. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus par **Bouzaine et al. (2004)**.

La production de composés antimicrobiens est l'une des caractéristiques importantes que les souches probiotiques doivent avoir afin de concurrencer et exclure les agents pathogènes présents dans le tractus intestinal et exprimer l'effet probiotique chez leurs hôtes (**Salminen et al., 1998; Collado et al., 2005**).

Toutes les souches bactériennes ont démontré un effet antagoniste envers *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. Cette interaction bénéfique se manifeste par l'apparition des zones d'inhibition (**Fleming et al., 1975; Barefoot et Kaenhammer, 1983; Tabak et al., 2007**).

D'après les résultats de test d'antagonisme on remarque que toutes les souches lactiques ont une activité antibactérienne importante envers *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*, dont l'intervalle des diamètres des zones d'inhibition entre 9 et 35 mm, ces résultats sont en accord avec les précédents travaux rapportés par **Musikasang et al. (2009)** et **Asguar et al. (2016)** et même Selon les travaux de **Labioui et al. (2005)** qui mentionne que la zone d'inhibition des bactéries lactiques sur ce microorganismes pathogène varie entre 22,5 et 31.5 mm. Ces valeurs sont presque similaires à nos résultats.

Les potentialités inhibitrices naturelles par des tests d'interaction entre les bactéries pathogènes et les isolats de bactéries lactiques nous ont permis de remarquer que le diamètre des zones d'inhibition varie selon l'espèce (**Prioult, 2003**).

Des résultats ont été démontrés par **Gyu et Hyung (2006)** ayant trouvé que parmi les souches isolées à partir Jeotgal aliment fermenté Coréen les souches

Résultats et discussion

Leuconostoc mesenteroides présentent des inhibitions contre *S. aureus* avec un diamètre de 22 mm et en ce réfèrent sur les études de **Bermudez-Brito et al., 2012** Les *bifidobacterium* possèdent une activité inhibitrice contre un grand spectre des bactéries pathogènes comme *E.coli*, *Salmonella*, *Helicobacter pylori*, *Listeria* et les rotavirus.

Les études précédentes confirment nos résultats puisque *leuconostocs* et *bifidobactérium* ont la plus grande capacité inhibitrice.

Ces bactéries résident donc dans leur capacité à acidifier les produits alimentaires. L'acide lactique, qui est le produit du métabolisme fermentaire, joue un rôle majeur dans la conservation des aliments car il exerce une forte inhibition sur la croissance des bactéries pathogènes (**Stiles, 1996**).

Conclusion

Conclusion

Les produits laitiers fermentés contenant des probiotiques sont appréciés depuis des siècles pour leurs avantages pour la digestion et la santé globale. Les bactéries lactiques, telles que *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, sont les principales souches probiotiques présentes dans les produits laitiers.

Dans notre étude, nous avons procédé à l'isolement de bactéries lactiques à partir de zebda, lben et de fromage frais provenant de la Wilaya de Mostaganem située à l'ouest de l'Algérie.

L'identification morphologique et biochimique ont révélé des coques appartenant probablement aux quatre genres *Lactococcus* (souche F31 et la souche L32), *Leuconostoc* (souche Z30), et des bacilles appartenant aux genres *Lactobacillus* (souche L33) et *Bifidobacterium* (souche F22), nos résultats ont été confirmés par l'utilisation des galeries API.

A travers cette étude ces bactéries lactiques ont montré une croissance dans des environnements légèrement acides avec un pH compris entre 4,5 et 6,5 et une croissance dans des solutions biliaires à des concentrations réduites. Cela est dû à leur adaptation à l'environnement acide de l'estomac et de l'intestin, où elles sont souvent présentes. Ces conditions acides favorisent la croissance et l'activité métabolique des bactéries lactiques, ce qui leur permet de se développer et de réaliser leur potentiel bénéfique pour la santé.

