

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Filière : Sciences Agronomiques**  
**Spécialité : Production et Biotechnologie Animales**

**THÈSE**  
**POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME DE**  
**DOCTORAT 3<sup>ème</sup> CYCLE LMD**  
**Présentée par :**

**BOUNAAMA Khalil**

**THEME**

**Potentiel inhibiteur du fromage J'ben**

**Soutenue publiquement le : 04/12/2024**

**Membres du jury :**

<b>CHERIGUENE Abderrahim</b>	<b>Professeur</b>	<b>Université de Mostaganem</b>	<b>Président</b>
<b>HOMRANI Abdelkader</b>	<b>Professeur</b>	<b>Université de Mostaganem</b>	<b>Directeur de thèse</b>
<b>DAHOU Abdelkader El-Amine</b>	<b>Maître de Conférences A</b>	<b>Université de Mostaganem</b>	<b>Co-Directeur de thèse</b>
<b>DOUKANI Koula</b>	<b>Professeure</b>	<b>Université de Tiaret</b>	<b>Examinatrice</b>
<b>BENABDELMOUMENE Djillali</b>	<b>Maître de Conférences A</b>	<b>Université de Mostaganem</b>	<b>Examinateur</b>

## REMERCIEMENTS

Avant tout je remercie « Allah » le tout puissant qui m'a éclairé le chemin de la réussite et m'a donné beaucoup de courage, de la volonté et de la force pour réaliser ce travail.

Le plaisir des « manips » à la paillasse, de travailler avec des personnes différentes, de consolider mon domaine de spécialisation et de mon parcours de formation.

Et si cette étude existe aujourd'hui, c'est grâce :

Au Pr. HOMRANI Abdelkader mon directeur de thèse, je lui témoigne toute ma reconnaissance pour ses conseils avisés, son aide précieuse et sa disponibilité.

Au Dr. DAHOU Abdelkader El Amine, Directeur du Laboratoire des Sciences et Techniques de Production Animale, mon co-directeur de thèse, je lui adresse un grand merci pour la confiance témoignée, le soutien accordé tout au long du déroulement du travail pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter ma réflexion, développer mes connaissances et à réaliser ce travail.

Au Pr. CHERIGUENE Abderrahim professeur à l'université de Mostaganem de m'avoir fait l'honneur de présider le jury

Je suis particulièrement reconnaissant aux membres du jury,

Pre. DOUKANI Koula et Dr. BENABDELMOUMENE Djillali d'avoir accepté de juger mon travail, évaluer et examiner cette thèse.

Mes remerciements s'adressent aussi aux responsables des fromageries traditionnelles de la ville de Mècheria, dans la wilaya de Naâma, d'avoir bien voulu mettre à ma disposition les moyens et les échantillons nécessaires à la réalisation de cette étude.

Mes remerciements s'adressent également au Directeur du Laboratoire de recherche de : Biotechnologie et Qualité des Aliments de l'université des frères Mentouri Constantine.

A Dre. TAHLAITI Hafida, enseignante chercheuse et cheffe d'équipe au sein du Laboratoire des Sciences et Techniques de Production Animale, pour ses conseils et ses orientations durant la réalisation de ma partie expérimentale.

A Pre. MOKHTAR Meriem, du département des Sciences Alimentaires, de l'Université Abdelhamid IBN BADIS de Mostaganem.

Au Dr AIT SAADA Djamel, Directeur du Laboratoire de Recherche Technologie Alimentaire et Nutrition de l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem.

Je remercie tous les membres du laboratoire LSTPA, en particulier Dr. MESKINI Zakaria pour son aide et son soutien qui m'ont permis de faire face aux obstacles et Mr. ABBAD Abderrahmen avec qui j'ai partagé des moments inoubliables.

Je remercie également toute l'équipe de recherche du Laboratoire des Sciences et Techniques de Production Animale qui m'a beaucoup soutenu tout au long du déroulement du projet doctoral.

A tous les doctorants, toutes les doctorantes et à Mr. BENHARRAT Noureddine l'ingénieur du laboratoire des Sciences et Techniques de Production Animale de Hassi-Mamèche Mostaganem.

Je remercie tous ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de cette thèse.

*À mes parents*

*Et*

*Ma famille*

## RESUME

Le fromage « J'ben » est un fromage traditionnel préparé à partir de lait cru qui a subi une fermentation spontanée par la microflore lactique indigène. Cette étude vise à évaluer l'activité inhibitrice des bactéries lactiques isolées de ce fromage de la région de Naâma. Les échantillons collectés ont fait l'objet d'analyses physico-chimiques (pH, matière sèche, lactose, matière grasse, matière minérale, protéines, humidité) et l'évaluation du rapport G/S. Les fromages ont présenté une qualité physico-chimique de fromage frais type pâte molle mi-gras. Cent vingt-deux isolats ont été pré-identifiés comme des bactéries lactiques. À partir de ces 122 isolats, 76 isolats sont identifiés phénotypiquement et ont donné les résultats suivants : le genre *Enterococcus* (58 %), *Lactococcus* (24 %) et *Leuconostoc* (18 %). Quinze bactéries lactiques ont été identifiées génotypiquement selon leurs séquences de l'ADNr 16S. Les quinze bactéries lactiques identifiées ont été testées pour les différentes interactions microbiennes par la méthode de diffusion en puits. Les résultats ont montré une activité antagoniste significative vis-à-vis de 07 souches appartenant à la flore d'altération ou pathogène et variables selon la souche lactique et la bactérie pathogène indicatrice. On a observé une absence ou une faible inhibition croisée entre les souches lactiques sélectionnées permettant la possibilité de les utiliser au sein d'une communauté. L'activité antagoniste a été due aux différents agents inhibiteurs comme les bactériocines et le peroxyde d'hydrogène pour les souches identifiées : KC01, KC03, KC04, KC07, KC11 et KC12, et aux bactériocines pour les souches KC10, KC13 et KC14, aussi au peroxyde d'hydrogène pour les souches KC05, KC06 et KC09, et enfin aux acides organiques pour les souches KC02, KC08 et KC15. Les résultats de l'effet de différents facteurs : les milieux de culture (M17, MRS et MH), le NaCl et le pH sur l'activité inhibitrice ont été variables avec absence d'inhibition dans le milieu MH et le pH (5,5 et 4,7) et une activité dans 2% de NaCl. Les bactéries lactiques testées ont donné des résultats significatifs relatifs à leurs aptitudes technologiques, ayant des bonnes propriétés protéolytiques et acidifiantes. Le J'ben de Naâma présente une microflore lactique avec de bonnes potentialités fonctionnelles, technologiques et un haut pouvoir inhibiteur possibles d'être exploités comme des flores starters ou comme probiotiques.

**Mots clés :** Fromage J'ben, bactéries lactiques, caractérisation phénotypique et génotypique, interactions microbiennes, potentiel inhibiteur.

## ملخص

الجبن التقليدي المسمى (جبن) هو جبن محضر من الحليب الخام الذي يخضع للتخمير التلقائي بفضل البوائى اللبنية المستوطنة. يهدف هذا العمل إلى تقييم النشاط المثبط للبكتيريا اللبنية المعزولة من الجبن الخاص بمنطقة النعامة. خضعت عينات "جبن" المتحصل عليها إلى بعض التحاليل الفيزيوكيميائية ( درجة الحموضة، المادة الجافة، الدهون والبروتين، نسبة اللاكتوز والمواد المعدنية، نسبة الرطوبة) وكذا نسبة المادة الدسمة في المادة الجافة G/S. صنفت عينات "جبن" في فئة الجبن الطازج الطري شبه الدهني. سمح الكشف الميكروبيولوجي الأولي بالتعرف على مئة و اثنان وعشرون عزلة باعتبارها بكتريا لبنية. من اصل 122 عزلة، تم تحديد 76 عزلة وفق التوصيف المظهري وتم الحصول على النتائج التالية: جنس المكورات المعوية *Enterococcus* (58%)، المكورات اللبنية *Lactococcus* (24%) وليوكونوستوك *leuconostoc* (18%). تم تحديد خمسة عشر بكتيريا لبنية جينيا وفقا لتسلسل الحمض النووي الريبى ADNr 16S. تم اختبار الخمسة عشر بكتيريا لبنية التي تم تحديدها حول مختلف التفاعلات الميكروبية باستعمال طريقة الانتشار عبر الابار diffusion en puits. أظهرت النتائج نشاطا مثبتا مهما تجاه 7 سلالات تنتمي إلى بكتريا التلف أو البكتريا الممرضة و الذي كان متغيرا على حسب نوع سلالة البكتريا اللبنية ونوع البكتيريا المؤشرة للتثبيط. لوحظ ضعف أو غياب أي تثبيط متصالب بين سلالات البكتيريا اللبنية المختارة، مما يسمح بإمكانية استخدامها مجتمعة. يعود النشاط المثبط لإنتاج مختلف العوامل المثبطة مثل البكتريوسينات bacteriocines وبيروكسيد الهيدروجين بالنسبة للسلالات: KC01, KC03, KC04, KC07, KC11 و KC12 وتعلق أيضا بالبكتريوسينات bacteriocines بالنسبة للسلالات: KC10, KC13 و KC14 وتعلق أيضا ببيروكسيد الهيدروجين في ما يخص السلالات: KC05, KC06 و KC09 وأخيرا تعلق بالأحماض العضوية Acides organiques للسلالات: KC02, KC08 و KC15. كانت نتائج تأثير العوامل المختلفة مثل: الاوساط الزراعية (M17 و MRS و MH) و نسبة تركيز ملح NaCl والاس الهيدروجيني pH على النشاط المثبط متغيرة مع ملاحظة عدم وجود أي تثبيط في الوسط الزراعي MH و والاس الهيدروجيني pH 5,5 و 7,4 و لكن وجود نشاط مثبط في تركيز ملح 2% NaCl. أظهرت البكتريا اللبنية المختبرة نتائج هامة فيما يخص كفاءتها التكنولوجية مع امتلاكها لخاصة تحميض وتحليل بروتين معتبرة. يتميز جبن منطقة النعامة بكتيريا لبنية تتمتع بإمكانات وظيفية و تكنولوجية و قدرة تثبيطه عالية تجعل بالإمكان استغلالها كبكتريا بوائى starters أو كمعززات حيوية Probiotiques.

**كلمات مفتاحية:** "جبن"، بكتيريا لبنية، تحديد النمط المظهري و الجيني ، التفاعل الميكروبي، القدرة التثبيطية.

## ABSTRACT

J'ben" is a traditional cheese made from raw milk that has submitted to spontaneous fermentation by his indigenous lactic microflora. The aim of this study was to evaluate the inhibitory activity of lactic acid bacteria isolated from this cheese from the Naama region. The collected samples were subjected to physico-chemical analyses (pH, dry matter, lactose, fat, mineral matter, protein, and moisture) and the evaluation of their ratio F/D. The cheeses had the physico-chemical quality of soft fresh semi-fat cheese. One hundred and twenty-two isolates were pre-identified as lactic acid bacteria. From these 122 isolates, 76 isolates were phenotypically identified, giving the following results: *Enterococcus* (58%), *Lactococcus* (24%) and *Leuconostoc* (18%). Fifteen lactic acid bacteria were genotypically identified according to their 16S rDNA sequences. The fifteen lactic acid bacteria were tested for different microbial interactions using the well diffusion method. The results demonstrated an interesting antagonistic activity against 07 strains belonging to the spoilage or pathogenic flora. These results were variable depending on the lactic acid bacteria strain and the indicator pathogenic bacteria. The results showed a weak or an absence of cross-inhibition between the selected lactic strains, enabling them to be used in association. Antagonist activity is due to a different inhibitor agents such as bacteriocins and hydrogen peroxide for the strains identified: KC01, KC03, KC04, KC07, KC11 and KC12, is due to bacteriocins for strains KC10, KC13 and KC14, to hydrogen peroxide for strains KC05, KC06 and KC09, and to organic acids for strains KC02, KC08 and KC15. The results of the effect of various factors such as: culture medium (M17, MRS and MH), NaCl and pH on inhibition activity were variable with absence of inhibition in the MH medium and pH (5.5 and 4.7) but presence of activity in 2% NaCl. The tested lactic acid bacteria demonstrated significant results related to their technological abilities, with good proteolytic and acidifying properties. J'ben de Naâma presents a lactic microflora with good functional, technological and high inhibitory potential for use as starters or as probiotics.

**Key words:** J'ben cheese, lactic acid bacteria, phenotypic and genotypic characterization, microbial interactions, inhibitory potential.

## TABLES DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	ii
RESUME .....	v
ملخص .....	vi
ABSTRACT.....	vii
TABLES DES MATIERES.....	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	xiii
LISTE DES FIGURES .....	xiv
LISTE DES ABREVIATIONS.....	xv

INTRODUCTION.....	1
-------------------	---

### PREMIERE PARTIE. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

#### CHAPITRE I. FROMAGES : DIVERSITE ET TECHNOLOGIE

1 Définition du fromage.....	4
2 Technologie du fromage .....	4
2.1 Sélection et prétraitement du lait de fromagerie .....	4
2.2 Acidification .....	7
2.3 Coagulation .....	8
2.4 Opérations post-coagulation .....	10
2.5 Maturation.....	11
3 Classification du fromage .....	12
3.1 Paramètres de classification.....	12
3.1.1 Type du lait .....	12
3.1.2 Type de coagulation.....	12
3.1.3 Consistance et fermeté de pâte fromagère .....	13
3.1.4 Teneur en matière grasse .....	14
3.1.5 Traitement thermique.....	14
3.1.6 Affinage et maturation .....	14
3.2 Différentes familles de fromage.....	15
3.2.1 Fromage frais ou à pâte fraîche.....	15
3.2.2 Fromage à pâte molle.....	15
3.2.3 Fromage à pâte pressée .....	15
3.2.4 Fromage à pâte persillée .....	16
3.2.5 Fromages fondus.....	16
3.2.6 Fromages de chèvre et de brebis.....	16
4 Fromages traditionnels algériens .....	16
4.1 Fromage J'ben.....	17
4.1.1 Définition du fromage J'ben .....	17
4.1.2 Fabrication du fromage J'ben .....	18

4.1.2.1	Pré-coagulation .....	19
4.1.2.2	Coagulation.....	19
4.1.2.3	Egouttage du caillé .....	19
4.1.3	Composition microbiologique du fromage J'ben .....	19
5	Interactions microbiennes dans le fromage.....	20
5.1	Compétition.....	21
5.2	Amensalisme.....	21
5.3	Commensalisme.....	22
5.4	Mutualisme .....	22

## **CHAPITRE II. BACTERIES LACTIQUES**

1	Généralités .....	23
2	Origine et habitat.....	23
3	Taxonomie des bactéries lactiques.....	24
4	Intérêts des bactéries lactiques.....	28
4.1	Intérêts des bactéries lactiques dans les aliments : .....	29
4.2	Intérêts des bactéries lactiques pour la santé .....	31

## **CHAPITRE III. PROPRIETES ANTIMICROBIENNES DES BACTERIES LACTIQUES**

1	Agents inhibiteurs produits par les bactéries lactiques .....	38
1.1	Acides organiques et diminution du pH.....	38
1.2	Peroxyde d'hydrogène .....	38
1.3	Dioxyde de carbone .....	39
1.4	Diacétyl et Reutéline.....	39
1.5	Bactériocines.....	40
1.5.1	Classification des bactériocines .....	41
1.5.2	Mode d'action des bactériocines.....	43
1.5.3	Production des bactériocines .....	45
1.5.3.1	Effet du milieu de culture et des suppléments du milieu de culture .....	45
1.5.3.2	Effet du pH du milieu de culture .....	47
1.5.4	Applications et intérêts des bactériocines .....	47
1.5.4.1	Dans le domaine alimentaire .....	47
1.5.4.2	Dans le domaine sanitaire .....	48

2	Effet inhibiteur des bactéries lactiques contre les flores de contamination et d'altération.....	50
2.1	Bactéries pathogènes de contamination alimentaire .....	51
2.2	Virus de contamination alimentaire .....	56
2.3	Champignons de contamination alimentaire.....	57
2.4	Flores de contamination du lait et du fromage.....	59

## **DEUXIEME PARTIE. ETUDE EXPERIMENTALE**

### **CHAPITRE I. MATERIEL ET METHODES**

1	Cadre et objectifs de l'étude .....	60
2	Localisation de la zone d'étude et des sites de prélèvement.....	60
2.1	Localisation de la zone d'étude.....	60
2.2	Sites de prélèvement .....	61
2.3	Diagramme de fabrication général du J'ben pratiqué par les fabricants.....	62
3	Analyses physico-chimiques des échantillons du fromage J'ben .....	63
3.1	Potentiel d'hydrogène .....	64
3.2	Matière grasse .....	64
3.3	Matière protéique .....	64
3.4	Eau et matière sèche.....	64
3.5	Lactose .....	65
3.	Matière minérale .....	65
4	Caractérisation microbiologique des bactéries lactiques .....	65
4.1	Isolement et purification des bactéries lactiques .....	65
4.2	Identification des bactéries lactiques .....	66
4.2.1	Pré-identification des isolats .....	66
4.2.1.1	Test de la catalase .....	66
4.2.1.2	Coloration de Gram .....	66
4.2.2	Identification phénotypique .....	66
4.2.2.1	Observation microscopique .....	67
4.2.2.2	Croissance à la température de 45°C .....	67
4.2.2.3	Production du gaz à partir du glucose.....	67
4.2.2.4	Tolérance au NaCl à la concentration de 6,5%.....	68
4.2.3	Identification génotypique des isolats purifiés .....	68
4.2.3.1	Isolats retenus pour l'identification génotypiques .....	68
4.2.3.2	Extraction de l'ADN.....	68

4.2.3.3	Amplification de L'ADN par la PCR .....	68
4.2.3.4	Electrophorèse des produits de la réaction PCR.....	69
4.2.3.5	Séquençage de l'ADN .....	70
5	Etude des interactions bactériennes .....	70
5.1	Activité antimicrobienne des cultures bactériennes vis-à-vis des bactéries pathogènes ..	70
5.2	Interactions entre les souches des bactéries lactiques sélectionnées.....	71
5.3	Activité synergétique des bactéries lactiques .....	71
5.4	Détermination de l'agent inhibiteur .....	72
5.4.1	Préparation du surnageant.....	72
5.4.2	Activité antimicrobienne du surnageant .....	73
5.4.3	Sensibilité aux enzymes protéolytiques et à la catalase.....	73
5.4.4	Sensibilité à la chaleur .....	73
5.4.5	Quantification de l'agent inhibiteur .....	74
5.5	Effet des facteurs cultureux sur l'activité inhibitrice .....	74
5.5.1	Effet du milieu de culture .....	74
5.5.2	Effet du NaCl .....	75
5.5.3	Effet du pH.....	75
6	Etudes des aptitudes technologiques.....	75
6.1	Profil de bio-résistance des souches lactiques .....	75
6.1.1	Température de croissance.....	75
6.1.2	Test de la thermorésistance .....	75
6.1.3	Tolérance au NaCl .....	76
6.2	Profil métabolique des souches lactiques .....	76
6.2.1	Production du gaz à partir du glucose.....	76
6.2.2	Hydrolyse de l'esculine et de l'arginine .....	76
6.2.3	Profil fermentaire des sucres.....	77
6.3	Activités protéolytiques et lipolytiques des souches lactiques .....	77
6.3.1	Activités protéolytiques .....	77
6.3.2	Activités lipolytiques .....	77
6.4	Activité hémolytique des souches lactiques .....	77
6.5	Production des exopolysaccharides par les souches lactiques .....	78
6.6	Profil d'acidification des souches lactiques .....	78

## **CAPITRE II. RESULTATS ET DESCUSSION**

1	Analyses physico-chimiques du fromage J'ben.....	79
1.1	Potentiel d'hydrogène .....	79
1.2	Matière grasse .....	80
1.3	Matière protéique .....	81
1.4	Eau et matière sèche.....	81
1.5	Lactose .....	82

1.6	Matière minérale .....	83
1.7	Synthèse sur les résultats des analyses physico-chimiques .....	83
2	Caractérisation microbiologique des bactéries lactiques .....	84
2.1	Identifications des isolats .....	84
2.1.1	Pré-identification des isolats .....	84
2.1.2	Identification phénotypique .....	85
2.1.3	Identification génotypique .....	87
3	Etude des interactions bactériennes .....	93
3.1	Activité antimicrobienne des cultures bactériennes vis-à-vis des bactéries pathogènes ..	94
3.2	Interactions entre les souches des bactéries lactiques sélectionnées.....	98
3.3	Activité synergétique des bactéries lactiques .....	101
3.4	Détermination de l'agent inhibiteur .....	103
3.4.1	Activité antimicrobienne du surnageant .....	103
3.4.2	Sensibilité aux enzymes protéolytiques et à la catalase.....	105
3.4.3	Sensibilité à la chaleur .....	107
3.4.4	Quantification de l'agent inhibiteur.....	108
3.5	Effet des facteurs cultureux sur l'activité inhibitrice .....	109
3.5.1	Effet du milieu de culture .....	109
3.5.2	Effet du NaCl .....	111
3.5.3	Effet du pH.....	112
4	Etudes des aptitudes technologiques.....	114
4.1	Profil de bio-résistance des souches lactiques .....	114
4.2	Profil métabolique des souches lactiques .....	117
4.2.1	Production du gaz à partir du glucose.....	117
4.2.2	Hydrolyse de l'esculine, de l'arginine et fermentation des sucres.....	119
4.3	Activité protéolytique et lipolytique des souches lactiques .....	122
4.4	Activité hémolytique des souches lactiques .....	125
4.5	Production d'exopolysaccharides par les souches lactiques.....	125
4.6	Profil d'acidification des souches lactiques .....	126
	<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>129</b>
	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>132</b>
	<b>ANNEXES .....</b>	<b>163</b>
	Milieu MRS .....	163
	Milieu M17 .....	163
	Bouillon hypersalé .....	163
	Gélose aux triglycérides.....	164
	Milieu PCA-Lait .....	164
	Mueller-Hinton (MH) .....	164
	Milieu gélose esculine.....	164
	Milieu arginine hydrolase .....	165
	Coloration de Gram.....	165

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Liste des espèces de BLs .....	25
Tableau 2 : Bactéries lactiques couramment utilisées dans les préparations probiotiques .....	34
Tableau 3 : Liste des bactéries et leurs bactériocines .....	43
Tableau 4 : Inhibition des flores pathogènes et de contamination alimentaire par les bactéries lactiques .....	56
Tableau 5: Symptômes des pathogènes alimentaires.....	58
Tableau 6 : Composants de la solution mixte utilisée pour l'amplification d'ADNr 16S.....	69
Tableau 7 : Souches pathogènes indicatrices.....	71
Tableau 8 : Résultats physico-chimiques des échantillons de fromage J'ben étudiés.....	79
Tableau 9 : Isolement et identification des bactéries lactiques à partir du fromage J'ben .....	87
Tableau 10 : Résultat d'identification phénotypique et génotypique .....	89
Tableau 11 : Spectre d'activité inhibitrice des souches vis-à-vis des germes indicatrices.....	94
Tableau 12 : Interactions entre les souches lactiques.....	99
Tableau 13 : Diamètre de zone d'inhibition des sept séries.....	101
Tableau 14 : Activité antimicrobienne du surnageant .....	104
Tableau 15 : Activité antimicrobienne du surnageant après traitement par différents enzymes.....	105
Tableau 16 : Production d'acide lactique par les souches lactiques.....	108
Tableau 17 : Effet du milieu de culture sur l'activité inhibitrice des bactéries lactiques.....	110
Tableau 18 : Effet du NaCl sur l'activité inhibitrice des bactéries lactiques.....	112
Tableau 19 : Profil de bio-résistance des souches lactiques .....	115
Tableau 20 : Résultats de production du gaz et de l'hydrolyse de l'arginine et de l'esculine....	119
Tableau 21 : Profil de fermentation des sucres.....	120
Tableau 22 : Activité protéolytique et lipolytique et Production d'exopolysaccharides.....	123
Tableau 23 : Variations des mesures du pH et de l'acidité titrable des souches .....	127
Tableau 24 : Profil d'acidification des souches .....	128

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Processus de fabrication du fromage.....	5
Figure 2 : Diagramme de fabrication des principaux produits laitiers et fromages traditionnels Algériens. ....	17
Figure 3. Mécanismes d'action des bactéries probiotiques. ....	33
Figure 4 : Mode d'action des bactériocines.....	45
Figure 5: Zone d'échantillonnage .....	62
Figure 6 : Moule et contre-moule utilisés dans la fabrication semi-industriel du J'ben.....	63
Figure 7 : Aspect microscopique des isolats .....	84
Figure 8 : Aspect macroscopiques des colonies des isolats.....	85
Figure 9 : Distribution des espèces de bactéries lactiques identifiées phénotypiquement .....	86
Figure 10 : Profil du dendrogramme de <i>Lactococcus lactis</i> .....	90
Figure 11 : Profil du dendrogramme d' <i>Enterococcus faecium</i> .....	91
Figure 12 : Profil du dendrogramme d' <i>Enterococcus durans</i> . ....	92
Figure 13 : Profil du dendrogramme de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> .....	93
Figure 14 : Activité antimicrobienne des souches vis-à-vis de bactéries indicatrices.....	98
Figure 15 : Résultats de thermorésistance .....	117
Figure 16 : Résultats de croissance à la concentration de 6,5% de NaCl.....	117
Figure 17 : Résultats de production du gaz à partir du glucose .....	118
Figure 18 : Hydrolyse de l'esculine.....	121
Figure 19 : Hydrolyse de l'arginine.....	122
Figure 20 : Résultats de fermentation de des sucres.....	122
Figure 21 : Activité protéolytique des souches lactiques.....	124
Figure 22 : Aspect de production des exopolysaccharides .....	125

## LISTE DES ABREVIATIONS

ATCC : American Type Culture Collection

ADNr : Acide Désoxyribonucléique ribosomique

ARNr : Acide Ribonucléique ribosomique

BL (s) : Bactérie (s) Lactique (s)

°D : Degré Dornic

D.O : Densité Optique

EPS : Exopolysaccharides

ERV : Entérocoques Résistants à la Vancomycine

FAO/OMS : Food and Agriculture Organization/Organisation Mondiale de la Santé

FIL : Fédération Internationale du Lait

GRAS : Generally Recognized As Safe

MDRS : Multi-Drug Resistant Staphylococci

MH : Mueller-Hinton

MRS : Milieu Man Rogosa et Sharp

PCR : Polymerase Chain Reaction

pH : potentiel d'hydrogène

SARM : *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méthicilline

*spp* : *Espèce non précisée*

*subsp* : *Sous espèce*

# INTRODUCTION

## INTRODUCTION

La fermentation alimentaire est une méthode ancestrale pour la conservation des aliments qui est utilisée dans la technologie de la transformation alimentaire. Elle présente de nombreuses caractéristiques technologiques liées à l'amélioration de propriétés organoleptiques telles que l'effet sur le goût, la saveur et la texture avec une augmentation de la valeur nutritionnelle. De plus, la fermentation présente une importance pour la santé (Ganzorig, 2016). Le processus de la fermentation et ses avantages sur l'aliment et sur la santé sont dus grâce à des micro-organismes bénéfiques, essentiellement représentés par les bactéries lactiques.

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes ubiquistes, très répandues dans la nature, dans divers habitats (Claesson et *al.*, 2007). Elles sont utilisées depuis des millénaires dans les aliments fermentés. Elles jouent un rôle important dans la conservation et la transformation alimentaire. Une grande variété de ces bactéries est utilisée dans diverses transformations agro-alimentaires, pour la fabrication des produits laitiers, des produits carnés et des fruits et légumes (Makarova et *al.*, 2006).

Les bactéries lactiques sont traditionnellement associées aux aliments en raison de leur action conservatrice due à l'acidification. Elles fermentent les hydrates de carbone pour produire de l'acide lactique en provoquant l'acidification, un élément essentiel de la bio-préservation lactique des produits alimentaires. Au cours de leur croissance et de leurs activités métaboliques, les bactéries lactiques produisent des métabolites tels que : les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyle et les bactériocines qui exercent un effet antagoniste vis-à-vis des micro-organismes pathogènes et/ ou d'altérations (Karakas-Sen & Karakas, 2018). Aussi ces métabolites exercent un effet sur les propriétés organoleptiques des aliments comme la flaveur, de même qu'ils ont des effets bénéfiques sur la santé (Claesson et *al.*, 2007).

Aujourd'hui, la bio-conservation par les microorganismes vivants suscite l'intérêt des scientifiques qui utilisent des bio-ressources naturelles pour produire des molécules fonctionnelles utiles pour la sécurité alimentaire et pour la santé humaine. De plus, les consommateurs s'intéressent de plus en plus au maintien de leur santé par le choix d'aliments sains et nutritionnels. Pour ce choix, ils insistent sur la sécurité sanitaire des aliments, de leur qualité nutritionnelle, des éléments bio-fonctionnels apportés (*health-promoting*) et s'intéressent de plus en plus à la transformation et à la conservation des aliments (Ito et *al.*, 2003 ; Batdorj et

*al.*, 2006). Cet intérêt s'est développé depuis les années 2000 sur les aliments fonctionnels et surtout sur ceux aux probiotiques (Ganzorig, 2016).

La bio-conservation par les microorganismes vivants présente un moyen sûr pour la réduction de l'utilisation des conservateurs chimiques et de leurs risques sur la santé humaine, ainsi que pour éviter le recours aux traitements thermiques à incidence majeure sur la qualité organoleptique et nutritionnelle des aliments. De plus, vue l'émergence de la résistance aux antibiotiques observée chez plusieurs bactéries pathogènes, les bactéries lactiques et ses agents antimicrobiens qui porte le statut « GRAS » (Generally Recognized As Safe) présentent une alternative sûre et efficace de lutte contre ces pathogènes soit pour la préservation soit au niveau de l'organisme en contrôlant les agents infectieux par différents mécanismes (Bhola & Bhadekar, 2019).

Le lait et les produits laitiers sont des aliments très consommés dans le monde. Parmi ces produits laitiers, le fromage qui est un produit noble de la transformation laitière, présente une variété diversifiée liée au cheptel, au procédé de transformation, etc. Le fromage est préparé par des technologies modernes basées sur l'utilisation des ferments contrôlés, ou bien, est fabriqué de manière artisanale par des techniques spéciales pour chaque région dans le monde, en permettant d'avoir des fromages traditionnels typiques, avec des caractéristiques organoleptiques diversifiées.

La sécurité sanitaire des fromages au lait cru par rapport aux fromages industriels a été remise en question. Cependant, il a été signalé que dans certains cas, le fromage au lait pasteurisé causait une incidence plus élevée de maladies provoquées par les contaminations alimentaires que celle observée pour le fromage au lait cru (Koch et *al.*, 2010). Masoud et *al.* (2012) ont évalué les fromages au lait cru comme étant sûrs sur le plan microbiologique. La flore microbienne indigène joue un rôle crucial dans la sécurité sanitaire du produit (Poveda et *al.*, 2015). Ces flores indigènes naturelles assurent la fermentation, et fournissent une saveur plus intense et plus forte que les fromages au lait pasteurisé au cours de la maturation, grâce à leurs lipases et protéases extracellulaires (Wouters et *al.*, 2002 ; Casalta et *al.*, 2009 ; Masoud et *al.*, 2012).

L'Algérie dispose d'une diversité de fromages traditionnels régionaux et nationaux qui se rattachent à différentes familles technologiques dans lesquelles dominent largement les pâtes fraîches principalement originaires des zones steppiques. Le J'ben est un fromage traditionnel

largement produit et consommé en Algérie, à caillé lactique et de type pâte fraîche, fabriqué à l'échelle familiale à partir de lait cru issu d'un cheptel laitier diversifié (bovin, caprin et ovin).

Le fromage J'ben par sa typicité est un aliment de base pour la population des zones steppiques de l'Algérie qui présente une bonne conservation, notamment grâce à l'effet barrière de sa flore lactique intrinsèque. Notre projet doctoral s'inscrit dans ce cadre pour la caractérisation et la détermination du potentiel inhibiteur de ces bactéries lactiques isolées de ce fromage local typique à la région de Naâma. Cette caractérisation et la connaissance des aptitudes de bio-inhibition est une approche scientifique pour développer un levain lactique local capable de lutter contre les germes indésirables des produits laitiers en particulier et des denrées alimentaires et des probiotiques en général.

Notre étude intitulée « potentiel inhibiteur du fromage J'ben » vise à étudier l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques isolées à partir du fromage J'ben contre une flore d'altération et la flore pathogène avec leurs potentialités technologiques et probiotiques. Cette thèse est composée :

D'une synthèse bibliographique ayant trait à la situation de l'art de la thématique (fromages : diversité et technologie ; bactéries lactiques ; propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques).

D'un travail expérimental réalisé en trois volets :

- Isolement et identification de la microflore lactique des échantillons du fromage J'ben des zones steppiques de l'ouest algérien spécifiquement de la région de Mecheria dans la Wilaya de Naâma.
- Révélation de la capacité inhibitrice des bactéries lactiques issues de l'écosystème du J'ben vis-à-vis des souches pathogènes et d'altération ; ainsi que l'interaction entre les souches lactiques isolées (interactions positives ou négatives) et évaluation de l'activité inhibitrice des souches isolées dans des différentes conditions.
- Détermination de certaines potentialités fonctionnelles et technologiques des souches lactiques isolées pour leur utilisation comme des levains lactiques adaptables pour une application semi-industrielle.

**PREMIERE PARTIE**  
**SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

**CHAPITRE I. FROMAGES : DIVERSITE ET**  
**TECHNOLOGIE**

### 1 Définition du fromage

Le fromage est un produit laitier fermenté qui dispose d'une large variété à travers le monde. Traditionnellement, le fromage est un aliment dérivé du lait qui permet de conserver le lait et le maintien de ses propriétés nutritives et organoleptiques. Actuellement, le *Codex Alimentarius* définit le fromage comme « un produit dérivé du lait, affiné ou non, à pâte molle, semi-dure, dure ou extra-dure, déshydraté, dans lequel le rapport protéines de lactosérum/caséine ne dépasse pas celui du lait » (Mayo et *al.*, 2021). Le fromage est donc le nom générique d'un groupe de produits alimentaires dérivés du lait qui se présentent sous une grande variété de formes, propriétés sensorielles (tailles, textures, arômes et goûts). Le fromage est le produit alimentaire le plus diversifié grâce à plusieurs facteurs liés : à l'espèce animale (vache, brebis, chèvre etc.), à la race, à l'origine du lait (exploitation), ou parfois au mélange de ces laits, de la technologie d'obtention du coagulum ou du caillé (acidification lactique, ou enzymatique (présure d'origine animale ou végétale ou mixte), de l'égouttage du lactosérum, du lavage du caillé, de la synérèse à une température (de 30°C à 55°C), du salage, de l'affinage et de l'enrobage par ajout d'additifs alimentaires (romarin, herbes aromatiques, ail, etc.), ou de colorants (chlorophylle, paprika etc.) selon Fox et *al.* (2017b) et Mayo et *al.* (2021) comme indiqué sur la Figure 1.

Les propriétés sensorielles du fromage dépendent du type de lait utilisé, de l'alimentation de l'animal fournisseur, des pratiques de fabrication, de l'environnement d'affinage, de la durée de l'affinage et aussi du type, du nombre et de l'activité des micro-organismes présents dans le produit de formation (Montel et *al.*, 2014 ; Fox et *al.*, 2017a).

Les micro-organismes sont responsables de la fermentation du lait et des nombreuses réactions biochimiques qui se produisent au cours de la fabrication et de l'affinage et qui donnent lieu aux textures et aux saveurs caractéristiques du fromage. La maturation est un processus technologique crucial dans la fabrication du fromage constituant une cascade d'événements biochimiques et microbiologiques, induits par les flux métaboliques des cultures primaires et auxiliaires (Fox et *al.*, 2015).

### 2 Technologie du fromage

#### 2.1 Sélection et prétraitement du lait de fromagerie

La fabrication du fromage commence d'abord par la sélection d'un lait de haute qualité microbiologique, physico-chimique et hygiénique.

La microflore du lait est normalement hétérogène. Certains de ces microorganismes, en particulier les bactéries lactiques peuvent être bénéfiques. Comme dans le passé, certains fromages artisanaux sont toujours produits en utilisant des flores lactiques autochtones. Actuellement, pour les fromages industrialisés, on utilise des ferments lactiques starters sélectionnés en transformation primaire et secondaire (Parente & Cogan, 2004 ; Fox & McSweeney, 2017). Quant aux bactéries lactiques non starters (BLNS), elles contribuent de manière positive à la maturation des fromages au lait cru (Beresford & Williams, 2004), mais de nature variable et non contrôlée et peuvent être responsables d'une partie de la variabilité de ces fromages (Fox & McSweeney, 2017).

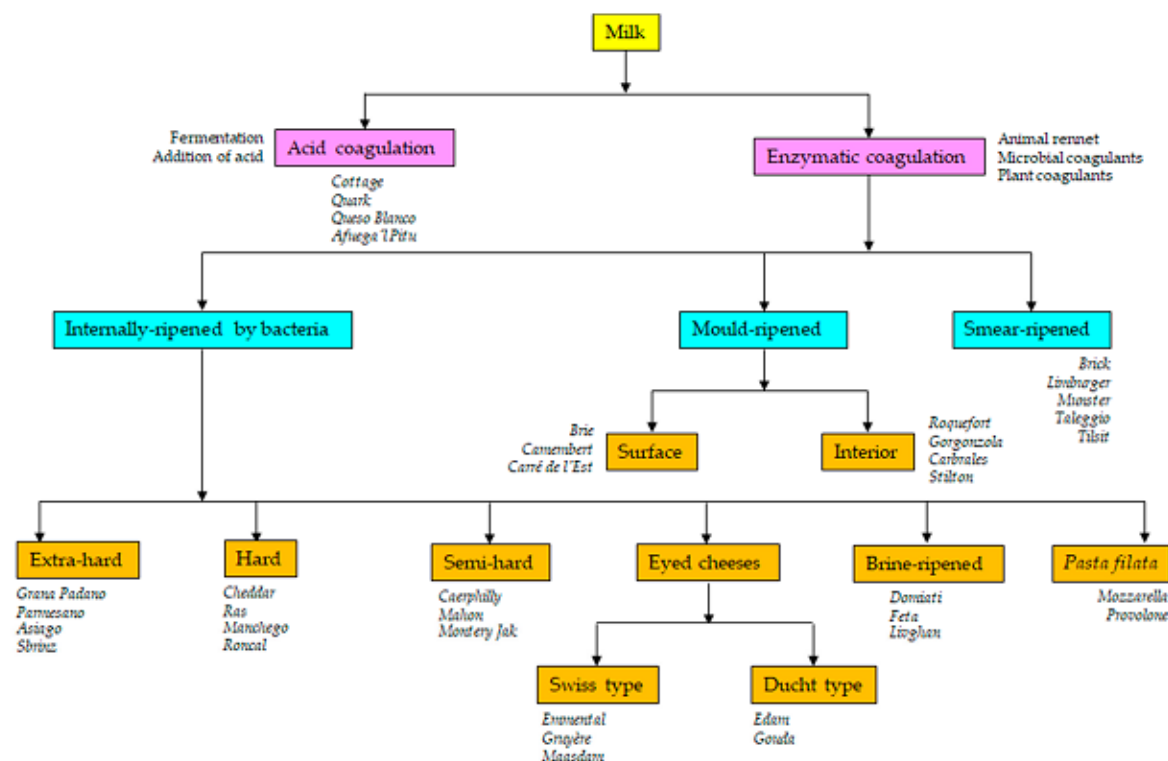


Figure 1 : Processus de fabrication du fromage (Mayo et al., 2021).