Le test des interactions entre les souches lactiques isolées et les souches pathogènes *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* ont révélé l'effet inhibiteur de nos souches vis-à-vis des souches cibles dont le diamètre vari entre 9mm à 35mm. Ce travail a permis de nous révéler que les souches lactiques ont quelques effets probiotiques.

La comparaison des résultats obtenus dans ce travail avec ceux des autres travaux sur des produits similaires, mais dans d'autres régions, 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.

Conclusion

Perspectives

- Identification génétique des souches en utilisant des méthodes moléculaires
- La recherche d'agent inhibiteur responsable de l'inhibition des bactéries pathogènes

Références bibliographiques :

A

Ahmed F.M.A ET Irene K.P. Tan., 2007. Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potential. *Bioresource Technology*, 98 ; 1380-1385.

Amensag, K. (2019). Les bactéries lactiques isolées d'aliments traditionnels marocains : Production de bactériocines et applications potentielles contre des pathogènes multirésistants aux antibiotiques. Thèse de doctorat, Université de UNIVERSITÉ DE STRASBOURG. 188p.

Axelsson, L. T.(1993). Lactic acid Bacteria: Classification and Physiology. P.164.in: Salminen S., Von, Wright A, Ed. in *Lactic acid Bacteria*, Marcel Dekker, Inc; New York, Etats- Unis.

Axelsson L; 2004. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology In *Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects*. Salminen S., Wright

B

Badis, A., Guetarni, D., Kihal, M., Quzrout. R. (2005). Caractérisation phénotypique des Bactéries lactiques isolées à partir de lait de deux populations locales Arabia et Kabyle. *Science et Technologie*, 23:30-37..

Bahloul, H. (2019). Caractérisation technologique des bifidobactéries isolées des différents écosystèmes. Thèse de doctorat, université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella, Faculté SNV, Oran. 140p.

Barrefoot S. F. et Klaenhammer T. R., (1984) Purification and characterization of lactobacillus acidophilus bacteriocin Lacticin B. *Antimicrobiology Agent Chemother*, 26(3).

Bellon O, 2011. "Les flores normales."

Belyagoubi, L. (2014). Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens. Thèse de doctorat, Université Aboubakr Belkaïd, Tlemcen. 209p.

Bendjedi, D. ; Barkati, N. (2021). Intérêt et importance biotechnologiques des probiotiques. Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi- B.B.A. 62p.

Bendimerad N., (2013). Caractérisation phénotypique technologique et moléculaire d'isolats de bactéries lactiques de laits crus recueillis dans les régions de l'Ouest Algérien. Essai de fabrication de fromage frais type «Jben. ». Thèse de doctorat, UNIVERSITE ABOUBEKR BELKAID ,FACULTE SNV/STU , Tlemcen. 255p.

Benkerroum, N. and Tamime, A.Y. (2004). Technology transfer of some Moroccan traditional dairy products (lben, jben, smen) to small industrial scale. *Food Microbiol.* 21: 399–314.

Benkerroum N. (2013). Traditional fermented foods of North African Countries: Technology and Food Safety Challenges with Regard to Microbiological Risks. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12: 54.

Bennia, M. ; Bedjaoui, C. (2022). Les probiotiques. Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A., Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers. 69p.

Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llrente, C., & Gil, A. (2012). Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 61(2), 160-174.

Bettache G., Adjoudj F., Hadadji M., Kihal M. (2012). Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Dhan, a Traditional Butter and Their Major Technological Traits. *World Applied Sciences Journal*, 17(4) : 480-488.

Bjorkroth J., Holzapfel W.H ; 2006. Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella* in : *The Prokaryotes*. Vol 4. Springer, pp 267-319.

Boudersa, W. ; Nekkaa, R. (2017). Etude de l'activité. Antibactérienne de bactéries lactiques isolées a partir d'un produit laitier fermenté : le yaourt brassé. Thèse de doctorat, Université des frères mentouri, Constantine, 84p.

Bouguerra, A. (2021). Evaluation du potentiel probiotique des souches lactiques isolées à partir du lait de chamelle. Thèse de doctorat, Université Ferhat Abbas, Sétif, 141p.