Certains membres de la microflore sont indésirables. Certains sont de pathogènes. De plus, le lait cru peut également contenir plusieurs microorganismes d'altération, par exemple les coliformes, et les clostridies. Il est commun d'ajouter des espèces bactériennes comme starters secondaire afin d'inhiber et contrôler ces flores indésirables (Zheng et al., 2021).

Afin de contrôler et standardiser la qualité et les paramètres organoleptiques recherchés du fromage produit, il devient nécessaire de contribuer à la standardisation biologique du lait destiné à la fabrication fromagère par l'élimination des flores microbiennes lactiques et les flores pathogènes et d'altération (Johnson, 2011 ; Fox et *al.*, 2017c). La flore lactique est remplacée par des levains starters sélectionnés et contrôlés.

La standardisation biologique est achevée par différents traitements dont la pasteurisation, la microfiltration, la thermisation, etc. (Fox et *al.*, 2000).

La standardisation biologique par traitement thermique peut assurer l'élimination des bactéries lactiques indigènes afin de contrôler la qualité du produit final, et même de lutter contre les pathogènes et les flores indésirables (Fox et *al.*, 2017c), mais le traitement thermique (pasteurisation) pose le problème de possibilité d'altération de composants biochimiques (protéines et lipides) en induisant par exemple la dénaturation des caséines et l'inactivation des enzymes, et par conséquent altère la formation du caillé, avec une saveur moins intense (Pappa et *al.*, 2017; Jo et *al.*, 2018; Tomasino et *al.*, 2018). Mais la pasteurisation reste importante pour minimiser les risques biologiques (des pathogènes ou de leurs toxines) et de préserver la santé publique, ainsi que la production de fromage de haute qualité hygiénique et avec des propriétés standards.

Les fromages au lait cru développent une saveur plus intense que les fromages au lait pasteurisé ou microfiltré, des grandes quantités de composés aromatiques tels que les acides, les aldéhydes, les alcools, les esters et les composés soufrés sont produites par rapport à celles des fromages au lait pasteurisé (Bachmann et *al.*, 2011; Van Hekken, 2012; Fuka et *al.*, 2013; Kilcawley, 2017). Afin d'augmenter la saveur du fromage produit à partir du lait pasteurisé, il est de plus en plus courant d'ensemencer le lait pasteurisé avec des organismes sélectionnés (Ozturkoglu-Budak et *al.*, 2017), généralement des lactobacilles, isolés à partir de fromages au lait cru de bonne qualité (Fox & McSweeney, 2017).

Le lait de fromagerie doit être exempt d'antibiotiques qui inhibent totalement ou partiellement les bactéries starters ; de plus, ils entraînent une acidification tardive et conduisent à la production de composants néfastes et de microflore anormales et par conséquent, des défauts de saveur et de texture, et peut-être de manière très significative, la croissance de micro-organismes pathogènes ou responsables d'intoxications alimentaires (Fox & McSweeney, 2017).

La production du caillé est fortement influencée par la composition chimique du lait de fromagerie, en particulier les concentrations de caséines et du calcium et du pH (Guinee & O'brien, 2010 ; Fox & McSweeney, 2017).

La composition de la plupart des fromages se situe dans certaines fourchettes de composition, parfois avec un statut légal. Les facteurs de composition les plus importants sont la matière grasse dans la matière sèche, la matière protéique, l'humidité, le sel et le pH (Guinee & O'brien, 2010 ; Fox & McSweeney, 2017).

La composition du lait doit être ajustée pour obtenir les valeurs souhaitées de la matière grasse et des protéines. Le rapport matière grasse/matière protéique est modifié par différentes manières comme l'ajout de crème ou du lait écrémé. Il est désormais possible, et de plus en plus pratiqué commercialement d'ajuster les concentrations, ainsi que le rapport entre la matière grasse et la caséine dans le lait de fromagerie en manipulant la teneur en matière grasse du lait et en standardisant les protéines (Fox et *al.*, 2000). Ces opérations améliorent les caractéristiques fromagères du lait et augmentent le rendement du caillé.

Le pH est également un facteur critique dans la fabrication du fromage sachant que le pH du lait peut varier (par exemple, il augmente avec l'avancement de la lactation et pendant l'infection mammaire), il est recommandé que le pH soit normalisé en utilisant de l'acidogène (acide lactique), dans le lait de fromagerie (Fox & McSweeney, 2017).

### **2.2 Acidification**

L'une des opérations de base dans la fabrication de toutes les variétés de fromages est l'acidification progressive tout au long de la phase de fabrication, et pour certaines variétés, pendant les premières phases d'affinage également, c'est-à-dire que l'acidification commence avant, et transcende les autres opérations de fabrication. L'acidification se fait normalement par la production d'acide lactique ou bien par l'utilisation d'un acidogène (généralement l'acide gluconique- $\delta$ -lactone) pour acidifier directement le caillé pour certaines variétés, par exemple Mozzarella (Fox & McSweeney, 2017).

Dans la fabrication industrielle du fromage, il est désormais presque universel d'ajouter une culture starter de bactéries productrices d'acide lactique sélectionnées au lait cru ou pasteurisé afin d'obtenir un taux de production d'acide uniforme et prédictible (Pfeiler & Klaenhammer, 2007 ; Fox & McSweeney, 2017).

Le choix de bactéries lactiques starters doit être fait selon le type du fromage. Pour les variétés des fromages qui sont cuites à haute température nécessitent l'application des souches thermophiles. Tandis que les variétés de fromage cuites à moins de 40°C, on peut utiliser les starters mésophiles (Carminati et *al.*, 2010).

L'utilisation des starters en culture mixte est largement appliquée (Manini et *al.*, 2016), mais les souches doivent être compatibles entre elles et ne conduit pas à la dominance d'une souche par rapport aux autres et que la production de l'acide lactique est contrôlable et prédictible. Les starters mésophiles à souches définies en culture mixte sont largement utilisés dans de nombreux pays ; ils consistent souvent en une combinaison des souches sélectionnées (Yildiz, 2016), qui donnent des taux de production d'acide très reproductibles si elles sont correctement sélectionnées et maintenues.

La production d'acide à un taux et à un temps appropriés est l'étape clé de la fabrication d'un fromage de bonne qualité. La production d'acide a un impact sur plusieurs aspects de la fabrication du fromage tels que :

- Activité du coagulant (présure) pendant la coagulation (Farkye, 2004).
- Dénaturation et rétention du coagulant dans le caillé pendant la fabrication, ce qui va influencer le taux de protéolyse pendant la maturation et peut affecter la qualité du fromage.
- Contrôle de la croissance des bactéries et l'activité des enzymes dans le fromage avec une forte influence sur le rendement et la qualité finale du fromage.
- L'acidification provoque la dissolution du phosphate de calcium colloïdal, ce qui modifie la sensibilité des caséines à la protéolyse pendant la fabrication, de plus, elle influence les propriétés rhéologiques du fromage et détermine la texture du caillé du fromage.
- L'acidification contrôle la croissance de nombreuses espèces de bactéries dans le fromage, en particulier les micro-organismes pathogènes, les micro-organismes responsables d'intoxications alimentaires et les micro-organismes producteurs du gaz ; en fait, un fromage correctement fabriqué est un produit très sûr de point de vue sécurité sanitaire.

### 2.3 Coagulation

L'étape caractéristique essentielle de la fabrication de toutes les variétés du fromage est la coagulation de la caséine du système protéique du lait pour former un gel (Fox et *al.*, 2017c). Selon Zheng et *al.* (2021) la coagulation peut être obtenue par :

- Acidification jusqu'à un pH isoélectrique de 4,6
- Protéolyse enzymatique (par présure).
- Acidification en combinaison avec un chauffage à 90°C.

La plupart des variétés de fromage (~70% de production totale) sont produites par coagulation enzymatique (présure) avec certaine exception des protéinases acides d'origine végétale provenant des fleurs du cardon (*Cynara cardunculus*) sont utilisés (Fox & McSweeney, 2017).

La présure provenant de l'estomac de jeunes animaux (veaux, chevreaux, agneaux, buffles) était utilisée traditionnellement.

En général, il y a deux techniques principales de coagulation : la voie lactique (par acidification), et la voie enzymatique.

- **La voie lactique**

L'acidité est un élément primordial dans la formation du coagulum. L'acidification est obtenue par les bactéries lactiques autochtones ou par l'addition des ferments lactiques pour transformer les carbohydrates avec une production de l'acide lactique (Parente & Cogan, 2004 ; Fox & McSweeney, 2017). Il se trouve que plusieurs bactéries lactiques sont utilisées comme ferment telles que : *Lactococcus lactis*, *ssp lactis*, et *Lactococcus lactis ssp cremoris* etc. (Cogan, 2014).

Les bactéries lactiques sont utilisées pour assurer une acidification et la formation de caillé avec un rôle important dans l'affinage. Les BLs sont utilisées en transformation fromagères pour des fromages de types traditionnels à caillé mésophile ou de types stabilisés pour un coagulum thermophile (Carminati et al., 2010). La qualité homofermentaire ou hétérofermentaire des levains préparés à partir de culture de BL mixte procure aux fromages leur typicité et un potentiel fonctionnel leur donnant des caractéristiques sensorielles variables.

- **La voie enzymatique**

L'action des enzymes protéolytiques vise à transférer le lait de la phase liquide vers la phase gel. Les enzymes protéolytiques d'origine animale sont connues sous le nom de présure. Deux enzymes protéolytiques s'y trouvent : la chymosine et la pepsine, d'origine animale sécrétées dans la caillette des jeunes ruminants.

Il y a d'autres enzymes d'origine végétale appelées « coagulants végétaux » obtenus à partir de certaines plantes comme : les fleurs du cardon (*Cynara cardunculus*), ou *Cynara scolymus*.

Des enzymes d'origine microbienne sont aussi utilisées comme par exemple : les protéases *Mucor meihei* (Farkye, 2004).

Le gène de la chymosine de veau a été cloné dans *Kluyveromyces lactis*, *Escherichia coli* et *Aspergillus niger* et cette enzyme issue de ces organismes est maintenant largement utilisée.

La coagulation visuelle du lait n'est en réalité que le début du processus de gélification, qui se poursuit ensuite pendant une période considérable. Bien que les changements en post-coagulation déterminent de nombreuses propriétés fromagères essentielles du gel, par exemple la tension du caillé (qui influence le rendement du fromage) et les propriétés synérétiques (qui déterminent la teneur en eau et donc le profil de maturation du fromage), il s'agit peut-être de la phase la moins bien comprise du processus de fabrication du fromage selon Fox & McSweeney, (2017).

### 2.4 Opérations post-coagulation

La séparation du lactosérum du caillé est appelée : le phénomène de synérèse qui se traduit par la contraction du coagulum en éjectant le lactosérum grâce à la présence de la présure et à l'acidification (Fox et al., 2017c). Un gel du lait coagulé par la présure est assez stable dans des conditions de repos, mais il se synérèse rapidement, s'il est bien coupé ou brisé, en facilitant l'exclusion du lactosérum.

La vitesse et l'ampleur de la synérèse sont influencées par la finesse du découpage du coagulum (en petits morceaux lors du tranchage ou lors du moulage dans des moules), la composition du lait, en particulier les concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  et le taux de caséines (jusqu'à un certain point ; à des concentrations très élevées en caséines, le gel est très rigide et ne se synérèse pas bien), le pH, la température de cuisson, la vitesse d'agitation du mélange caillé-lactosérum et la durée (Pearse & Mackinlay, 1998 ; Fox & McSweeney, 2017) .

La vitesse de formation du coagulum du fromage et le durcissement (teneur en eau) de sa pâte est proportionnelle avec l'augmentation de la température. La température de cuisson du caillé varie de 30°C (pas de cuisson) pour les fromages à forte teneur en eau (par exemple, le

camembert) à 55°C pour les fromages à faible teneur en eau par exemple : l'emmental (Fox & McSweeney, 2017).

La dernière opération de fabrication est le salage. Le salage contribue à la synérèse (favorisation de l'égouttage) et améliore la propriété organoleptique du fromage.

### 2.5 Maturation

Certains fromages, principalement les variétés à coagulation acide, sont consommés frais et constituent une part importante des fromages consommés dans certains pays du monde. Cependant, la plupart des variétés de fromage subissent une période de maturation (affinage) qui varie de 2 semaines (Mozzarella) à 2 ans (Cheddar extra-dur). La durée de la maturation étant généralement inversement proportionnelle à la teneur en eau du fromage (Fox & McSweeney, 2017).

Le type des différentes variétés du fromage est reconnaissable à la fin de la fabrication (principalement en raison des différences de composition et de texture résultant de la composition du lait et des facteurs de transformation) selon McSweeney et *al.* (2017). Les caractéristiques uniques de chaque fromage se développent au cours de l'affinage. Les changements biochimiques qui se produisent pendant la maturation particulièrement la saveur, l'arôme et la texture du fromage affiné sont largement prédéterminés par le processus de fabrication, c'est-à-dire par la composition, en particulier par l'humidité, le NaCl et le pH, par le type de levain, et dans de nombreux cas, par les inoculas secondaires ajoutés (Kongo et *al.*, 2016 ; Fox & McSweeney, 2017 ; McSweeney et *al.*, 2017).

Au cours de la maturation, un ensemble de changements biochimiques extrêmement complexes se produit sous l'action catalytique des agents suivants :

- Coagulant.
- Les enzymes du lait indigène, notamment la plasmine et la lipoprotéine lipase, qui sont particulièrement importantes dans les fromages au lait cru.
- Les bactéries starters et leurs enzymes (Mayo et *al.*, 2021).
- Le microbiote secondaire et ses enzymes (Mayo et *al.*, 2021).

Ces microbiotes sont des bactéries lactiques comme : *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Micrococcus* ou des starters secondaires comme : *Propionibacterium*, *Penicillium roqueforti*, *P. camemberti* comme le rapporte Ozturkoglu-Budak et *al.* (2017).

Les premiers changements biochimiques qui se produisent pendant la maturation concernent le métabolisme du lactose résiduel, et dans certaines variétés de fromage, ils impliquent le métabolisme du lactate et du citrate, de la lipolyse et de la protéolyse. Ces réactions biochimiques sont responsables de développement des propriétés sensorielles et texturales grâce à des métabolites tels que : les acides organiques, le diacétyl, le CO<sub>2</sub>, l'H<sub>2</sub>, et les esters (Lavermicocca *et al.*, 2000 ; Atrih *et al.*, 2001 ; van Kranenburg *et al.*, 2002 ; Holzapfel & Wood, 2014;).

La saveur du fromage est due, non pas à un seul composé ou même à un groupe de composés, mais à la concentration et à l'équilibre de nombreux composants (Fox & McSweeney, 2017).

### **3 Classification du fromage**

Le fromage peut être classé en différents groupes sur la base du : type du lait, type de coagulation, consistance (teneur en eau), teneur en matière grasse, traitement thermique, méthode et degré de maturation, etc... Cela engendre une variété infinie de fromages. Sandine & Elliker, (1970) ont suggéré qu'il y a plus de 1000 variétés, alors que Burkhalter, (1981) a classifié 510 variétés.

#### **3.1 Paramètres de classification**

##### **3.1.1 Type du lait**

Le fromage peut être classé en fonction de source du lait en : fromage de chèvre, de brebis, etc. Aussi, on peut distinguer les variétés de fromage au lait cru de celles élaborées à partir du lait pasteurisé.

##### **3.1.2 Type de coagulation**

La voie de coagulation (par chauffage, par production ou l'ajout de l'acide, par coagulant ou par combinaison de ces traitements) permet d'avoir différentes variétés de fromages selon le type de caillé (Farkye, 2004). Le fromage à coagulation enzymatique obtenu par l'action de la présure est désigné sous le type du fromage à caillé enzymatique. Le fromage obtenu par

coagulation acide est classé comme fromage à caillé lactique. Le fromage à caillé mixte résulte de l'utilisation des deux procédés (enzymatique et lactique) impliqué en parallèle (Mietton et *al.*, 2018 ; Mayo et *al.*, 2021).

Almena-Aliste & Mietton (2014) ont classé les fromages français en se basant sur la méthode de coagulation (acide ou présure).

Fox, (1993) suggère une classification en fonction de l'agent coagulant :

- Fromages à caillé enzymatique (présure) : la majorité des fromages.
- Fromages à caillé lactique (acide) : Cottage, Quarg
- Acide + traitement thermique : Ricotta, Sapsago.

### 3.1.3 Consistance et fermeté de pâte fromagère

La consistance du fromage (dure/ molle) est dictée essentiellement par sa teneur en eau (humidité), ou bien est exprimée en TEFD (la teneur en eau dans le fromage dégraissé). Plus le fromage contient plus de l'eau plus il devient plus mou. La consistance est aussi influencée par la teneur en matière grasse, le taux de solubilisation de phosphate de calcium et de l'hydrolyse de la caséine (protéolyse, maturation) qui sont à des niveaux plus élevés, le fromage devient plus mou.

Plusieurs auteurs ont rapporté la classification des fromages en fonction de la consistance (texture) en particulier Davis, (1965) et Walter & Hargrove, (1972).

Selon la norme FAO/OMS N°A-6 pour la teneur en eau, les fromages sont classés en fonction de la consistance en :

- Pâte Extra dure : contient moins de 32% d'eau ou moins de 51% de TEFD.
- Pâte dure : contient 36–43% d'eau ou 49-56% de TEFD.
- Pâte demi dure : contient 54-63 % de TEFD.
- Pâte demi-molle : contient 61-69% de TEFD.
- Pâte molle : contient plus de 50–65% d'eau ou 67% de TEFD.

$$\text{TEFD} = (\text{poids de l'eau dans le fromage} \times 100) / (\text{poids total du fromage} - \text{eau dans le fromage})$$

### 3.1.4 Teneur en matière grasse

La teneur matière grasse est d'une grande importance pour la classification du fromage. Cette teneur est exprimée en pourcentage de matière grasse dans l'extrait sec G/S ou (Gras sur sec). Selon les normes internationales pour les fromages (Codex Standard 221-2001), on distingue 5 classes différentes :

- Extra gras ou double crème (si la teneur en G/S est égale ou supérieure à 60 %) ;
- Gras (si la teneur en G/S est supérieure ou égale à 45 % et inférieure à 60 %) ;
- Mi-gras (si la teneur en G/S est supérieure ou égale à 25 % et inférieure à 45 %) ;
- Maigre (si la teneur en G/S est supérieure ou égale à 10 % et inférieure à 25 %) ;
- Extra-maigre (si la teneur en G/S est inférieure à 10 %).

### 3.1.5 Traitement thermique

Le fromage peut être classé selon la température de cuisson du caillé (Mietton et *al.*, 2018). Dans ce contexte, on distingue

- Les fromages à pâte non cuite ( $T^{\circ} < 40^{\circ}\text{C}$  tout au long du procédé),
- Les fromages à pâte mi- cuites où la cuisson du caillé est effectuée à 40 – 50 °C.
- Les fromages à pâte cuite dont l'étape de cuisson du caillé est réalisée à une température égale ou supérieure à 50 °C.

### 3.1.6 Affinage et maturation

L'affinage est l'étape finale de fabrication du fromage qui permet le développement des caractéristiques spécifiques de chaque variété. On différencie deux types de fromages : les fromages non-affinés (fromage frais) et les fromages affinés.