Bouvet, A.;Couvry, G. (1994). Identification des entérocoques en microbiologie clinique Identification of *Enterococcus* species in clinical microbiology. *ELSEVIER, Infectieuses*, Vol.24, P.132-140

Burcelin, R., S. Nicolas, et V., Blasco-Baque. (2016). « Microbiotes et maladies métaboliques De nouveaux concepts pour de nouvelles stratégies thérapeutiques ». *médecine/sciences* 32 (11): 952-60

C

Calvez. S ; Belguesmia. Y ; Kergourley. G.(2009). in bactériocines : de la synthèse aux applications in bacteries lactiques : physiologique , metabolisme,genomique et applications industrielles edition : Economica .2009. p 100-122.

Carr Frank J, Chill Don and Maida Nino (2002). The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28(4): 281-370

Chafai S., 2006. Effet de l'addition des probiotiques dans les régimes alimentaires sur les performances zootechniques du poulet de chair. Doctoral dissertation en Sciences Vétérinaires, Option : Nutrition. Université El-Hadj lakhdar-Batna. Faculté des sciences, département vétérinaire. 97p.

Coblin, M. (2020). L'implication du microbiote intestinal dans l'apparition des troubles dépressifs. Thèse de doctorat, université de Limoges. Faculté de pharmacie, 111p.

Codex Alimentarius. (1999). Norme générale pour l'utilisation de termes de laiterie CODEX STN 206-1999, p : 1-4.

Coppé, L. (2018). Dysbioses intestinales chez l'Homme : Causes, conséquences, prophylaxies et traitements. Thèse de doctorat, UNIVERSITE DE LORRAINE. Faculté de pharmacie, 152p.

Corrieu, G. & Luquet, F. M. (2008) Bactéries lactiques : De la génétique au ferment. Paris: Édition Tec et Doc p. 849.

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

D

Da Silva, S. (2013). Conséquences d'un stress chronique sur la barrière de mucus intestinal chez le rat : effet du probiotique *Lactobacillus farciminis*. Thèse de doctorat. Université Toulouse, Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, 303p.

DeGruttola, A. K., Low, D., Mizoguchi, A., & Mizoguchi, E. (2016). Current understanding of dysbiosis in disease in human and animal models. *Inflammatory Bowel Diseases*, 22(5), 1137- 1150.

De Vos P, Garrity G.M, Jones D, Krieg N.R, Ludwig W, Rainey F.A, Schleifer KH, 108

Whitmanet WB (2009). Genus *Lactobacillus*, *Bacillus* and *Listeria*. In : « Bergey's manual of systematic bacteriology - The Firmicutes » Vol 3. Springer éd., New York. pp.19-511

Devoyod J and Muller M (1969). La flore microbienne du fromage de Roquefort, III Les streptocoques lactiques et les leuconostoc, Influence de différents microorganismes de contamination Le Lait : 369-399.

Devoyod J. J., Poullain F., 1988. Les Leuconostocs Propriétés: leur rôle en technologie laitière. Le Lait. 68 : 249-280. INRA. Jouy-en-Josas, France.

Djenoub, L. , Mestar, K. , Meriai, O. (2005). Evaluation de l'activité probiotique de *Lactobacillus plantarium* «BJ0041» et *Pediococcus acidilactici* chez le poulet de chair. Mémoire de master, université de Jijel, Jijel, 110p.

Dolié, E., 2018. Toulouse (UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER Faculté DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES):s.n

Doumandji, A., Bousbia, N., Hellal, A. (2010). Effet anti-*Listeria* de *Bifidobacterium infantis* isolé à partir de selles de nourrisson allaité au sein. *Sciences et Technologies*, 31 : 14-21

Dribine, A., & Khellal, Y. (2018). Evaluation de l'activité antibactérienne de quelques souches de bactéries lactiques. Thèse de doctorat. Université de Bouira, 75p.

Drider D., Prevost H., 2009 - Bactéries lactique Physiologie, Métabolisme, Génomique et Application industrielle. Ed, Economica 49 rue Harica 75015 Paris :pp 381- 427.

Dworkin MM and Falkow S. Proteobacteria : Gamma subclass. Ed. Springer, New York, NY, 2006, p. 1248.

E

Eck A et Gillis JC. (2006). Le fromage. 3ème Edition : Tec et Doc, Lavoisier. Paris. 891p.

F

Facklam R and Elliot J.A (1995). Identification, Classification, and Clinical Relevance of Catalase-Negative, Gram-Positive Cocci, Excluding the Streptococci and Enterococci. Clinical Microbiol. Reviews., 8: 479-495

FAO/WHO, 2002. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario: s.n.

Faure, S., Pubert, C., Rabiller, J., Taillez, J., & Yvain, A. L. (2013). Que savons-nous des probiotiques?. Actualités Pharmaceutiques, 52(528), 18-21.

Favre, G. (2004), Prébiotiques et probiotiques, ont-ils un réel intérêt pour la santé ? Rôle du pharmacien dans leur conseil à l'officine, Université Joseph Fourier Faculté de Pharmacie de Grenoble.

Frédéric Barbut, Francisca Joly. Le microbiote intestinal: équilibre et dysbiose. Hépatogastro & Oncologie Digestive. 2010; 17(6):511-520

G

Gagliardi, A., Totino, V., Cacciotti, F., Iebba, V., Neroni, B., Bonfiglio, G., Schippa, S. (2018). Rebuilding the gut microbiota ecosystem. International journal of environmental research and public health, 15(8): 1679.

Garrity, G.M.; Holt, J.G.; 2001. Taxonomic outline of the Archaea and Bacteria. Pages :155- 166. In D.R. Boone, R.W. Castenholz (ed) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2ème ed, ed, Vol.1 (The Archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria). Springer. Verlage, New York

Gavin F., Pourcher, A.M., Bahaka, D., Freney, J., Romond, C. & Izard, D. (1990). le genre *bifidobacterium*. Classification, identification, aspects critiques. ELSEVIER, Médecine ET Maladies Infectieuses, Vol.20, Supplément 3, p.53-62

Gill, S. R., Pop, M., DeBoy, R. T., Eckburg, P. B., Turnbaugh, P. J., Samuel, B. S., Nelson, K. E. (2006). Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*, 312(5778): 1355-1359.

Guiraud, J.P (1998). *Microbiologie des principaux produits alimentaires, Microbiologie alimentaire*. Ed ©Dunod, Paris.

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 p.

Goulet, O. (2009). La flore intestinale: UN monde vivant à préserver Intestinal flora: A living world to preserve, *El Sevier Masson*, V.22, 102-106 pp.

Gournier-Chateau N, Larpent JP, Castellanos MI, et Larpent JL. (1994). *Les probiotiques en alimentation animale et humaine*. Lavoisier Tec&Doc. Paris. 192p.

H

Hamedi. Ar, 2009. Etude du potentiel probiotique et technologique des lactobacilles isolés du lait cru de chamelle. Mémoire de Magister. Option : Microbiologie Appliquée. Université d'Oran. PP 22 (100)

Hammes W.P., Hertel C. 2009. Genus I. *Lactobacillus* Beijerinck 1901, Dans: DE VOS P., GARRITY G.M, JONES D., KRIEG N.R., LUDWIG W., RAINEY F.A., SCHLEIFER K.H., WHITMAN W.B. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Berlin: Springer, vol. 3, n°2, p. 465–510

Hassaine O, 2013. Caractéristiques d'intérêt technologiques de souches de bactéries lactiques isolées de lait camelin du sud algérien .Thèse de doctorat en biotechnologie. Université d'Oran.