Il existe différentes manipulations et opérations au cours de la phase fabrication et de la maturation du fromage. Ces opérations permettent l'obtention de nombreuses familles et variétés de fromages : des fromages qui subissent un égouttage par brassage et pression donnent les variétés de fromage à pâte pressée, des fromages classés selon leur croûte (sans croûte, croûte lavée, croûte fleurie...), des fromages avec moisissure (fromage avec moisissure bleue interne, fromage avec moisissure au surface...), des fromages qui subissent un salage : fromage blanc en

saumure (populaire dans la région méditerranéenne, le Maghreb, les Balkans et le Moyen-Orient) (Fox & McSweeney, 2017).

En fonction de tous les paramètres cités ci-dessus, le fromage peut être classé en de grandes principales familles qui sont : les fromages à pâte fraîche, les fromages à pâte molle, les fromages à pâte pressée, les fromages à pâte persillée, les fromages fondus et les fromages de chèvre et de brebis (Mietton et *al.* 2004).

### **3.2 Différentes familles de fromage**

#### **3.2.1 Fromage frais ou à pâte fraîche**

C'est un fromage à caillé lactique (avec légère action de la présure) non affiné, ce qui permet d'obtenir une saveur douce et légère. Le taux d'humidité est élevé (plus de 60%), Il est sans croûte et souvent lisse et connu pour sa texture onctueuse et fondante. Ce type de fromage est consommé rapidement après sa fabrication (Codex Standard 221-2001),

#### **3.2.2 Fromage à pâte molle**

Ce sont des fromages dont le caillé n'est ni cuit, ni pressé. Cette catégorie de fromages est facilement reconnaissable à leur pâte onctueuse, presque molle, voire coulante en fin d'affinage. Le taux d'humidité est plus de 50–65% d'eau ou 67% de TEFD (FAO/OMS N°A-6). On distingue :

- Les fromages à pâte molle et croûte fleurie : le camembert, le Brie,...
- Les fromages à pâte molle et croûte lavée : Maroilles, le Reblochon,...

#### **3.2.3 Fromage à pâte pressée**

Ce sont des fromages affinés dont le caillé subit un égouttage avec découpage du caillé, brassage et pression. Il existe des fromages à pâte pressée cuite qui subissent un chauffage de leur caillé, et des fromages à pâte pressée non cuite. Ces produits sont très appréciés pour leur saveur fine et fruitée, mais aussi leur pâte dure et leur texture ferme en bouche. Il y'a de très nombreuses variétés de fromages dans cette famille.

### 3.2.4 Fromage à pâte persillée

Plus connus sous l'appellation de fromages bleus. La pâte est persillée par des points bleuâtres qui viennent de l'injection d'une moisissure bleue. Les fromages de cette famille sont affinés pendant plusieurs mois. Parmi les plus connus on distingue le Roquefort et la Fourme (FIL, 2021).

### 3.2.5 Fromages fondus

Ce sont des fromages obtenus d'un mélange de fromages généralement à pâte pressée refondue. Ils peuvent être préparés aussi par l'addition d'autres produits laitiers : du beurre, de la crème du lait ou bien des aromates ou des épices (Chambre & Daurelles, 1997).

### 3.2.6 Fromages de chèvre et de brebis

Le fromage de chèvre est obtenu à partir du lait de chèvre, et peut parfois contenir du lait de vache. Ce sont des fromages humides et lisses présentent également une saveur plus prononcée.

Le fromage de brebis est un fromage très riche en nutriments, en comparaison avec le lait de chèvre et de vache, le lait de brebis est plus riche en protéines et en matière grasse qui représentent les principaux constituants fromagers. Dans certains cas le fromage est préparé à partir de mélange du lait des deux espèces (chèvre et brebis).

Kalantzopoulos, (1993) a donné une liste de fromages produits à partir de lait de chèvre et de brebis. Dans cette catégorie, on retrouve les fromages comme : le Rocamadour, Feta et le chevrotin.

## 4 Fromages traditionnels algériens

Le fromage est l'un des produits laitiers qui est largement consommé dans le monde (Fox et *al.*, 2000). Depuis l'antiquité qu'il est fabriqué de manière artisanale à partir du lait des différentes espèces de ruminant (vache, brebis, chèvre, chamelle) au niveau des fermes et des élevages familiaux des nombreuses régions du pays. Le besoin de conserver le lait pour une longue durée, a conduit au développement des techniques de transformation laitière qui a

contribué à l'innovation de sous-produits laitiers tels que les fromages traditionnels. Ces produits laitiers ont permis la conservation facile du lait transformé pour une longue période.

L'Algérie possède une variété de produits laitiers traditionnels et spécifiquement les fromages artisanaux (Leksir et al., 2019). Ces fromages traditionnels sont fabriqués dans les zones rurales au niveau familial, généralement consommé à l'état frais ou peut être semi-affiné et ils sont généralement fabriqués à partir de lait cru par des techniques variables selon la région (Dahou et al., 2021).

La figure 2 représente les procédés de fabrication des principaux produits laitiers artisanaux et des fromages traditionnels en Algérie.

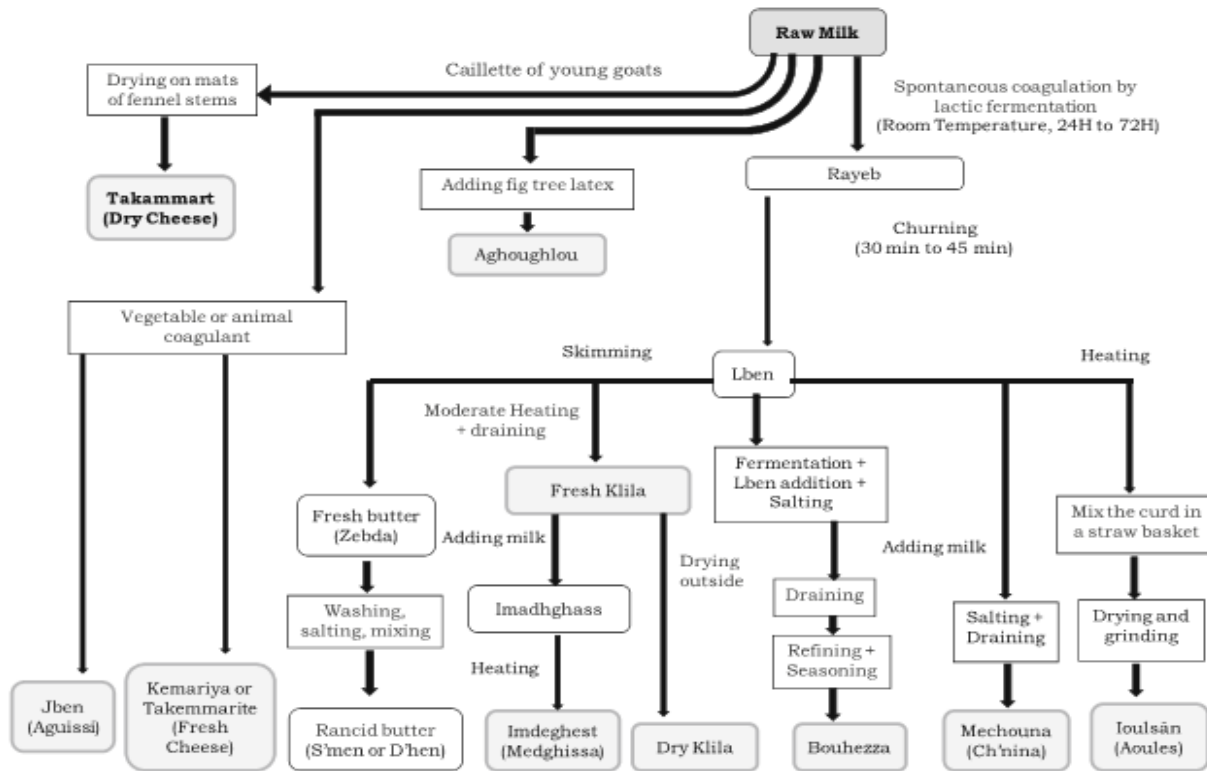


Figure 2 : Diagramme de fabrication des principaux produits laitiers et fromages traditionnels Algériens (Leksir et al., 2019).

## 4.1 Fromage J'ben

### 4.1.1 Définition du fromage J'ben

Le fromage « J'ben » est une appellation commune des régions steppiques des pays du Maghreb en particulier l'Algérie. Le mot « J'ben » en arabe correspond au fromage.

Le « J'ben » est un fromage frais de type fromage blanc à pâte molle produit de manière traditionnelle. Il est préparé à partir de lait cru par différents techniques de fabrication ce qui conduit à un produit final avec des caractéristiques très variées (Mennane et *al.* 2007).

Le fromage artisanal « J'ben » est un fromage fabriqué dans de nombreuses régions rurales d'Algérie :

- Dans les régions des montagnes de l'Est de l'Algérie comme (Guelma, Tébessa, Souk Ahras).
- Dans les zones steppiques de l'ouest algérien (Naâma, El Bayadh, Laghouat) des zones semi-arides à vocation pastorale (Mechai et *al.*, 2014).

Ce fromage est préparé à partir de lait cru de chèvre ou de brebis, et de plus en plus avec du lait de vache avec une fermentation spontanée par la flore lactique indigène sans l'utilisation des starters. La technologie originale de fabrication du J'ben est spécifique à chaque région avec une méthode de fabrication générale commune entre ces régions (Nouani et *al.*, 2009).

Le fromage « J'ben » est préparé de manière artisanale et donc ne possède pas des caractéristiques finales stables et communes aux différentes régions de fabrication. Les caractéristiques organoleptiques et les caractéristiques physico-chimiques, de même que les propriétés nutritionnelles restent toujours dépendantes de l'origine du lait, du cheptel et de son alimentation, du stade de lactation, de la composition du lait en matière grasse, en matière azotée et en minéraux, ainsi que la nature et de l'importance de sa flore lactique indigène etc. (Meghoufel, 2019).

### 4.1.2 Fabrication du fromage J'ben

Bien qu'il y'a différentes techniques et procédés de fabrication du fromage J'ben selon les régions, il apparait l'application de trois grandes étapes communes et essentielles de fabrication qui sont :

- La phase de pré-coagulation (acidification) et de maturation du lait cru.
- La phase de la coagulation.
- La phase de l'égouttage du caillé.

### 4.1.2.1 Pré-coagulation

Cette phase consiste à laisser le lait cru dans une température ambiante pendant environ 24 heures ; cette opération favorise l'acidification spontanée du lait par sa propre flore lactique au cours de sa croissance.

### 4.1.2.2 Coagulation

Après l'acidification, le lait est chauffé légèrement puis additionné de présure artisanale (coagulation enzymatique). Les enzymes de la coagulation du lait sont soit :

D'origine animale : en utilisant de la caillette des jeunes ruminants (veau, chevreau, agneau) abattus avant le sevrage, qui contient deux enzymes protéolytiques (la chymosine et la pepsine).

D'origine végétale : plusieurs plantes sont utilisées pour engendrer la coagulation du lait. La fleur séchée de *Cynara cardunculus* (Artichaut sauvage) ou le cardon (Khorchef el-berri) à coagulation spécifique au J'ben Algérien (Leksir, 2018 ; Mouzali et al., 2003). D'autres plantes sont utilisées comme : *Cynara scolymus* ou l'artichaut (Karnoune) et bien *Ficus carica* ou la figue (Nouani et al., 2009).

### 4.1.2.3 Egouttage du caillé

Après l'obtention du coagulum, l'égouttage se fait par drainage du lactosérum et donc le coagulum obtenu est enroulé dans le tissu propre très fin. Le fromage J'ben peut être condimenté de sel et des plantes aromatiques ou même des épices selon les régions et les fabricants.

## 4.1.3 Composition microbiologique du fromage J'ben

Comme tous les types de fromages traditionnels la composition microbiologique subit une variation selon plusieurs facteurs tels que : l'alimentation, le stade de lactation, la saison etc. Ces facteurs influencent la qualité fromagère du lait. Il y a d'autres facteurs liés au fromage lui-même qui peuvent influencer la variation microbiologique comme : la technique ou le processus de fabrication et l'âge du fromage.

Les études entamées sur la diversité du lait de vache en bactéries lactiques montrent une biodiversité en genres et en espèces. Les genres qui sont largement isolés sont : les entérocoques, les lactocoques, les leuconostocs et les lactobacilles. D'après Dahou et *al.* (2015) le J'ben du lait de vache obtenu de la région de Naâma est essentiellement composé des deux genres : *Enterococcus* à 70 % et *Lactococcus* à 30 %, alors que Mourad et *al.* (2015) y ont trouvé que le J'ben de la région de Djelfa est composé de genres suivants : les lactocoques, les lactobacilles et les entérocoques avec majoritairement de différentes espèces de *lactococcus* (*Lactococcus lactis*, *Lactococcus raffinolactis*, *Lactococcus cremoris*), de lactobacilles (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* et *Lactobacillus helveticus*). Saidane et *al.* (2022) ont isolé les 4 genres suivants : *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostocs* et *Lactobacillus* à partir le fromage J'ben Elgafs de vaches locales : dans la région d'El Ouldja dans la Wilaya de Relizane dans l'ouest algérien.

### 5 Interactions microbiennes dans le fromage

Dans la nature, les micro-organismes vivent en communautés complexes, au sein desquelles différentes interactions microbiennes directes et indirectes, peuvent se produire.

Les interactions microbiennes sont influées par une variété de mécanismes biologiques dont les interactions trophiques (alimentation croisée) et l'échange des métabolites sont les plus typiques. Les chaînes alimentaires trophiques permettent à plusieurs groupes d'organismes de survivre avec des ressources limitées, ce qui accroît la diversité des communautés (Mayo et *al.*, 2021).

En général, les interactions entre les différents micro-organismes ont un impact sur la composition finale et la diversité du microbiote du fromage, mais surtout sur sa fonctionnalité. Une interaction indésirable provoque l'échec de la fermentation et entraîne généralement un processus de maturation inapproprié qui dégrade les propriétés sensorielles du produit final.

Il existe des nombreux types d'interactions indirectes entre les différents types des microbes (Braga et *al.*, 2016 ; Pacheco & Segrè, 2019), bien que, comme dans des autres écosystèmes, les quatre principaux types d'interactions dans le fromage impliquent la compétition, l'amensalisme, le commensalisme et le mutualisme (Smid & Lacroix, 2013).

### 5.1 Compétition

Dans la compétition, deux ou plusieurs micro-organismes se disputent les ressources en nutriments et en énergie d'une manière qui affecte négativement les deux. Le succès de survie et de croissance des BLs dans le lait est dû à leur utilisation efficace des nutriments présents dans ce milieu, notamment le lactose (un sucre rarement trouvé hors le lait, dont l'utilisation nécessite des mécanismes de transport et de dégradation spécifiques (Iskandar et *al.*, 2019). De plus, à leur capacité à dégrader les protéines du lait (caséines) et à absorber les acides aminés et les peptides libérés ; alors que les autres organismes sont limités par l'incapacité d'utiliser le lactose et/ou les faibles quantités de substrats azotés librement disponibles (Upadhyay et *al.*, 2004 ; Liu et *al.*, 2010).

La compréhension de ces interactions est essentielle, par exemple, pour sélectionner des espèces et des souches du levain (ou des mélanges de souches), ce qui leur permettra de se développer dans les systèmes laitiers (Monnet et *al.*, 2012).

### 5.2 Amensalisme

L'amensalisme implique des interactions dans lesquelles un type de micro-organisme affecte négativement un autre type de micro-organisme en produisant des substances inhibitrices non spécifiques inhibant sa croissance sans être affecté. Ce type de relation est couramment observé dans les fermentations lactières, où les bactéries lactiques produisent les acides organiques (acide lactique) qui sont des inhibiteurs efficaces contre plusieurs micro-organismes. En plus de la réduction du pH par ces acides organiques lorsqu'ils sont libérés dans le milieu environnant. Ils ont également un effet inhibiteur direct résultant de leurs formes non dissociées en diffusant à travers les membranes cellulaires et en libérant des ions H<sup>+</sup> qui acidifient le cytoplasme de la cellule (Schnürer & Magnusson, 2005). Les bactéries lactiques produisent aussi d'autres agents inhibiteurs tels que : le peroxyde d'hydrogène, les acides gras etc... Certains BLs sont capables de produire des bactériocines et sont utilisées comme « cultures protectrices » dans le fromage contre les différents pathogènes et les agents d'altération (Mayo et *al.*, 2021). Les substances inhibitrices sont capables d'inhiber les bactéries pathogènes et d'altération comme : les staphylocoques, les entérobactéries, les clostridies etc.

De plus de l'activité antibactérienne, certaines bactéries lactiques ont une activité antifongique (Schnürer & Magnusson, 2005). La nature et la quantité de l'agent inhibiteur antifongique produit dépend de l'espèce et de la sous-espèce (Mayo et *al.*, 2021). Les acides organiques, diacétyl, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, les acides gras et les cyclopeptides sont tous rapportés comme des inhibiteurs de certains champignons (Leyva et *al.*, 2019).

### 5.3 Commensalisme

On parle de commensalisme lorsqu'un micro-organisme présent dans une mixture microbienne a bénéficié des interactions qui se produisent dans cette mixture, tandis que les autres organismes ne subissent ni effets négatifs ni effets positifs ; c'est-à-dire ce microorganisme profite des métabolites produits par les autres pour sa croissance sans effet sur eux. Il est reconnu depuis longtemps que l'activité protéolytique des cultures des bactéries lactiques à protéase positive permet aux espèces et aux souches non protéolytiques de se développer dans le lait (Juillard & Richard, 1991 ; Ranadheera et *al.*, 2012). La même interaction a également été rapportée entre les composants des BLs de la culture starter Hollandaise traditionnelle connue sous le nom de Ur (Erkus et *al.*, 2013).

### 5.4 Mutualisme

Le mutualisme est une relation dans laquelle tous les micro-organismes impliqués bénéficient de leurs interactions. L'interaction mutualiste la plus typique entre les bactéries lactiques dans les produits laitiers est la "proto-coopération" qui a lieu dans le yaourt entre *S. thermophilus* et *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* (Sieuwerts et *al.*, 2008 ; Herve-Jimenez et *al.*, 2009).

Il y a aussi une action coopérative entre les levures et les bactéries lactiques dans le fromage (Mayo et *al.*, 2021).

## CHAPITRE II. BACTERIES LACTIQUES

### 1 Généralités

Les bactéries lactiques représentent un groupe hétérogène de microorganismes, le terme bactérie lactique est lié à leur capacité de fermenter les aliments et de produire de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme. En raison de ces vastes frontières et hétérogénéités, des caractéristiques plus pertinentes ont été étudiées pour identifier ces bactéries. Elles sont Gram positif, catalase négative, non sporulées et immobiles, en forme Cocci ou en bâtonnets, elles peuvent être aérobies ou anaérobies. Suite à leur fermentation des carbohydrates pour la synthèse d'énergie (ATP), deux voies métaboliques résultent : une homofermentaire, dont laquelle l'acide lactique est le seul ou le composant le plus dominant de la réaction métabolique et une hétérofermentaire si l'acide lactique est accompagné par autre composant tel que l'acide acétique, l'éthanol et le CO<sub>2</sub>.

Les bactéries lactiques sont divisées en deux phylums : *Firmicutes* et *Actinobacteria*.

- Phylum *Firmicutes* composé de : *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Weissella*, *Alloiococcus*, *Symbiobacterium* et *Vagococcus*.

- Phylum *Actinobacteria*, représenté par le plus important : *Bifidobacterium* (Von Wright & Axelsson, 2011 ; Liptáková et al., 2017).

Les bactéries lactiques sont généralement considérées comme GRAS "Generally Recognized As Safe", sauf pour certaines espèces du genre *Streptococcus*, *Enterococcus* et certains *Lactobacillus* qui sont considérés comme pathogènes opportunistes (Aguirre & Collins, 1993; König et al., 2009). Elles sont surtout connues pour le rôle bénéfique pour la santé grâce à leurs propriétés technologiques, et elles sont impliquées dans l'industrie des produits alimentaires fermentés en tant que starters où elles servent à développer et à améliorer leurs caractéristiques organoleptiques et à augmenter leur durée de conservation.