Hassan A.N. et Frank J.F., (2001). Starter cultures and their use. In : *Applied dairy Microbiology*. (Marth E.H, et Steele J.L) 2 ème édition, Marcel Dekker. Inc New York, 151- 205 p

Harrigan W.F and McCance M.E (1976). Eds., *Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology*. Academic Press, Orlando.

Hariri A., Ouis N., Sahnouni F. et Bouhadi D., 2009. Mise en oeuvre de la fermentation de certains ferments lactiques dans des milieux a base des extraits de caroube. *Rev.Microbiol. Ind. San et Environn*. P: 37-55.

Heyman, M.; Heuvelin, E. (2006). Micro-organismes probiotiques et régulation immunologique le paradoxe. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20: 85-9.

Holzappel W., Haberer P., Geisen R., Björkroth J. et Schillinger U., 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin.Nutr.* 73: 365–73p.

Ho, Thi Nguyet Thu. 2008. « Étude de la flore lactique du nem chua, produit carné fermenté cru traditionnel du sud du Vietnam et maîtrise du processus de fermentation par ajout de souches lactiques sélectionnées spécifiques du produit ». Thèse en Science des aliments et nutrition

Hwanhlem N., Buradaleng S., Wattanachant S., Benjakul S., Tani A., Maneerat S., 2011. Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented fish (Plasom) and production of Plasom from selected strains. *Food Control*, 22: 401-407

I

Isolauri, E. ; Salminen, S. ; Ouwehand, A. (2004). Microbial-gut interactions in health and disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 2(18) : 299-313

Izquierdo A. (2009). Les protéines bactériennes en tant que biomarqueurs de l'activité probiotique. Thèse de Doctorat de Biochimie Analytique. Faculté de Chimie Analytique et Science de l'aliment. Université de Strasbourg, Hubert Curien. France. 211p

J

Jaglin, M. (2013). Axe intestin-cerveau : effets de la production d'indole par le microbiote intestinal sur le système nerveux central. Thèse du doctorat, Université Paris Sud, France, 291p.

K

Khan, I. Ullah, N., Zha, L., Bai, Y., Khan, A., Zhao, T., Che, T., Zhang, C. (2019). Altération du microbiote intestinal dans les maladies inflammatoires de l'intestin (MICI) : cause ou conséquence ? Traitement des MICI ciblant le microbiome intestinal. *Agents pathogènes*, 126(8) : 1-28

Khodja, B. (2018). Caractérisation phénotypique et moléculaire des souches de bactéries lactiques productrices de bactériocine. Thèse de doctorat, Université Djillali Liabes de Sidi Bel Abbes, 100p.

Kim, J., Muhammad, N., Jhun, B. H., & Yoo, J. W. (2016). Probiotic delivery systems: a brief overview. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 46(4), 377-386.

Klaenhammer, T. R., Fremaux, C. et Hechard, Y. (1994). Activité antimicrobienne des bactéries

Klein, J. G., Ettenson, R., & Morris, M. D. (1998). The animosity model of foreign product purchase: An empirical test in the People's Republic of China. *The Journal of Marketing*, 62, 89-100.

Krammer HJ, Kamper H, von Bunau R, et al. "Probiotic drugtherapy with E. coli strain Nissle 1917 (EcN). *Z Gastroenterol*" 2006.44(8): 651-656.

L

Laffargue, C. (2015). Intérêt des probiotiques dans la prévention de pathologies et conseils en officine, Université Toulouse.

Lamas, B., Richard, M. L., Leducq, V., Pham, H. P., Michel, M. L., Da Costa, G., Sokol, H. (2016). CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands. *Nature medicine*, 22(6) : 598-605.

Lansing, M., Prescott, John P., Harley, Donald. et A. Klein, (2003). *Microbiologie De Boeck Supérieur*, P 549

Larparent J-P., Copin M-P., Germonville A., Jaquet M., Thétas J-L. (1997). *Microbiologie du lait et des produits laitiers In Microbiologie alimentaire Techniques de laboratoire*. Larparent J-P. Tec&Doc, Lavoisier, pp: 704-805

Larparent J-P (1996a). *Les bactéries lactiques In Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentation alimentaires*. Bourgeois C.M., Larparent J-P. Tome 2, Tec & Doc, Lavoisier: 4-33

León Aguilera, X.E.; Manzano, A.; Pirela, D.; Bermúdez, V. (2022). Probiotics and Gut Microbiota in Obesity: Myths and Realities of a New Health Revolution. *Journal of Personalized Medicine*. , 12(8) : 1-12

Leveau J. Y Et Bouix M ; 1993. *Microbiologie industrielle, les microorganismes d'intérêt industriel*. Collection sciences et techniques agroalimentaires. Paris. Cedex, P.172-175, P.181.

Leveau J.Y., Bouix., 1993. *Microbiologie industrielle : Les micro-organismes D'intérêt industriel*. ED. Coll. Sciences et Techniques Agroalimentaires, ED. Vol. : Tec & Doc, Lavoisier.

Levy, M., Kolodziejczyk, A. A., Thaiss, C. A., & Elinav, E. (2017). Dysbiosis and the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 17(4): 219-232.

Lysiane D. 2012. *Stratégies de limitation du portage sain des Escherichia coli producteurs de Shigatoxines (STEC) par les bovins. Potentiel bio-protecteur des bactéries lactiques en alimentation animale*. Thèse de Doctorat, école doctorale sciences de la vie, santé, agronomie, environnement : Université Blaise Pascal, France, p. 81.

M

Madsen, K., A. Cornish, et al. (2001). "Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function." *Gastroenterology*. 121(3): 580-591.

Mahaut M, Jeantet M, Brule G, Schuck P. (2003) : *Les produits industriels laitiers*. Lavoisier .Pp .107-180

Mahrous, H. (2011). Probiotics Bacteria from Egyptian Infants Cause Cholesterol Removal in Media and Survive in Yoghurt. *Scientific Reaserch, Food and Nutrition Sciences*, 2, 150-155

Makhloufi K M, (2011). Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Thèse de doctorat de l'université pierre et marie curie. 6p.

Mann G.V. and Spoerry A., 1974. Caractères physico-chimiques, microbiologiques et nutritionnels. Technologie de production. Am. J Clin. Nutr., 61, 353-359. 23.
Marmur J., 1961. A procedure for isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. J. Mol. Biol., 3, 208-218

Matsuzaki T. and Chin J(2000). "Modulating immune responses with probiotic bacteria." *Immunology and cell biology*. 78 (1): 67-73

Mechai, A. (2009). Isolement, caractérisation et purification de bactériocines produites par des bactéries lactiques autochtones : études physiologiques et biochimiques. Thèse de doctorat, Université Badji-Mokhtar, Annaba, 99p.

Medjad, H. (2021). La flore intestinale. Thèse de doctorat, UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI DE TIZI-OUZOU, 62p.

Menad, N. (2018). Effet antagoniste des bactéries lactiques isolées à partir du lait de vache vis à vis de salmonella sp. Thèse de doctorat, Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem, 196p.

Mennane, Z., Khedid., K, Zinedine, A., Lagzouli, M., Ouhssine, M. and 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.

Metlef, S.; Dilmi-Bouras, A. (2008) .Effet antagoniste de *Lactococcus lactis*, souches extrêmophiles locales, sur des espèces de la flore intestinale résidente. *Revue Nature et Technologie*, 01: 33-44

Mogensen , G et al .(1993). Starter cultures , IN J.Smith (ED) , *Technology of reduced – additive Foods* , Blaackie Academic and Professional , London , UK ,pp. 1-25 .

Monnet, C., Latrille, E., Béal, C. et Corrieu, G. 2008. Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques In Corrieu, G. et Luquet, F.M., *bactéries lactiques de la génétique aux ferments*. Tec & Doc, Lavoisier. p : 511, 593.