### 2 Origine et habitat

Les bactéries lactiques sont des bactéries dites ubiquistes, on les trouve partout dans la nature. Généralement elles colonisent les habitats riches en nutriments tels que : le lait et les produits laitiers, les plantes et les produits végétaux (ensilage, fruits, grains), les produits carnés (viande, poisson), sur la peau et dans la muqueuse du tractus digestif et vaginal de l'homme et de

l'animal, et on les trouve également dans le sol, les engrais, et les eaux d'égout (Hammes et *al.*, 1991 ; Liu et *al.*, 2014).

### 3 Taxonomie des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques appartiennent surtout au phylum *Firmicutes*. La classification classique des bactéries lactiques dite phénotypique est basée sur des caractéristiques morphologiques, biochimiques et physiologiques tels que :

- Gram positif,
- Absence de catalase et d'oxydase,
- Le mode de fermentation du glucose,
- La croissance à différentes températures,
- La capacité de croissance à de hautes concentrations de sel (6.5% à 18%),
- La tolérance aux pH acides et alcalins,
- La production des exopolysaccharides,
- L'hydrolyse de l'arginine,
- La formation d'acétoïne, etc.

A partir des années 1980 et 1990, la classification phylogénétique en se basant sur le séquençage de l'ARNr 16S et 23S a été engagée (Woese, 1987), ce qui a conduit à la révision de plusieurs schémas de classification et a entraîné des grands changements au niveau de la nomenclature (Tableau 1).

- ***Streptococcus***

Ces bactéries sont de forme sphérique (coques) ou ovoïde, regroupées en paires ou en chaînettes, Gram positives, catalase négatives, immobiles, aérobies facultatives, avec certaines ont besoin de CO<sub>2</sub> pour se développer. Ces bactéries sont généralement homofermentaires qui ne produisent pas le CO<sub>2</sub> au cours de la fermentation du glucose. La température optimale de croissance est de 37°C mais la température minimale et maximale peut varier entre les espèces. Beaucoup d'espèces sont commensales de l'homme et des animaux et certaines sont hautement pathogènes (Whiley & Hardie, 2009). En utilisant les tests phénotypiques, il est difficile de différencier le genre *Streptococcus* du genre *Enterococcus* ou du *Lactococcus* (Holzapfel & Wood, 2014).

## CHAPITRE II. BACTERIES LACTIQUES

Tableau 1 : Liste des espèces de BLs (Holzapfel & Wood, 2014)

Famille	Genre	Espèces	Nb d'espèces dans le genre
<i>Aerococcaceae</i>	<i>Abiotrophia</i>	<i>Ab. Defective</i>	1
	<i>Aerococcus</i>	<i>Ae. Viridans</i>	7
	<i>Dolosicoccus</i>	<i>Dc. Paucivorans</i>	1
	<i>Eremococcus</i>	<i>Ere. Coleocola</i>	1
	<i>Facklamia</i>	<i>F. hominis</i>	6
	<i>Globicatella</i>	<i>Glo. Sanguinis</i>	2
	<i>Ignavigranum</i>	<i>Ig. Ruoffiae</i>	1
<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Alkalibacterium</i>	<i>Alk. Olivapovliticus</i>	9
	<i>Allofustis</i>	<i>Af. Seminis</i>	1
	<i>Alloiococcus</i>	<i>Ai. Otitis</i>	1
	<i>Atopobacter</i>	<i>Ap. Phocae</i>	1
	<i>Atopococcus</i>	<i>Ac. Tabaci</i>	1
	<i>Atopostipes</i>	<i>At. Suicloacalis</i>	1
	<i>Bavariococcus</i>	<i>B. seileri</i>	1
	<i>Carnobacterium</i>	<i>C. divergens</i>	10
	<i>Desemzia</i>	<i>D. incerta</i>	1
	<i>Dolosigranulum</i>	<i>Dg. Pigrum</i>	1
	<i>Granulicatella</i>	<i>Gra. Adiacens</i>	3
	<i>Isobaculum</i>	<i>Is. Melis</i>	1
	<i>Lacticigenium</i>	<i>Lg. naphtae</i>	1
	<i>Marinilactibacillus</i>	<i>M. psychrotolerans</i>	2
	<i>Trichococcus</i> (incl. <i>Lactosphaera</i> )	<i>Tr. Flocculiformis</i>	5
<i>Enterococcaceae</i>	<i>Catelicoccus</i>	<i>Cat. Marimammalium</i>	1
	<i>Enterococcus</i>	<i>Ent. Faecalis</i>	43
	<i>Melissococcus</i>	<i>Me. Plutonium</i>	1
	<i>Pilibacter</i>	<i>Pi. Termitis</i>	1
	<i>Tetragenococcus</i>	<i>Tet. Halophilus</i>	5
	<i>Vagococcus</i>	<i>V. fluvialis</i>	8
<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. delbrueckii</i>	151
	<i>Paralactobacillus</i>	<i>Pl. selangorensis</i>	1
	<i>Pediococcus</i>	<i>Ped. Damnosus</i>	11
<i>Leuconostocaceae</i>	<i>Fructobacillus</i>	<i>Fru. Fructosus</i>	5
	<i>Leuconostoc</i>	<i>Leuc. Mesenteroides</i>	13
	<i>Oenococcus</i>	<i>O. oeni</i>	2
	<i>Weissella</i>	<i>W. viridescens</i>	15
<i>Streptococcaceae</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Lc. Lactis</i>	7
	<i>Lactovum</i>	<i>Lv. Miscens</i>	1
	<i>Streptococcus</i>	<i>Strep. Pyogenes</i>	78
Autres BLs	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bif. Bifidum</i>	41

<sup>a</sup> À l'exclusion des espèces reclassées génériquement et des espèces reclassées au rang de sous-espèces.

<sup>b</sup> Les espèces considérées comme des synonymes hétérotypiques ont été comptées une fois.

Nb Nombre.

- ***Enterococcus***

Les entérocoques sont des bactéries Gram positives, de forme sphérique ou ovoïde, isolées ou regroupées en paires ou en des courtes chainettes, généralement immobiles et catalase

négatives, mais certaines espèces sont mobiles ex : *E.gallinarum* et d'autres possèdent une pseudo-catalase.

Les entérocoques sont des bactéries homofermentaires. L'identification phénotypique au sein de ce genre est compliquée, mais la plupart des entérocoques sont caractérisées par : la tolérance au pH 9,6, à une concentration de 6,5% de NaCl, à un taux de 40% des sels biliaires et par la capacité de croissance à 10°C et à 45°C.

L'importance des entérocoques est liée à leur rôle dans l'alimentation et à la santé publique. Elles sont associées aux aliments avec un effet néfaste (altération des aliments) ou bénéfique car par exemple elles jouent un rôle important dans le processus de coagulation du lait et au développement de l'arôme de certains produits traditionnels fermentés tels que fromage, surtout ceux qui sont fabriqués au niveau du bassin méditerranéen et des Balkans. Aussi ces bactéries sont utilisées comme des probiotiques associés aux traitements des diarrhées liées aux agents pathogènes de contamination alimentaire (Holzapfel & Wood, 2014).

- ***Lactococcus***

Les *Lactococcus* sont des bactéries Gram positives, catalase négatives, non mobiles et de forme en cocci, qui ont un diamètre de 0.5 à 1.5 µm, avec une disposition isolée, en paires ou en chaînes. Leur métabolisme est homofermentaire,

Elles sont anaérobies facultatives, mésophiles avec une capacité de se développer à une température variable entre 10 et 40 °C (avec un optimum de 25 à 35 °C), mais sont incapables de se développer à 45°C, ni à 6,5 % de NaCl ou à pH 9,6.

L'utilisation industrielle des lactocoques est généralement comme des starters dans les produits laitiers, tels que le fromage, la crème et le beurre. Les *Lactococcus lactis* sont les plus intéressantes car elles sont utilisées comme des starters seuls ou en cultures mixtes avec d'autres BLs. Leurs principaux rôles dans la fermentation laitière comprennent le développement de la texture en produisant des exopolysaccharides, ainsi que l'amélioration de la saveur en produisant des composants aromatiques (alcool, aldéhyde) et/ ou à travers le métabolisme du citrate (Libudzisz & Galewska, 1991), des acides aminés et des lipides (Holzapfel & Wood, 2014). Les lactocoques sont utilisées pour la bio-préservation des aliments grâce à leur capacité de produire des acides organiques et des bactériocines dont la nisine qui représente la meilleure bactériocine caractérisée. Les lactocoques sont aussi utilisées comme des probiotiques (Suzuki et al., 2008).

- ***Lactobacillus***

Le genre *Lactobacillus* est caractérisé par des grandes variations morphologiques, soit des bacilles (bâtonnets) longs, parfois incurvés ou des coccobacilles courts, isolés ou en chaînes. Les bacilles sont immobiles sauf pour certaines espèces. Leur température optimale de croissance est de 30°C à 40°C mais peut varier de 2°C à 53°C ; le pH est entre 3 et 8.

Selon Orla-Jensen (1919) Il y a 3 groupes :

Groupe 1 : *Thermobacterium* : homofermentaires obligatoires.

Groupe 2 : *Streptobacterium* : hétérofermentaires facultatives.

Groupe 3 : *Betabacterium* : hétérofermentaires obligatoires.

Plusieurs espèces de *lactobacillus* sont hautement spécialisées et se trouvent dans un nombre limité de niches. Les espèces comme *L. delbrueckii*, sont adaptées aux environnements laitiers et appliquées dans la fabrication de yoghourt ; les espèces comme *L. acidophilus*, *L. johnsonii* et *L. reuteri* préfèrent l'environnement intestinal est donc sont fréquemment utilisées comme des probiotiques. Les autres *lactobacillus* tels que *L. plantarum* et *L. rhamnosus* colonisent les différentes niches écologiques : la viande, le poisson, les produits végétaux, les produits laitiers et le tractus intestinal (Siezen & van Hylckama Vlieg, 2011).

- ***Leuconostoc***

Les cellules de *Leuconostoc* sont des coques à Gram positif, catalase négatives, non mobiles, disposées en paires ou en chaînes, leur métabolisme est hétérofermentaire.

Ces sont des bactéries mésophiles, leur température optimale de croissance est de 20°C à 30°C. Ce sont des hétérofermentaires qui métabolisent le glucose en acide lactique, après une production d'éthanol, du CO<sub>2</sub> et des traces d'acide acétique. Elles sont aérobies à anaérobies facultatifs.

Les *Leuconostocs* sont associées aux différents habitats et ces sont des agents très importants dans la fermentation des aliments mais certaines peuvent causer des altérations alimentaires. Elles sont retrouvées dans les plants, les végétaux fermentés, et les produits d'origine animale tels que : le lait cru et les produits laitiers (fromage, lait fermenté), aussi la viande et le poisson (Björkroth & Holzapfel, 2006).

L'importance des *Leuconostocs* est associée à leur rôle dans la fermentation du lait, des végétaux et des céréales. Ces bactéries sont utilisées comme des starters mésophiles responsables

du développement d'arômes typiques aux produits laitiers tels que : le fromage artisanal au lait cru (Mayra-Makinen & Bigret, 2004). Les leuconostocs assurent la préservation et l'amélioration de la qualité sensorielle grâce à la production de plusieurs composants aromatiques et antimicrobiens : les acides organiques, le CO<sub>2</sub>, le diacétyl et le peroxyde d'hydrogène (Hastings et al., 1994; Stiles, 1994 ; Parente et al., 1996 ; Hemme & Foucaud-Scheunemann, 2004; Björkroth & Holzapfel, 2006 ; Xiraphi et al., 2008). Elles sont aussi capables de produire des bactériocines.

- *Pediococcus*

Ce sont des coques à Gram positif, catalase négatives mais certaines sont pseudo catalase, non mobiles. Elles sont généralement aérobies facultatives et leur fermentation est homolactique.

Ces bactéries sont caractérisées par la forme en tétrade liées à leur division alternée en deux directions perpendiculaires. La température de croissance est de 25°C à 35°C.

Elles sont des bactéries mésophiles retrouvées dans différents habitats : les plants, la viande et les produits laitiers. Elles sont impliquées comme des starters pour différents aliments fermentés car elles donnent l'arôme et le texture. Elles jouent un rôle dans la fermentation et la maturation du fromage (Callon et al., 2004) surtout pour développer un fort arôme (Ogier et al., 2002).

#### 4 Intérêts des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques présentent un intérêt dans l'industrie agroalimentaire puisqu'elles sont impliquées comme des starters pour la production d'aliments fermentés. Elles jouent un rôle important dans la préservation et la sécurité alimentaire (Caplice & Fitzgerald, 1999). Le caractère préservatif est grâce à leur capacité de produire : les acides organiques, l'éthanol, le CO<sub>2</sub>, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, les bactériocines et les antibiotiques (De Vuyst & Vandamme, 1994 ; Corsetti et al., 1998 ; Hölzel et al., 2000 ; Lavermicocca et al., 2000 ; Atrih et al., 2001).

Le rôle majeur des bactéries lactiques est le processus de fermentation, leur application dans l'industrie de transformation alimentaire est due à leurs propriétés technologiques et probiotiques (Ravyts et al., 2012 ; Montel et al., 2014; Bintsis, 2018 ; Zielińska & Kolożyn-Krajewska, 2018). Le processus de fermentation se produit en deux manières : spontanée par les

bactéries autochtones ; ou contrôlée en utilisant des levains lactiques pour obtenir les propriétés désirables.

Les bactéries lactiques sont impliquées en tant que des starters primaires où leur rôle majeur est la production de l'acide lactique, ex : les mésophiles : *Lactococcus* et *Leuconostoc* ; et les thermophiles tels que : *Strep. thermophilus*, *Lb. delbrueckii*, et *Lb. Helveticus*. Les starters secondaires ne sont pas directement impliqués dans un but de produire de l'acide lactique en premier lieu ni d'interférer dans cette opération ; elles ont pour but essentiel d'engendrer le développement des caractéristiques organoleptiques des aliments (Beresford & Williams, 2004).

### 4.1 Intérêts des bactéries lactiques dans les aliments :

- **Sensoriel**

Le développement de l'arôme et de la saveur est lié aux différents processus métaboliques qui engendrent la production de plusieurs composants aromatiques comme : l'acétoïne, l'acétaldéhyde, l'acide acétique, les acides gras, les acides aminés libres, les cétones, les lactones, les composés soufrés et l'éthanol (Cogan et *al.*, 1981 ; Califano & Bevilacqua, 2000). Parmi ces processus :

La fermentation des sucres (les sucres simples de faible poids moléculaire) avec une production des différents acides organiques (principalement l'acide lactique).

Le métabolisme de carbohydrates par les BLs est responsable de développement des propriétés aromatiques (Terzic-Vidojevic et *al.*, 2020) ; la conversion du lactose et du citrate : le lactose est transformé principalement en lactate, mais au cours de la glycolyse une partie du pyruvate est alternativement transféré en différents composants aromatiques : le diacétyl, l'acétoïne, l'acétaldéhyde ou l'acide acétique. Certains de ces composants et en quantité adéquate donnent un goût typique aux aliments fermentés (Pastink et *al.*, 2008).

La protéolyse est le plus important processus pour le développement de la saveur de plusieurs aliments fermentés tels que le fromage (Savijoki et *al.*, 2006 ; Kieliszek et *al.*, 2021). Les enzymes protéolytiques (protéinases et peptidases) engendrent la dégradation de la caséine et la production des acides aminés libres. Les acides aminés sont transformés en divers alcools, aldéhydes, acides, et esters qui sont à l'origine des saveurs spécifiques (van Kranenburg et *al.*, 2002).

La lipolyse est un processus essentiel qui aboutit au développement de la saveur de fromage lors de sa maturation (García-Cano et *al.*, 2019). Les acides gras et les acides aminés libres contribuent à l'augmentation de l'intensité et accélèrent la maturation du fromage (Crow et *al.*, 2001). L'activité lipolytique est assez faible et rare chez les BLs (Molimard & Spinnler, 1996).

- **Texture**

La texture est un caractère recherché dans les aliments fermentés et de transformation, selon le type du produit, il y a une texture spécifique désirable. Les bactéries lactiques jouent un rôle majeur dans la fabrication et le développement de la consistance des aliments fermentés tels que le fromage (Yoon et *al.*, 2016).

Parmi les composants bactériens qui déterminent la texture des produits alimentaires sont les exopolysaccharides (EPS). Les EPS sont des polymères sucrés conduisant à l'amélioration de la texture, la consistance et la stabilité du produit final (Holzapfel & Wood, 2014). Les EPS donnent les caractéristiques finales des produits laitiers surtout pour le yoghourt, et permettent de donner à ces produits une texture homogène et stable. Les BLs productrices des exopolysaccharides sont désirées dans l'industrie alimentaire car les EPS fonctionnent comme texturant, émulsifiant et agent de viscosité, ainsi qu'elles ont un comportement rhéologique pseudo-plastique et une capacité de liaison à l'eau (Kodali et *al.*, 2009).

La fermentation des sucres conduit à la diminution du pH ce qui conduit à la coagulation du lait et à la fabrication du fromage. La fermentation conduit aussi à l'élaboration des différents laits fermentés tels que le yaourt. Au cours de la fermentation, le métabolisme du glucose conduit à des métabolites tels que : les acides organiques responsable de développement de la texture caractéristique du produit fermenté (Ayivi et *al.*, 2020) ainsi que le CO<sub>2</sub> et l'H<sub>2</sub> qui ont une influence sur la texture.

La protéolyse influence aussi la texture des différents produits fermentés (van Kranenburg et *al.*, 2002) tels que les fromages de différents types.

- **Augmentation de la durée de conservation**

L'augmentation de la durée de conservation est assurée principalement par la production des acides organiques (acide lactique) au cours de la fermentation des carbohydrates. Ce processus contribue à l'abaissement du pH et à l'inhibition des bactéries pathogènes et des agents d'altération.

Aussi les bactéries lactiques synthétisent des substances qui ont une activité antimicrobienne en plus de l'acide lactique telles que : l'éthanol, le CO<sub>2</sub>, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, les bactériocines et les antibiotiques.

L'utilisation des bactéries lactiques pour la conservation des aliments sert à diminuer l'utilisation des conservateurs chimiques qui peuvent être néfastes pour la santé.

- **Amélioration de la valeur nutritionnelle**

Les bactéries lactiques sont capables d'enrichir les aliments par les vitamines et d'améliorer la digestibilité des nutriments non digestibles par l'hydrolyse des oligosaccharides comme : la raffinose ; la dégradation des protéines (protéolyse) et des lipides (lipolyse) en acides aminés et en acides gras essentielles, ce qui conduit à l'augmentation de la valeur nutritionnelle (Widyastuti & Febrisiantosa, 2014 ; Câmara et *al.*, 2019).

Plusieurs travaux ont démontré la capacité de certaines bactéries lactiques à produire des vitamines du groupe B : comme la biosynthèse de l'acide folique (B9), de la vitamine B2 (riboflavine), et de la cobalamine (B12) qui sont produites par la souche de *Lactobacillus reuteri* CRL1098 (LeBlanc et *al.*, 2011). Ainsi, les bactéries lactiques sont les meilleures candidates pour enrichir les aliments en vitamines (LeBlanc et *al.*, 2015). D'autres recherches ont démontré leur capacité à produire des vitamines K (Walther & Chollet., 2017).

### 4.2 Intérêts des bactéries lactiques pour la santé

Les bactéries lactiques apportent des bénéfices à la santé en tant que « des bactéries amies » par deux mécanismes :

Des effets directs de ces microorganismes appelé « effets probiotiques »,

Des effets indirects sur lesquels ces microorganismes produisent des métabolites secondaires bénéfiques pour la santé (Hayes et *al.*, 2007).