N

Nousiainen, J., Javanainen, P., Setälä, J., & Wright, A. V. (2004). Lactic acid bacteria as animal probiotics. *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*, (Ed. 3), 547-580.

Novel G., (1993). Les bactéries lactiques In *Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel*. Leveau J-Y., Bouix M. Tec & Doc, Lavoisier, pp : 170-374 of *Dairy Science*, 87: 3225-3234.

O

Ogier J.C., Casalta E., Farrokh C. and Saïhi A., 2008. Safety assessment of dairy

microorganisms: The *Leuconostoc* genus. *Int. J. Food Microbiol.* 126 : 286-290.

Ouwehand, A. ; Vesterlund ; S. (2003). Health aspects of probiotics. *The Investigational Drugs Journal*, 6(6):573-580

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

P

Patterson C.A. (2008). Probiotiques : bien faits au- delà des fonctions nutritionnelles de base .AAFC.1-4.

Pilet, M. F., Magras, C. et Federighi, M. (1998). Bactéries lactiques. Polytechnica, Paris. Pp : 235-260.

Q

Qin, J. et al., 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, Volume 464, p. 59–65.

R

Roberfroid, M. B. (2007). Prébiotiques, probiotiques, synbiotiques et inflammation intestinale. *Objectif Nutrition : la lettre de l'institute Danone*. N°85.

S

Saidi N., Guessas B., Bensalah F., Badis A., Hadadji M., Henni D.E., Salminen S., Gorbach S., Lee Y.K., Benno Y. 2004. Human studies on probiotics: what is scientifically proven today. In: *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects* (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 515- 530.

Salminen, S., 1999. Probiotics: Scientific Support for Use. *Food Technology.*, Vol. 53, N°. 11

Schleifer K.H., (1987). Recent changes in the taxonomy of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Letters*. 46 : 201-203.

Shi, L. H., Balakrishnan, K., Thiagarajah, K., Ismail, N. I. M., & Yin, O. S. (2016). Beneficial properties of probiotics. *Tropical Life Sciences Research*, 27(2), 73-90.

Singleton, P. 1999. *Bactériologie*. 4eme Edition. Dunod, Paris. 317 pages.

Singleton V.L., Orthofer R., and Lamuela-Raventos R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of FolinCiocalteu reagent. *Method.Enzymol.* 299: 152-178.

Sanders J. K. M., N. Bampos, Z. Clyde-Watson, S. L. Darling, J. C. Hawley, H.-J. Kim, C. C. Mak and S. J. Webb, in *The Porphyrin Handbook*, eds. K. M. Kadish, K. M. Smith and R. Guilard, Academic Press, 2000, pp. 1-48

Sondergaard A.K (2005). Application of probiotics in food. In Bacteries lactiques et probiotiques. Luquet Francois-Marie, Corrieu Georges. Tec & Doc, Lavoisier : 195-209

Stiles M.E. et Holzapfel W.H., 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Int. J. Food Microbiol. 36 : 1-29.

T

Thunell, R.K. (1995) . Taxonomy of the leuconostocs. J Dairy Science, vol.78, p.2512-22

Teuber M. and Geis A. (2006). The genus Lactococcus. in : “Prokaryotes”, 4, Bacteria, Firmicutes, cyanobacteria. 3eme Ed., Springer, New York, USA.

W

Wang J. 2009. Structure and chain conformation of five water-soluble derivatives of a β -D-glucan isolated from Ganoderma lucidum. Carbohydrate Research. 344: 105–112.

Y

Yan, F., & Polk, D. B. (2009). Mechanisms of Probiotic Regulation of Host Homeostasis. In: Michail S., Sherman P.M. (Eds). Probiotics in Pediatric Medicine (pp. 55-56)HumanaPress.

Yang D, and Woese CR (1989) Phylogenetic Structure of the “Leuconostocs”: An Interesting Case of a Rapidly Evolving Organism. Syst Appl Microbiol 12:145–149.