Les probiotiques sont des microorganismes vivants qui par leur consommation en quantité adéquate fournissent un effet bénéfique sur la santé (Vaughan *et al.*, 2005). Les effets des bactéries lactiques sur la santé sont réalisés par 05 mécanismes (Salminen, *et al.* 1999 ; Rolfe, 2000 ; Adebayo, 2018) :

- **Production des substances antimicrobiennes**

La production des substances antimicrobiennes comme les bactériocines par exemple est l'une des caractéristiques des probiotiques qui présente un intérêt croissant ces dernières décennies. Ces substances antimicrobiennes constituent un outil très efficace pour lutter contre les bactéries pathogènes.

- **Inhibition de l'adhésion des bactéries pathogènes aux cellules épithéliales et support de la barrière intestinale**

L'adhésion des bactéries lactiques à l'épithélium du tractus digestif est un caractère désirable pour le choix des souches probiotiques (Tableau 2) car il favorise l'augmentation de leur durée de séjour ; favorise l'élimination des pathogènes et l'interaction avec les cellules épithéliales et immunitaires de l'hôte (Figure 3).

La fixation des bactéries lactiques à l'épithélium empêche la fixation des pathogènes par saturation des sites épithéliales ou par la production des composants qui empêchent l'adhésion. Certains probiotiques peuvent avoir le même site d'adhésion avec les cellules pathogènes ; elles peuvent entrer en compétition avec ces pathogènes pour se combiner avec certains sites de glycolipides en empêchant leur adhésion.

En plus des sites d'adhésion des glycolipides, les bactéries lactiques peuvent sécréter des substances albuminoïdes qui peuvent inhiber la combinaison entre le pathogène et le récepteur d'adhésion (Jensen, 2014).

Les bactéries pathogènes et leurs substances macromoléculaires peuvent pénétrer dans la muqueuse intestinale et détruire la barrière muqueuse. Les probiotiques non seulement préviennent et réparent les dommages causés à la muqueuse intestinale, mais aussi affaiblissent l'action de l'agent pathogène à l'hôte.

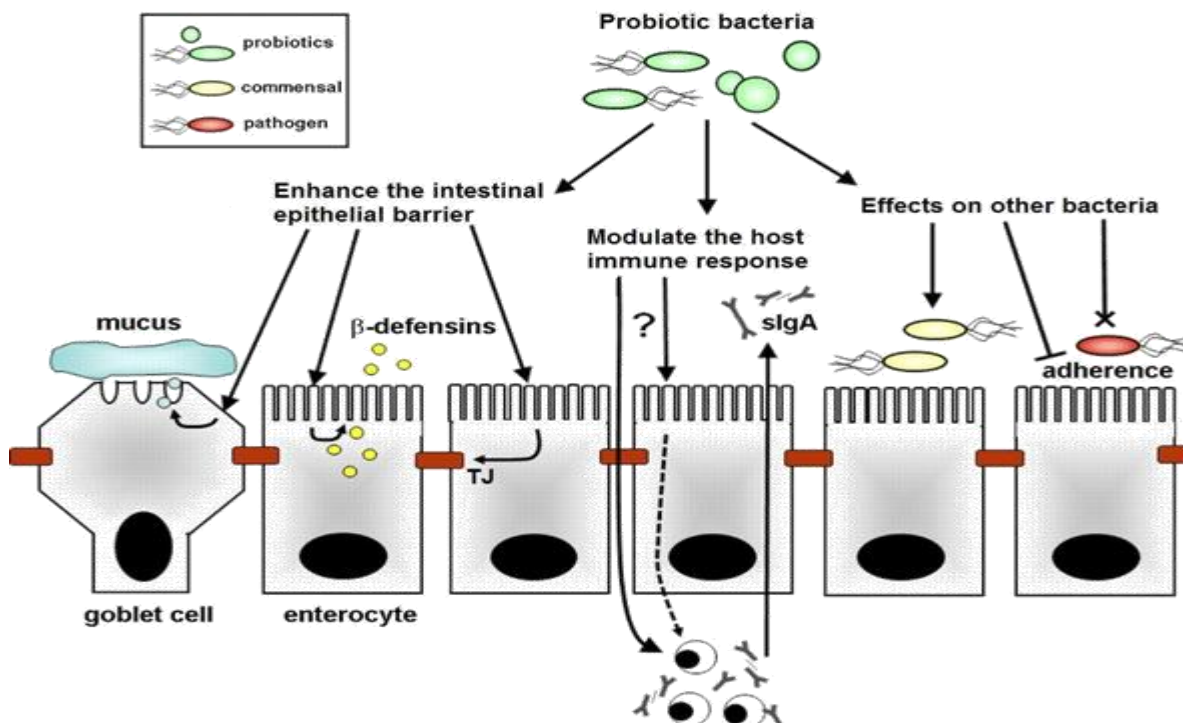


Figure 3. Mécanismes d'action des bactéries probiotiques (Jensen, 2014).

- (1) Les bactéries probiotiques peuvent avoir un effet sur d'autres bactéries et ainsi exclure ou inhiber les agents pathogènes (diminution du pH luminal, peptides antimicrobiens, inhibition de l'invasion bactérienne, blocage de l'adhésion bactérienne aux cellules épithéliales) ;
- (2) Les bactéries probiotiques peuvent renforcer la barrière épithéliale intestinale (augmentation de la production du mucus, production de défensines, renforcement des protéines TJ et prévention de l'apoptose) ;
- (3) Les bactéries probiotiques peuvent moduler la réponse immunitaire de l'hôte (effets sur les cellules épithéliales, les monocytes/macrophages et les lymphocytes).

Les composants bactériens responsables du renforcement de la barrière épithéliale comprennent des facteurs de surface cellulaire, des protéines sécrétées, des protéines solubles et de l'ADN bactérien (Lebeer et *al.*, 2008). Les bactéries probiotiques renforcent la muqueuse intestinale en stimulant la production du mucus (la mucine) par cette dernière et préviennent l'apoptose des cellules épithéliales.

Tableau 2 : Bactéries lactiques couramment utilisées dans les préparations probiotiques (Tripathi & Giri, 2014)

Probiotic bacteria	Species
<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. delbrueckii</i> ssp., <i>L. cellobiosus</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. brevis</i>
<i>Bifidobacterium</i> sp.	<i>B. bifidum</i> , <i>B. adolescentis</i> , <i>B. animalis</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. breve</i> <i>B. thermophilum</i> , <i>B. longum</i>
<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Ent. faecalis</i> , <i>Ent. Faecium</i>
<i>Streptococcus</i> sp.	<i>S. cremoris</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. diacetylactis</i> , <i>S. intermedius</i>

- **Immunomodulation**

La protection vis-à-vis des perturbations de la flore digestive peut être à travers la stimulation de l'immunité spécifique et non spécifique par les microorganismes probiotiques (Rolfe, 2000).

Les bactéries probiotiques interfacent avec les cellules épithéliales de l'hôte en jouant le rôle d'un marqueur immunitaire qui va tirer les cellules immunitaires au site d'infection (Ashraf & Shah, 2014). La couche des cellules épithéliales de la muqueuse gastro-intestinale représente la première barrière de défense mécanique contre les corps étrangers. Cette barrière a une perméabilité sélective qui peut s'interrompre en cas de maladie qui cause l'inflammation et l'altération de la couche épithéliale intestinale. Certains probiotiques peuvent prévenir l'inflammation chronique de la paroi gastro-intestinale en stimulant l'immunité innée de cet épithélium (Bajagai et al., 2016).

Les probiotiques influencent le système immunitaire par différentes manières telles que : la production des cytokines, la stimulation des macrophages et l'augmentation de la concentration des IgA sécrétées (Huang et al., 2021).

D'autres effets des probiotiques sur le système immunitaire qui vont conduire à la prévention des infections des voies respiratoires, la prévention des allergies (conjonctivite, asthme, eczéma et maladie inflammatoire de l'intestin). Les bactéries lactiques ont un effet sur la protection des voies respiratoires en diminuant la durée et la sévérité de l'infection en stimulant les médiateurs de l'immunité (Reid, 2016). Plusieurs études cliniques sur l'allergie sont réalisées par la souche *L. rhamnosus* GG (Wells, 2011).

En générale les probiotiques peuvent contracter le système immunitaire par le :

- Renforcement de la dégradation des antigènes à l'entrée et par altération de leur immunogénicité.
- Réduction de la sécrétion des médiateurs de l'inflammation.
- Favorisation de l'exclusion des antigènes dans l'intestin en renforçant la réponse des IgA muqueuses aux antigènes pénétrés.
- Normalisation de l'augmentation de la perméabilité intestinale à cause de l'inflammation.

- **Compétition pour les nutriments**

Les probiotiques interagissent avec les bactéries pathogènes par consommation des nutriments (le ressource limitée) dans le milieu ce qui conduits à leur élimination.

- **Dégradation des toxines et de leurs récepteurs**

Les récepteurs des toxines pour les bactéries pathogènes comme les récepteurs de colites à *Clostridium difficile* sur les cellules épithéliales peuvent être dégradés par les bactéries lactiques probiotiques.

La capacité des bactéries lactiques probiotiques à engendrer un effet à distance du site d'administration est considérée comme une très intéressante propriété. Cet effet est lié à la production des composants absorbés à travers l'intestin qui va influencer les composants de l'hôte directement ou indirectement (Reid, 2016).

Arroyo et *al.* (2010) ont montrés les effets des bactéries lactiques (*L. fermentum* or *L. salivarius*) sur l'infection des glandes mammaires de la femme.

La réduction de la cholestérolémie par plusieurs mécanismes tels que la diminution du taux de l'acide désoxycholique au niveau intestinale, déconjugaison des sels biliaires par l'hydrolase et assimilation du cholestérol (Guo & Li, 2013; Öner et *al.*, 2014; Tomaro-Duchesneau et *al.*, 2014).

Parmi les effets positifs des probiotiques sur la santé :

- **Contrôle des perturbations digestives et des diarrhées**

Les diarrhées et les perturbations digestives sont de divers types et induites par plusieurs causes. Des recherches ont montré l'effet positif des probiotiques sur quelques types de diarrhées :

- Prévention de la diarrhée des enfants causée par le rotavirus (par l'efficacité du *Lactobacillus GG*),

- Prévention de la rectocolite hémorragique,

- Réduction des symptômes diarrhéiques du SIDA,

- Réduction des diarrhées induites par les antibiotiques.

- **Effets sur le cancer**

Des études ont montré que les probiotiques peuvent réduire le risque du cancer par inhibition des enzymes bactériens (dont la  $\beta$ .glucoronidase, l'azoréductase et la nitroréductase) qui convertissent les précarcinogènes en carcinogènes actives. L'effet anti-tumoral des probiotiques peut être lié à :

- La suppression, le blocage ou l'élimination des précarcinogènes/ carcinogènes.

- La suppression des bactéries qui libèrent les enzymes responsables de la conversion des précarcinogènes en carcinogènes.

- La stimulation du système immunitaire

- La modification du temps de transit au niveau du colon pour éliminer les mutagènes fécales de façon rapide.

Beaucoup d'études ont été réalisées in vivo et in vitro sur l'effet positif des probiotiques dans la suppression du cancer. Parmi ces travaux ceux de l'effet des probiotiques sur la réduction du risque du cancer du foie causé par les aflatoxines de *Aspergillus paraciticus* (El-Nezami et al., 2006) ; du cancer du côlon et du cancer du sein (de Moreno de LeBlanc et al., 2005).

- **Effets vis-à-vis des infections**

- Les probiotiques ont été utilisés pour le traitement des infections microbiennes de différents types et dans diverses localisations :

- Prévention des infections urogénitales (Hanson et al., 2016) ;

-Prévention des infections post-opératoires des opérations abdominales (Lytvyn et *al.*, 2016) ;

-Contrôle des diarrhées infectieuses (Kechagia et *al.*, 2013).

- **Amélioration de la digestibilité et de l'intolérance au lactose**

Certaines personnes souffrent de l'intolérance au lactose liée au manque de l'enzyme ( $\beta$  galactosidase) responsable du métabolisme du lactose. Ces personnes ne peuvent pas consommer le lait ou les produits qui contiennent le lactose. L'effet bénéfique des probiotiques sur le lactose peut s'expliquer par de deux manières :

- soit par l'effet de l'hydrolyse du lactose au niveau de l'aliment fermenté lui-même,
- soit après ingestion au niveau du tractus intestinal.

Les études ont montré que l'addition des souches probiotiques aux produits laitiers permet de diminuer le risque de l'intolérance au lactose grâce à la sécrétion de l'enzyme  $\beta$  galactosidase bactérien. L'activité enzymatique des probiotiques favorise la digestion et l'assimilation des aliments non digestibles.

CHAPITRE III. PROPRIETES  
ANTIMICROBIENNES DES BACTERIES  
LACTIQUES

## 1 Agents inhibiteurs produits par les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont connues depuis longtemps pour leurs effets antagonistes et elles ont été impliquées pour la bio-conservation des produits alimentaires et de leurs dérivés. De nos jours, elles sont utilisées dans le domaine alimentaire et médical (thérapeutique) pour lutter contre les différents germes pathogènes et / ou d'altération. Ceci grâce à leur capacité de production de certains métabolites (molécules bioactives) à propriétés antimicrobiennes capables d'inhiber ou de limiter la croissance des germes indésirables.

### 1.1 Acides organiques et diminution du pH

Les bactéries lactiques peuvent produire différents acides organiques au cours de la fermentation à travers le métabolisme des carbohydrates.

La production des acides est considérée comme le mécanisme le plus important par lequel les BLs inhibent les pathogènes. L'accumulation des acides organiques va provoquer l'abaissement du pH et l'inhibition de plusieurs bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Elles peuvent pénétrer dans une cellule bactérienne à travers la membrane plasmique et se décomposer en ions dans un environnement à pH élevé, provoquant l'acidification du cytoplasme (Podolak et al., 1996).

L'acidification peut altérer le métabolisme cellulaire en détériorant les enzymes, en inhibant la synthèse des protéines, en détruisant le matériel génétique, en interrompant l'absorption des nutriments et en endommageant la sous-structure et la fonction de la paroi cellulaire et des membranes.

Parmi ces acides organiques on trouve l'acide lactique, l'acide acétique et l'acide propionique. L'acide lactique et l'acide acétique peuvent inhiber les *Pseudomonas spp* (Sallam, 2007) et à leur combinaison, elles peuvent inhiber *E. coli* et *Salmonella* (Adams & Hall, 1988).

### 1.2 Peroxyde d'hydrogène

La production de peroxyde d'hydrogène par les bactéries lactiques est liée à la présence de l'oxygène à travers plusieurs systèmes comme NADH oxydase et flavoprotéine oxydase (Ammor et al., 2006). Le peroxyde d'hydrogène est un composant toxique qui peut inhiber la croissance bactérienne en absence de la catalase.

## CHAPITRE III. PROPRIETES ANTIMICROBIENNES DES BACTERIES LACTIQUES

---

L'effet bactéricide du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) est attribué à son fort effet oxydant sur les cellules bactériennes et à la peroxydation des lipides membranaires, ainsi que, l'augmentation la perméabilité de la membrane, et à la destruction des structures moléculaires de base des protéines cellulaires (Zalán et al., 2005). L' $H_2O_2$  peut également être un précurseur pour la production des radicaux libres bactéricides tels que le superoxyde ( $O_2^-$ ) et les radicaux hydroxyles ( $OH^+$ ) qui peuvent endommager l'ADN (Olaoye & Ntuen, 2011).

Les bactéries lactiques sont catalase négative, et l'accumulation de l' $H_2O_2$  dans le milieu provoque leur inhibition aussi, mais certaines souches synthétisent une pseudo-catalase ce qui permet leur protection contre leur propre peroxyde d'hydrogène. D'autres enzymes peuvent dégrader l' $H_2O_2$  comme le peroxidase et flavoprotéine (Csibrikné, 2007).

### 1.3 Dioxyde de carbone

Le dioxyde de carbone est formé essentiellement au cours de la fermentation hétérolactique des hexoses, il inhibe les microorganismes en s'accumulant dans la bicouche membranaire et perturbe leur fonctionnement et leur perméabilité ; aussi il exerce un effet inhibiteur en créant un environnement anaérobique (Ammor et al., 2006).

### 1.4 Diacétyl et Reutéline

Le diacétyl est un composant aromatique produit par plusieurs bactéries lactiques, l'activité antimicrobienne du diacétyl a été observée vis-à-vis les levures, les bactéries à Gram-négatif, et ceux à Gram positif (El-Ziney et al., 1998).

La reutéline (3- hydroxypropionaldehyde) est une substance à activité antimicrobienne produite par les bactéries lactiques à partir du glycérol, c'est une substance « antibiotique » à large spectre d'activité vis-à-vis des levures, des moisissures, des bactéries à Gram positif et à Gram-négatif ; car elle interfère avec la synthèse de l'ADN en agissant sur les sous unités de ribonucléotide reductase (Vollenweider, 2004). Elle est produite par certaines espèces de *Lactobacillus* dont *Lactobacillus reuteri*, (Chung, 1989). *Lactobacillus reuteri* produise aussi la reutericycline (Höltzel et al., 2000) et la reutericine (Kabuki et al., 1997).

## 1.5 Bactériocines

Les bactériocines sont des peptides antibiotiques à faible poids moléculaires avec une activité antimicrobienne. Ils agissent contre les espèces bactériennes qui sont taxonomiquement proches de la souche productrice, et donc un spectre d'activité étroit. Mais les études montrent que l'activité peut être de spectre large et s'étend à des espèces différents (Cotter et *al.*, 2005).

La première découverte des bactériocines a été signalée par Gratia , (1925). Il a démontré une activité bactéricide d'*E. coli* V, vis-à-vis d'autres souches d'*E. coli* S, par une substance thermostable. Cette substance est nommée colicine V. La découverte de la première bactériocine produite par une bactérie lactique a été signalée par Whitehead, (1933) qui avait observé des souches de lactocoques (*Lc. lactis*) qui ont inhibé la croissance de différentes bactéries lactiques d'une culture fromagère, cette étude était une brèche à d'autres études qui ont montrées plus tard que l'agent inhibiteur est une substance de nature protéique thermostable et en 1947, elle a été nommée nisine (Mattick & Hirsch, 1947). C'est qu'en 1951 que l'utilisation des bactériocines a été proposée pour la protection des aliments contre les contaminations alimentaires. En effet, les travaux de Hirsch et *al.* (1951) ont démontré que la nisine inhibait les clostridies au cours de la maturation d'un fromage.

Différentes définitions des bactériocines ont été données au cours du temps. Les bactériocines sont définies comme des toxines protéinées synthétisées par voie ribosomique qui inhibent la croissance des bactéries similaires ou proche par fabrication des pores dans la membrane des bactéries pathogènes, et qui provoquent ainsi la perturbation de la perméabilité membranaire (Da Costa et *al.*, 2019). L'activité antimicrobienne de la majorité des bactériocines est généralement limitée mais certains d'entre eux possèdent un spectre d'activité étendu. Les bactéries lactiques productrices des bactériocines sont immunisées contre leurs propres bactériocines (Cotter et *al.*, 2013).

Les bactériocines sont des peptides cationiques et hydrophobes qui peuvent s'organiser en une ou plusieurs structures hélicoïdales amphiphiles (Rodriguez et *al.*, 2003 ; Heng et *al.*, 2007). En raison de leur structure protéique elles sont dégradables par les enzymes protéolytiques.

Les bactériocines sont des petites molécules cationiques d'environ 30 à 60 acides aminés. Elles diffèrent par leur spectre d'activité, leur mode d'action, leur poids moléculaire, leur origine génétique et leurs propriétés biochimiques (Chittora et *al.*, 2022).