Z

Zhang H. et Cai Y. 2014.Lactic Acid Bacteria Fundamentals and Practice. Springer Dordrecht Heidelberg New York London P: 535.

Zourari A, Roger S, Chabanet C et Desmazeaud M (1991). Caractérisation de bactéries lactiques thermophiles isolées de yaourts artisanaux grecs. Souches de Streptococcus salivarius subsp. thermophilus. Lait., 71:445-461

Annexe

Annexe 1

Bouillon MRS (Man Rogosa et Sharpe, 1960)

Peptone	10g
Extrait de viande.....	10g
Extrait de levure	5g
Glucose	20g
Tween 80	1 mL
Phosphate dipotassique	2g
Acétate de sodium	5g
Citrate de sodium	2 g
Sulfate de magnésium.....	0,2g
Sulfate de manganèse	0,05g
Eau distillée.....	1000 mL

pH 6,5. Autoclaver à 120 °C/20mn

M17 (Terzaghi et Sandine, 1975)

Tryptone.....	2,50 g
Peptone pepsique de viande	2,50 g
Peptone papainique de soja.....	5,00 g
Extrait autolytique de levure	2,50 g
Extrait de viande.....	5,00 g
Lactose.....	5,00 g
Glycérophosphate de sodium.....	19,00 g
Sulfate de magnésium.....	0,25 g
Acide ascorbique	0,50 g
Agar bactériologique	15,00 g

pH: 7,1 ± 0,2, Autoclavage 110°C pendant 10min

Annexe 2

MRS BCP

MRS (milieu liquide)..... 1000 ml
Bromocrésolpourpe 0.025g
pH 7,0, Autoclaver 120°C pendant 20 min

Milieu Muller –Hinton (Muller et Hinton, 1941):

Infusion de viande de bœuf.....3000ml
Peptone de caséine..... 17,5g
Amidon de maïs 1,5g
Agar-agar 17g
Eau distillée..... 1000 ml
pH=7,4. Autoclavage: 120°C pendant 20minutes.

Eau physiologique peptonée :

Chlorure de sodium 8,5g
Peptone 0, 5g
Eau distillée..... 950ml
pH=7. Autoclavage 120°C pendant 20min

Bouillon nutritif:

Extrait de viande.....1g
Extrait de levure2g
Peptone5g
Chlorure de soduim5g
Eau distillée..... 1000ml
pH=7,4. Autoclavage 120°C pendant 20min

Annexe 3

Le lait de Sherman (Bourgeois et Leveau, 1991):

Lait crémé en poudre 100g

Extrait de levure 0,5 g

Eau distillée 1000 ml

pH=6,8

Pour obtenir un lait à 0,1% de bleu de méthylène, on ajoute au moment de l'emploi 1ml de bleu de méthylène à 1% déjà stérilisé à 120°C pendant 20min. Et pour avoir un lait à 0,3% de bleu de méthylène, on ajoute au moment de l'emploi 1ml de bleu de méthylène à 3%

Sel biliaires (Fernandez et al, . 2002)

MRSc 1000 ml

Sel biliaires 50g

pH 6.8, Autoclaver 100°C pendant 10 min

Coloration de Gram

- Réaliser un frottis bactérien et le fixer;
- colorer au violet de gentiane phénolé durant environ 1 min;
- laver à l'eau distillée (ou du robinet);
- faire agir la solution de lugol durant environ 30 secondes;
- laver à l'eau distillée (ou du robinet);
- faire agir l'éthanol à 0.95 durant 10 secondes ou faire couler l'éthanol sur la lame jusqu'à la décoloration ; - laver à l'eau distillée (ou du robinet);
- colorer à la fuchsine phénolée de quelques secondes à 1 min selon sa concentration
- laver à l'eau distillée (ou du robinet);
- observer après séchage à l'immersion (objectif x100) et à pleine lumière.

Les bactéries à Gram+ absorbent la couleur du cristal violet et demeurent bleues violettes en apparence, contrairement celles à Gram- qui apparaissent distinctement rosâtres.