## CHAPITRE III. PROPRIETES ANTIMICROBIENNES DES BACTERIES LACTIQUES

---

En comparaison avec les conservateurs chimiques les bactériocines provoquent moins de risque pour la santé car elles ont moins d'effet sur la modification des propriétés nutritionnelles et organoleptiques des aliments et une moindre toxicité pour l'homme parce qu'elles sont dégradables par les enzymes protéases du tractus gastro-intestinal (Zacharof & Lovittb, 2012).

Les bactéries lactiques telles que : *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, et *Lactobacillus* sont des majeures productrices de bactériocines et elles sont communément utilisées pour la production d'aliments fermentés ce qui les procurent le nom d'aliments bio-sécurisés (Matthews et al., 2017).

### 1.5.1 Classification des bactériocines

La famille des bactériocines est caractérisée par une grande diversité, mais peut se diviser en deux grands groupes : les bactériocines produites par des bactéries à Gram négatif et les bactériocines produites par les bactéries à Gram positif (les bactéries lactiques), mais ces dernières sont les plus utilisées, car leur producteur est déjà impliqué comme starter dans les produits fermentés ce qui va assurer la sécurité de ces bactériocines. Les bactériocines sont classées selon : la structure, le poids moléculaire, la thermostabilité, le mécanisme d'action, etc. (Tableau 3).

- **Classe I : Lantibiotiques**

Cette classe représente des petits peptides qui contiennent des acides aminés inhabituel qui subissent des modifications post-traductionnelles de la sérine et thréonine comme la lanthionine et la  $\beta$ -méthyl-lanthionine, cette classe est appelée les lantibiotiques.

Les lantibiotiques sont des bactériocines à faible masse moléculaires inférieures à 5 kDa, thermostables, et en fonction de leur structure ils sont divisés en trois sous-classes :

La sous classe **Ia**, ou bien les lantibiotiques linéaires : ils sont allongés en forme d'hélice  $\alpha$ , amphiphile, flexible, chargés positivement. Exemple : la nisine et la subtiline.

La sous-classe **Ib** : est constituée des lantibiotiques globulaires, rigides, chargés nulle ou négative. Exemple : Mersacidine.

La sous classe **Ic** (sactipeptides) : constituée de peptides contenant du soufre et du carbone (Cotter et al., 2005).

## CHAPITRE III. PROPRIETES ANTIMICROBIENNES DES BACTERIES LACTIQUES

---

- **Classe II : les bactériocines thermostables non modifiées**

Cette classe représente des petits peptides qui contiennent des acides aminés habituels, non modifiés et ils sont appelés : non lantibiotiques.

Ils rassemblent les peptides à masse moléculaires inférieures à 10 kDa, thermostables.

La sous-classe **IIa** : des bactériocines caractérisées par leur forte activité anti-*Listeria* à l'instar de la pédiocine portant le nom « pediocin-like ». Ils présentent une large gamme d'activités antibactériennes. Exemple : Pediocine PA-1, Leucocine.

La sous-classe **IIb** : elle regroupe les bactériocines qui possèdent deux peptides, appelée «two-peptide», elle a une activité antimicrobienne vis-à-vis des Gram positifs telle que *Bacillus*, *Clostridium*, *Listeria*, *Staphylococcus* et *Streptococcus*. Exemple : La lactococcine G.

La sous-classe **IIc** : elle regroupe les bactériocines thiol-activés dont les extrémités N- et C-terminales sont reliées de manière covalente, ces bactériocines agissent contre les Gram positifs et même contre certaines Gram négatifs. Exemple : L'entéroccine AS-48 produite par *E. faecalis ssp. Liquefaciens*.

La sous-classe **IId** : elle regroupe les bactériocines restantes, linéaires et non pédiocine-like, produites par les Gram positifs tels que : *E. faecium* et *Lc. lactis*. Exemple des entéroccines 7A et Lactococcine A.

La sous-classe **IIe** : Chez les eucaryotes, des peptides issus de la dégradation spécifique de grandes protéines (Nes et *al.*, 2007). Exemple : La bactériocine propionicine F.

- **Classe III**

Cette classe est différente des deux autres classes, les bactériocines de cette classe sont thermosensibles, la plupart des bactériocines de ce groupe sont bactériolytiques qui agissent par la lyse de la membrane cellulaire avec une activité hydrolytique. Exemple : Lactacine A.

Cette classe est divisée en deux sous classe : (Cotter et *al.*, 2005).

La sous-classe **IIIa** : bactériolytique

La sous-classe **IIIb** : non-lytique

## CHAPITRE III. PROPRIETES ANTIMICROBIENNES DES BACTERIES LACTIQUES

- **Classe IV**

Cette classe englobe les bactériocines thermostables, complexes, qui contiennent une partie non protéique de nature lipidique ou une glucidique avec une partie protéique. Ces parties non protéiques sont nécessaires à leur activité (Cotter et *al.*, 2005).

Tableau 3 : Liste des bactéries et leurs bactériocines (Piard & Desmazeaud, 1991 ; Elegado et *al.*, 1997; Nielsen & Boer, 2004; Tahiri et *al.*, 2004 ; Deraz et *al.*, 2005)

L'organisme producteur	Bacteriocine
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	Nisine, Lacticine 481
<i>Bacillus subtilis</i> 168	Subtilosin A
<i>Streptococcus pyrogenes</i>	Streptolysin S
<i>Bacillus subtilis</i> 168	sublancin 168
<i>Leuconostoc carnosum</i> 4010	Leucocine C
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Pediocine
<i>Lactococcus lactis</i>	Lactococcin G
<i>Lactococcus sp. QU 12</i>	Lactocyclicine Q
<i>Lactococcus sp. QU 5</i>	Lacticine Q
<i>Lactococcus lactis subsp.ceremoris</i> LMG 2130	Lactococcine A
<i>Enterococcus faecalis</i> LMG 2333	Enterolysine A
<i>Lactobacillus helveticus</i> 481	Helveticin J
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Plantaricine ST31
<i>Lactococcus lactis</i>	Nisine Z
<i>Enterococcus faecalis subsp. liquefaciens</i>	Enterocine AS48
<i>Lactobacillus plantarum</i> C19	Plantaricin C19
<i>Pediococcus acidilactici</i> M	Pediocinde ACM
<i>Lactobacillus acidophilus</i> DSM 20079	Acidocine D20079
<i>Lactococcus lactis</i> QU 5	Lacticin Q
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	Lactobin A
<i>Carnobacterium divergens</i> M35	Divergicin M35
<i>Enterococcus faecium</i> CRL 35	Enterocin CRL35
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> B14	Bozacin 14
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	Nisin, Lacticin 481
<i>Bacillus subtilis</i> 168	Subtilosin A

### 1.5.2 Mode d'action des bactériocines

Toutes les bactériocines des bactéries lactiques, paraissent agir en général par la même manière sur les cellules cibles, ils agissent par dérèglement de perméabilité membranaire et par la formation des pores au niveau de la membrane cytoplasmique en perturbant son fonctionnement.

### CHAPITRE III. PROPRIETES ANTIMICROBIENNES DES BACTERIES LACTIQUES

---

L'action des bactériocines commence par l'interaction avec la membrane cellulaire de la cellule cible par interaction initial ou en contact avec les récepteurs spécifiques ou par des interactions électrostatiques.

Les lantibiotiques interagissent avec la membrane ou des récepteurs spécifiques comme par exemple : La nisine, un lantibiotique de type A, interagit avec le lipide II au niveau du MurNAc tandis que la mersacidine, un lantibiotique de type B, interagit avec le GlcNAc du lipide II (Willey & Van Der Donk, 2007). Alors que le mécanisme d'action supposé des bactériocines de classe II est l'interaction de la bactériocine avec la membrane ou un récepteur spécifique «la mannose phosphotransférase perméase (Man-PTS)». Les bactériocines circulaires (classe IIc) ont une charge nette positive ; ces peptides interagissent directement avec la membrane bactérienne chargée négativement sans nécessiter des molécules réceptrices (Riaz et *al.*, 2020).

Après l'interaction avec la membrane cytoplasmique les bactériocines vont former des pores larges et non spécifiques, engendrant d'une part la fuite des composants cytoplasmiques tels que les ions, les acides aminés, l'ATP, etc. D'autre part, la perturbation du fonctionnement membranaire et l'augmentation de sa perméabilité ce qui va provoquer la dissipation des deux composants de la force proton motrice, et l'interruption rapide des activités cellulaires et donc à la mort de la cellule (Dortu & Thonart, 2009).

Les lantibiotiques (classe I), les bactériocines, ont un double mode d'action. Elles inhibent la biosynthèse de la paroi cellulaire bactérienne en se liant au lipide II, un transporteur hydrophobe de monomères de peptidoglycane, à partir du cytoplasme à la paroi cellulaire, ce qui entraîne la mort de la cellule. En outre, les lantibiotiques peuvent utiliser le lipide II comme molécule d'amarrage pour initier un processus d'insertion membranaire et la formation des pores dans la membrane bactérienne (Dortu & Thonart, 2009 ; Riaz et *al.*, 2020).

D'autres bactériocines ont un autre mode d'action : les lantibiotiques interagissent aussi par l'interférence et par inhibition de la synthèse des peptidoglycanes de la paroi, D'autres bactériocines peuvent provoquer l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques, comme la pleurocidine et la dermaseptine S1 (Hancock & Patrzykat, 2002), ou l'inhibition de la synthèse protéique ou encore l'inhibition de certaines fonctions enzymatiques (Brogden, 2005). Les bactériocines de classe III comme l'entérollysine A, la zoocine A et la milléricine B peuvent provoquer l'hydrolyse des liens peptidiques des peptidoglycanes des cellules cibles. Les

## CHAPITRE III. PROPRIETES ANTIMICROBIENNES DES BACTERIES LACTIQUES

bactériolysines (classe IIIa) catalysent la paroi cellulaire, ce qui entraîne la lyse de la cellule ; les bactériocines non bactériolytiques (classe IIIb) exercent leur action en perturbant l'absorption du glucose par les cellules, en les affamant et en perturbant le potentiel membranaire (Hernández-González et *al.*, 2021).

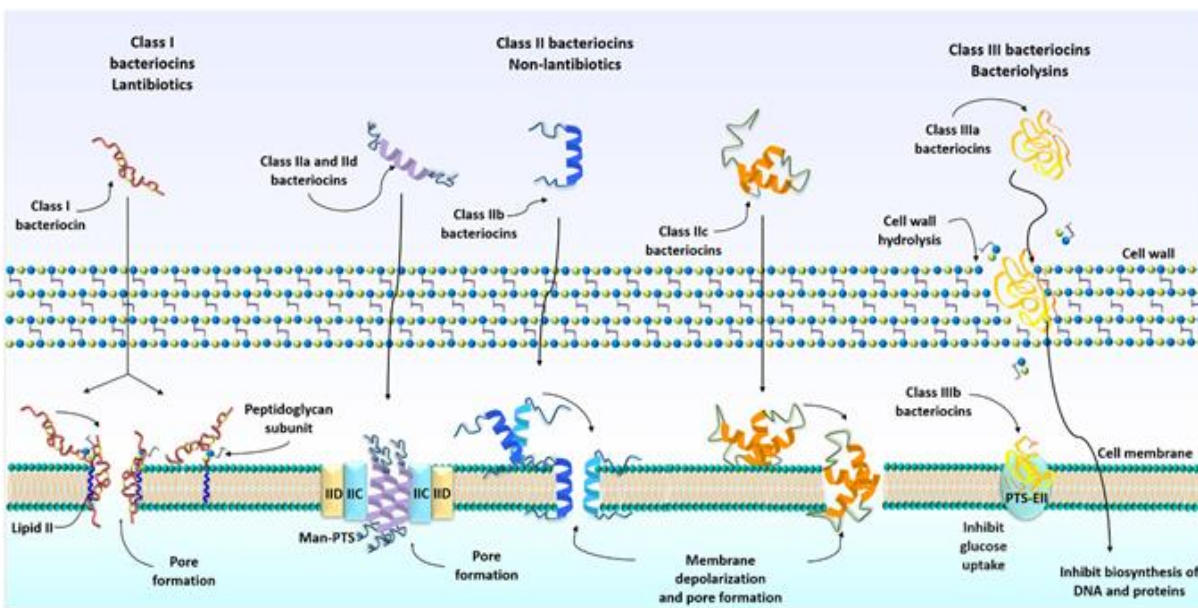


Figure 4 : Mode d'action des bactériocines (Hernández-González et *al.*, 2021).

En générale, comme le montre la figure 4 ; les bactériocines agissent directement sur la membrane ou par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique sur la cellule cible et forment des pores dans la membrane de la cellule bactérienne, ce qui entraîne la mort de la cellule.

### 1.5.3 Production des bactériocines

La biosynthèse des bactériocines est généralement survenue à la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire de croissance cellulaire. La production de bactériocines est influencée par nombreux facteurs tels que : la température, le pH, la composition du milieu.

#### 1.5.3.1 Effet du milieu de culture et des suppléments du milieu de culture

La production des bactériocines est influencée par le milieu de culture utilisé pour la cultivation des souches productrices. Les milieux de culture qui contiennent plus de nutriments

### CHAPITRE III. PROPRIETES ANTIMICROBIENNES DES BACTERIES LACTIQUES

---

favorisent la production des bactériocines. Ces milieux de culture riches en composants et particulièrement en sources de carbone et d'azote permettent une meilleure croissance aux bactéries et de produire des bactériocines. Geis et *al.* (1983) ont trouvé que le milieu Elliker est mieux que le milieu M17 puis le lait pour optimiser une production maximale de bactériocines. Vignolo et *al.* (1995) ont signalé que le maximum de production de lactacine 705 est dans le bouillon MRS que l'Elliker et que le M17. De plus il a été déjà démontré que l'augmentation des concentrations en extrait de levure, en extrait de viande ou en peptone peut permettre une augmentation de la production des bactériocines (Abo-Amer, 2011; Schirru et *al.*, 2014).

La supplémentation en glucose est indiquée dans certaines études comme un facteur d'impact pour la production des bactériocines (Papagianni et *al.*, 2007 ; Guerra et *al.*, 2008; Miao et *al.*, 2015).

Plusieurs études ont montré que la supplémentation du milieu de culture par différents carbohydrates peut influencer la production des bactériocines, soit de manière positive ou bien de manière négative. Cette influence est non seulement liée à la nature des carbohydrates, mais aussi à leur concentration ; des concentrations très élevées peuvent réduire la production de manière significative (Sidooski et *al.*, 2019).

La présence des sels dans le milieu de culture peut avoir un effet significatif sur la production des cellules et des bactériocines. Il a été observé que des concentrations élevées en sel ont un effet négatif sur la croissance cellulaire et la production de bactériocines. Cependant, des concentrations plus faibles en sel génèrent un effet de stress métabolique et une acidification accrue du milieu, ce qui entraîne une augmentation des taux de croissance cellulaire et de la production des bactériocines (Sidooski et *al.*, 2019).

La supplémentation du milieu de culture par des composants chimiques comme le tween et l'éthanol améliore la production des bactériocines. Plusieurs recherches montrent que l'addition de Tween 20 et Tween 80 augmente la production des bactériocines des bactéries lactiques comme *L. sakei*, *L. curvatus* ACU-1, *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* isolées des différents produits (Castro et *al.*, 2011; Ravi et *al.*, 2011 ; Malheiros et *al.*, 2015; Radha & Padmavathi, 2017).

### 1.5.3.2 Effet du pH du milieu de culture

Certaines bactéries lactiques peuvent se développer à différents pH et ce qui influence leur production en bactériocines. De plus, la croissance des bactéries et leur métabolisme se traduit par la production des différents composants métaboliques, parmi eux les bactériocines. Aussi, de nombreux mécanismes qui régulent la production des bactériocines et de leur activité, dépend du pH (Guerra et *al.*, 2008).

Plusieurs études ont montré l'effet du pH sur la production des bactériocines. La nisine est significativement élevée au pH 7 qu'au pH 6 puis à 5.5 (Turgis et *al.*, 2016). Lactocin 705 de *Lactobacillus casei* CRL 705 est achevée dans le bouillon MRS au pH 6.5-7.5 (Vignolo et *al.*, 1995). Alors que *Lactobacillus sakei subsp. sakei* 2 produit un maximum de bactériocine à pH 5.5-7.0 (Malheiros et *al.*, 2015).

## 1.5.4 Applications et intérêts des bactériocines

### 1.5.4.1 Dans le domaine alimentaire

Les bactériocines sont impliquées dans la conservation des produits alimentaires via l'application directe : une préparation des bactériocines sous forme purifiée ou semi-purifiée lyophilisée ; cette préparation est considérée comme un additif alimentaire de point de vue législatif. Le plus connu est la nisine sous forme d'additif alimentaire (E234) (Guinane et *al.*, 2005) qui est commercialisé sous le nom Nisaplin (Danisco, France) et Chrisin (Christen Hansen, Danemark).

Les bactériocines peuvent également être impliquées directement sous la forme concentrées obtenues après fermentation par la souche productrice ; dans ce cas cette préparation est considérée comme un ingrédient fermenté. L'exemple de cette forme est la bactériocine de sous-classe IIa (La pédiocine) commercialisée sous le nom d'Alta 2341 (Mills et *al.*, 2011).

Un autre mode d'application des bactériocines est l'incorporation indirecte en appliquant la souche productrice dans le produit alimentaire (production *in situ*), ce mode d'application est le plus utilisé car il va offrir plus d'efficacité par la libération continue des bactériocines, et le coût qui est relativement faible par rapport à l'utilisation directe des bactériocines (Cotter et *al.*, 2005). Les souches productrices peuvent être aussi incorporées après immobilisation dans des

### CHAPITRE III. PROPRIETES ANTIMICROBIENNES DES BACTERIES LACTIQUES

---

gels ou dans des films tels que l'alginate de calcium, la gélatine, la cellulose, des films de polysaccharides, etc.

Enfin, il y a un développement des emballages alimentaires contenant des bactériocines à la surface pour inhiber la croissance des bactéries pathogènes au cours de la conservation des produits.

Plusieurs études montrent l'efficacité des bactériocines pour la préservation des produits laitiers : La nisine est utilisée pour la protection du fromage en inhibant les divers pathogènes de genre : *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Listeria* et *Clostridium* (Walstra *et al.*, 2006). La nisine est utilisée aussi dans le fromage pour inhiber la croissance des Clostridies qui produisent l'acide butyrique ce qui affecte la saveur et la texture de ce produit.

La contamination de la viande par *Listeria* représente un grand problème, plusieurs bactériocines produites par les bactéries lactiques montrent l'efficacité de réduire ou d'inhiber la *Listeria* dans la viande. Les bacteriocines sakacin P et pediocin AcH isolées de *Lactobacillus* et de *Pediococcus acidilactici*, respectivement, montrent une activité remarquable vis-à-vis de *Listeria monocytogenes* (Kouakou *et al.*, 2010). De même la bactériocine PA-1 produite par *Pediococcus acidilactici* montre une bonne activité envers *Listeria innocu* (Albano *et al.*, 2009).

#### 1.5.4.2 Dans le domaine sanitaire

Les bactériocines sont utilisées dans le domaine sanitaire comme des agents thérapeutiques antimicrobiens et alternatifs aux antibiotiques. Suite à l'apparition du problème de l'antibiorésistance chez plusieurs bactéries pathogènes (résistance à plusieurs antibiotiques au même temps « Multi drug resistance »), ce qui menace la santé publique, dans ce cadre beaucoup des recherches ont été menées pour trouver des éléments antibactériens alternatifs aux antibiotiques parmi lesquels les bactériocines.

Les études soulignent que le mécanisme des activités antimicrobiennes des bactériocines est complètement différent de celui des antibiotiques, ce qui indique que les bactériocines pourront devenir des "combattants de l'infection du nouvel âge" (Dicks *et al.*, 2018)

De nombreuses bactériocines (par exemple, les lanthipeptides) présentent une activité inhibitrice contre les agents pathogènes. En outre, certaines bactériocines ont démontré des effets inhibiteurs sur les virus et les parasites (Huang *et al.*, 2021).

### CHAPITRE III. PROPRIETES ANTIMICROBIENNES DES BACTERIES LACTIQUES

---

Les bactériocines présentent généralement une activité antibactérienne contre les bactéries pathogènes critiques, y compris certaines bactéries à Gram positif résistantes aux antibiotiques, notamment *Mycobacterium tuberculosis* et *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM), *Listeria monocytogenes*, les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV), *Clostridium difficile*, et les bactéries à Gram négatif, notamment *Escherichia coli* et *Salmonella enterica* (Huang et al., 2021).

Dembélé et al. (1998) ont démontré que les bactéries lactiques du genre *Lactobacillus* contribuent à la protection du vagin en produisant des bactériocines qui ont une activité envers différentes bactéries pathogènes telles : *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Shigella boydii*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria innocua* et *Staphylococcus aureus*.

Il a été rapporté que certaines bactériocines présentent des activités antivirales contre une variété de virus. Les bactériocines exercent leur effet par blocage de la synthèse des glycoprotéines et l'inhibition de leur multiplication (Quintana et al., 2014). Les bactériocines ont été signalées comme ayant un effet antiviral contre le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), le virus zika et le virus de la dengue (Quintana et al., 2014).

Les protozoaires tels que *Trypanosoma* peuvent provoquer des maladies graves. Plusieurs bactériocines ont été signalées comme ayant un effet inhibiteur sur certains parasites et peuvent lutter contre les maladies causées par ces parasites. L'activité inhibitrice des bactériocines est liée par la dépolarisation de la membrane mitochondriale et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS= reactive oxygen species) comme indique Huang et al. (2021).

En plus de l'activité des bactériocines vis-à-vis les microorganismes pathogènes, ces agents bioactifs portent d'autres propriétés fonctionnels parmi elles :

Activités anticancéreuses, en tuant et en inhibant l'invasion de certaines cellules cancéreuses. Les bactériocines telles que : la nisine, ont montrés des activités anticancéreuses par différents mécanismes rapportés jusqu'à présent, y compris l'induction de l'apoptose cellulaire, le blocage du cycle cellulaire, l'inhibition de la migration cellulaire, suppression de l'expression des gènes de prolifération. Aussi la destruction de la structure de la membrane cellulaire et l'inhibition de la respiration mitochondriale et du métabolisme glycolytique (conduisant les cellules cancéreuses à manquer d'énergie) selon Joo et al. (2012) et Prince et al. (2019).

Les activités anti-inflammatoires et immunomodulatrices des bactériocines ont été rapportées par plusieurs études. En ce qui concerne l'effet anti-inflammatoire, les bactériocines

agissent soit directement sur les pathogènes ou bien au contraire certaines peuvent augmenter les niveaux de production des cytokines anti-inflammatoires par l'organisme. Pour la régulation immunitaire, certaines bactériocines peuvent favoriser la phagocytose des macrophages liés à la stimulation de la sécrétion des cytokines inflammatoires (Huang et *al.*, 2021).

## **2 Effet inhibiteur des bactéries lactiques contre les flores de contamination et d'altération**

Les pathogènes des aliments présentent un grand challenge pour la sécurité des aliments et pour la santé publique. Les flores de contamination sont soit une flore d'altération alimentaire qui engendre la dégradation des aliments sur le plan organoleptique et nutritionnel, soit une flore pathogène qui peut contaminer les aliments et causer des maladies.

Les flores de contamination alimentaire peuvent causer trois types des maladies : les intoxications, les infections et les toxi-infections. L'intoxication se produit par l'ingestion des aliments contaminés par des toxines d'origine bactérienne telles que les toxines produites par *S. aureus* ou les clostridies. Les infections résultent de l'ingestion des aliments contaminés par les bactéries vivantes elles même comme *salmonella* et *listeria* qui se multiplient et provoquent une infection. Enfin, la toxi-infection alimentaire est l'ingestion d'un aliment contaminé par la bactérie comme les clostridies puis cette bactérie produit des toxines, on parle d'une toxi-infection alimentaire (TIAC).

Les principaux germes pathogènes bactériens responsables de la contamination alimentaire sont : *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *Campylobacter spp*, *Salmonella sp*, *S. aureus*, *Vibrio spp*, *Shigella sp*, *Yersinia sp*, *E. coli* et *L. monocytogenes...etc* ; les virus : Hépatite A et *norovirus,etc* ; et les champignons : *Aspergillus*, *Penicillium,etc*.

Des études récentes indiquent que les bactéries lactiques avaient un large éventail d'effets antimicrobiens contre de nombreux agents pathogènes et de contamination alimentaire. Ces contaminants peuvent causer une gastro-entérite ou même la mort de sujet. Cependant, les bactéries lactiques doivent atteindre un niveau particulier avant toute interaction avec la bactérie pathogène. Au moment que la bactérie lactique a atteint le seuil approprié, les métabolites antimicrobiens sont libérés à des concentrations suffisantes pour inhiber la croissance des microbes néfastes (Gao et *al.*, 2019). Sans la réalisation de ces conditions, la croissance des contaminants ne sera pas affectée selon le même auteur.

## 2.1 Bactéries pathogènes de contamination alimentaire

- *Listeria monocytogene*

C'est une bactérie ubiquiste qui se trouve partout dans l'environnement, elle est très résistante aux conditions extrêmes du pH et de température. Ce pathogène peut survivre dans des conditions défavorables dans des nombreux types d'aliments comme : la viande, l'œuf, les produits laitiers, les fruits et les végétaux. Cette bactérie pénètre dans l'hôte en tant que contaminant alimentaire ou par les ports d'entrée dans la peau (plaie). La listériose est le nom commun utilisé pour inclure toutes les maladies causées par ce microbe. Cette maladie est caractérisée par une gastro-entérite et une méningite.

Des études ont été réalisées pour observer l'interaction entre les bactéries lactiques et *L. monocytogenes* dans les différents milieux de culture, et dans plusieurs cas les bactéries lactiques inhibaient la croissance de *L. monocytogenes* (Palmai & Kiskó., 2003 ; Zhu et al., 2014).

- *Staphylococcus aureus*

C'est un normal habitant du corps humain, le plus souvent trouvé dans le nez, mais également sur la peau et le vagin. C'est un commun agent pathogène nosocomial qui provoque des intoxications alimentaires, le syndrome de choc toxique, le syndrome de la peau échaudé (maladie de Ritter) et des abcès dans le corps. Le Centre de Contrôle et de Prévention des Maladies d'Etats-Unis (The Centers for Disease Control and Prevention ou CDC) a signalé que *S. aureus* est l'agent de contamination le plus courant (Dewey-Mattia et al., 2018). L'émergence des *S. aureus* capable de résister à la plupart des antibiotiques (*multi-drug resistant staphylococci* MDRS) comme par exemple : *S. aureus* résistant à la méthicilline a abouti à entreprendre des travaux approfondis par des chercheurs pour trouver des moyens pour inhiber et désactiver cette bactérie pathogène.

Plusieurs études ont prouvé l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques vis-à-vis du pathogène *S. aureus* (Heredia-Castro et al., 2015 ; Bian et al., 2016) . Certaines souches lactiques ont eu la capacité d'inhiber la multiplication de *S. aureus* même pour les espèces qui résistent aux antibiotiques (MDRS) ; ces souches appartiennent à différents genres lactiques tels que *Lactobacillus*, *Enterococcus* et *Lactococcus* (Gao et al., 2019).

### CHAPITRE III. PROPRIETES ANTIMICROBIENNES DES BACTERIES LACTIQUES

---

- ***E. coli***

C'est une bactérie à Gram négatif de la famille (*Enterobacteriaceae*) très répandue dans la nature et on peut la trouver dans le tractus intestinal de l'homme et de l'animal.

C'est une bactérie opportuniste qui ne devient pathogène que dans certaines conditions. Les souches les plus importantes sont celles du tractus digestif humain qui peuvent causer : une diarrhée, une infection des voies urinaires, un état septique et une méningite ; ainsi que les souches d'origine bovine qui sont différentes et nommées selon leur virulence ; ces sont *E. coli* entéro-pathogénique et *E. coli* entérotoxigénique, responsables de la diarrhée chez les nourrissons, *E. coli* entéro-invasive et *E. coli* entéro-hémorragique responsables de colite hémorragique, et du syndrome hémolytique et urémique, d'autre part *E. coli* entéro-aggrégative cause une diarrhée chronique (Bintsis, 2017).

*E. coli* est un agent de contamination alimentaire qui peut causer la maladie par ingestion des aliments contaminés tels que la viande. *E. coli* O157:H7 (*E. coli* entéro-hémorragique) est un très important pathogène pour l'homme qui est identifié comme agent causale de plusieurs épidémies (Bintsis, 2017).

Due l'importance de ce pathogène, des nombreuses études se sont beaucoup intéressées à l'activité inhibitrice des bactéries lactiques contre *E. coli* (Pishva et al., 2009 ; Langa et al., 2014 ).

- ***Salmonella***

C'est une bactérie de la famille (*Enterobacteriaceae*) et courante entéro-pathogène, habitant le tractus digestif très répandue chez les volailles, mais elle peut être trouvée dans les eaux et les aliments contaminés (Tableau 5), par le manque d'hygiène et des mesures sanitaires. Salmonellose est le nom commun qui englobe toute maladie induite par les salmonelles dont les signes cliniques sont : une gastroentérite, une typhoïde et une paratyphoïde (Leboffe & Pierce, 2011).

L'activité inhibitrice des BLs est montrée par plusieurs études (Heredia-Castro et al., 2015 ; Bian et al., 2016 ; Rahmeh et al., 2019).

Le tableau 4 représente certaines activités antimicrobiennes vis avis de *Salmonella*.

### CHAPITRE III. PROPRIETES ANTIMICROBIENNES DES BACTERIES LACTIQUES

---

- ***Campylobacter jejuni***

C'est une pathogène très courante chez l'homme et l'une des causes les plus fréquentes de maladies diarrhéiques. *Campylobacter spp* est considérée par l'union européenne comme l'agent de contamination alimentaire le plus signalé qui provoque l'intoxication des aliments. La transmission est généralement via l'ingestion des aliments contaminés dont le lait cru, la viande non cuite, etc. Cette bactérie s'attache aux cellules épithéliales et provoque la destruction de l'épithélium par sécrétion des toxines, ce qui se traduit cliniquement par une diarrhée (Leboffe & Pierce, 2011).

Certaines études ont montré les activités antimicrobiennes des bactéries lactiques contre cette bactérie de contamination alimentaire (Tableau 4).

- ***Bacillus cereus***

*Bacillus cereus* est une bactérie à Gram positif, membre de la famille de *Bacillaceae*. Elle est responsable de deux types d'intoxications alimentaires et causant des graves infections oculaires. L'intoxication alimentaire due à *B. cereus* se présente sous deux formes : la forme émétique et la forme diarrhéique. La forme émétique est causée par une entérotoxine thermostable produite par la bactérie pendant la phase de croissance dans l'aliment. La forme diarrhéique est causée par une entérotoxine thermolabile produite pendant la croissance des bactéries dans l'intestin grêle (Leboffe & Pierce, 2011). Les deux formes (diarrhéique et émétique) résultent du fait que les endospores de *B. cereus* survivent au processus de cuisson. Les spores qui survivent à la cuisson initiale germent et se multiplient rapidement, libérant une toxine qui n'est pas détruite par une nouvelle cuisson. Les aliments qui provoquent la forme diarrhéique sont la viande, les légumes, les sauces, le lait et les produits laitiers ; et la forme émétique sont le riz frit et cuit, les pâtes, les nouilles et la pâtisserie (Bintsis, 2017).

Certaines études ont révélé la sensibilité de *Bacillus cereus* à l'effet inhibiteur des BLs (Hernandez et al., 2005 ; Coman et al ., 2014).

- ***Clostridium botulinum***

*Clostridium botulinum* (Phylum *Firmicutes*) est un anaérobie sporulé que l'on trouve généralement dans le sol. En outre, les spores sont largement distribuées dans l'environnement. Il existe sept types de neurotoxine botulique, A, B, C, D, E, F et G selon la spécificité

### CHAPITRE III. PROPRIETES ANTIMICROBIENNES DES BACTERIES LACTIQUES

---

antigénique de la toxine produite par chaque souche. Les types A, B, E et F causent le botulisme chez l'homme, les types C et D chez les oiseaux et les mammifères, et le type G, n'a pas encore été clairement impliqué dans un cas de botulisme (Bacon & Sofos, 2003). Il existe quatre catégories du botulisme, dont le botulisme classique d'origine alimentaire dérivé de l'ingestion de la toxine préformée dans les aliments, aussi, le botulisme des plaies, le botulisme infantile, et le botulisme des adultes (Leboffe & Pierce, 2011).

Le botulisme d'origine alimentaire survient le plus souvent par l'ingestion d'aliments en conserve insuffisamment chauffés, Les spores qui restent sont viables dans l'aliment insuffisamment cuit germent et la population bactérienne qui en résulte prospère dans l'environnement anaérobie et riche en nutriments. Les symptômes neurologiques (dont la paralysée) sont les signes plus caractéristiques du botulisme (Tableau5).

- ***Clostridium perfringens***

*Clostridium perfringens* est un organisme sporulé très répandu dans le sol, que l'on trouve généralement dans le tractus gastro-intestinal de l'homme et d'autres mammifères. L'espèce est divisée en cinq types (A-E) en fonction des types de toxines (ou des combinaisons de toxines) qu'elle produit (Bacon & Sofos, 2003). Les types A, C et D produisent l'entérotoxine associée à la forme la plus bénigne d'intoxication alimentaire. Cette toxine thermolabile se trouve généralement dans la viande ou la volaille contaminée et leurs produits tels que les sauces ou les ragoûts. Les spores de *C. perfringens* qui survivent à la chaleur pendant la cuisson germent et produisent de l'entérotoxine lorsque les conditions deviennent favorables (Leboffe & Pierce, 2011).

Les études ont montrés l'activité inhibitrice des bactéries lactiques contre cette pathogènes (Tableau 4).

- ***Shigella spp***

Le genre *Shigella* est un membre de la famille des *Enterobacteriaceae* et possède quatre sérogroupes qui sont traditionnellement traités comme des espèces : le séro groupe A comme *Shigella dysenteriae*, le séro groupe B comme *Shigella flexneri*, le séro groupe C comme *Shigella boydii*, et le séro groupe D comme *Shigella sonnei*, qui sont tous responsables de la dysenterie bacillaire (shigellose) chez l'homme et quelques autres primates (Bacon & Sofos, 2003 ; Leboffe

### CHAPITRE III. PROPRIETES ANTIMICROBIENNES DES BACTERIES LACTIQUES

---

& Pierce, 2011). La shigellose peut survenir après l'ingestion d'eau ou d'aliments contaminés. Les *Shigella* spp n'ont pas été associées à un type spécifique d'aliments ; les aliments associés à des épidémies de shigellose comprennent le lait, le poulet et d'autres produits frais (Bintsis, 2017).

Tous les sérogroupes de *Shigella* peuvent causer des infections gastro-intestinales. Une fois les bactéries dans l'intestin, elles induisent une phagocytose par les cellules épithéliales de l'hôte où elles se multiplient puis se propagent dans un processus qui tue les cellules et forme des ulcérations de la muqueuse. Ce processus combiné à une réponse immunitaire aiguë est responsable de la diarrhée sanglante purulente caractéristique de la maladie (Leboffe & Pierce, 2011). Le tableau 4 présente certaines souches lactiques qui ont une activité inhibitrice vis-à-vis de certaines espèces de genre *Shigella*.

- ***Vibrio spp***

Le genre *Vibrio*, qui appartient à la famille des Vibrionaceae, contient plus de 35 espèces. Parmi les espèces de *Vibrio* pathogènes : *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, et *Vibrio vulnificus*

*V. cholerae* pénètre généralement dans le corps humain par l'ingestion d'un aliment contaminé, comme des mollusques (huîtres crues) ou des crustacés consommés crus, insuffisamment cuits ou même contaminés après cuisson (tableau 5), ou par l'exposition d'une plaie ouverte à une source d'eau contaminée. Une fois dans l'intestin grêle, l'organisme s'attache à la couche muqueuse et sécrète la toxine du choléra. Le résultat est la caractéristique "aqueuse" ou "diarrhée sécrétoire", qui est souvent mortelle en quelques heures (Leboffe & Pierce, 2011 ; Bintsis, 2017).

*V. parahaemolyticus* provoque une gastro-entérite et une diarrhée aqueuse parfois sanglante qui est typiquement associée à la consommation de produits aquatiques surtout des fruits de mer crus, insuffisamment cuits ou cuits mais recontaminés (Bacon & Sofos, 2003 ; Bintsis, 2017).

- ***Yersinia enterocolitica***

Le genre *Yersinia* appartient à la famille des Enterobacteriaceae. Parmi les espèces de ce genre, trois sont considérées comme pathogènes pour les humains ou les animaux. *Yersinia*

## CHAPITRE III. PROPRIETES ANTIMICROBIENNES DES BACTERIES LACTIQUES

*pestis* est l'agent causal de la peste, *Yersinia pseudotuberculosis* est principalement un pathogène pour l'animal mais peut infecter l'homme après l'ingestion d'eau ou d'aliments contaminés, et *Yersinia enterocolitica* est apparue comme une cause de gastro-entérite d'origine alimentaire chez les humains (Cary & Bhatnagar, 1999 ; Bacon & Sofos, 2003 ; Bintsis, 2017).

Plusieurs études concernant l'application des bactéries lactiques pour l'inhibition des autres bactéries, quelles que soit les bactéries de contamination alimentaire, ou autres bactéries pathogènes. Dans l'ensemble, ces études ont donné des résultats positifs (Tableau 4).

Tableau 4 : Inhibition des flores pathogènes et de contamination alimentaire par les bactéries lactiques

Bactéries lactiques	Bactéries pathogènes	Référence
<i>Enterococcus durans</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Enterococcus hirae</i>	<i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Enteritidis</i> <i>S. enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> <i>S. enterica</i> serovar <i>Gallinarum</i> <i>Escherichia coli</i> O157:H7 <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Campylobacter jejuni</i>	(Line et al., 2008)
<i>Lc. lactis</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	(Campion et al., 2013)
<i>L. casei</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. pentosu</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>E.coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Bacillus cereus</i> , <i>Salmonella Typhi</i> , <i>Shigella flexneri</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Proteus mirabilis</i> <i>Streptococcus mutans</i>	(Sharma et al., 2017)
<i>Pediococcus pentosaceus</i> FBB61	<i>Clostridium perfringens</i>	(Grilli et al., 2009)
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> F711	<i>Clostridium porogenes</i> <i>Shigella sonnei</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Hernandez et al., 2005)
<i>Lactobacillus sakei</i> KTU05-6 <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i> <i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Pseudomonas</i>	(Bungenstock et al., 2020)

### 2.2 Virus de contamination alimentaire

Les virus sont des micro-organismes de très petite taille, allant de 15 à 400 nm. Les virus provoquent des maladies variables chez les plantes et les animaux, Les virus de contamination alimentaire sont globalement excrétés en grand nombre dans les excréments humains (Chen et

## CHAPITRE III. PROPRIETES ANTIMICROBIENNES DES BACTERIES LACTIQUES

---

*al.*, 2018). Parmi ces virus il existe l'Hépatite A, le *Rotavirus* et le *Norovirus*. Ils peuvent être associés à des maladies allant de la diarrhée légère aux maladies neuronales graves. Néanmoins, les syndromes d'origine alimentaire les plus fréquemment rapportés sont la gastro-entérite et l'hépatite (Bosch et *al.*, 2016). Les virus les plus courants à l'origine des gastro-entérites sont le *Norovirus* et le *Rotavirus* (Bintsis, 2017). Le *Norovirus* a été reconnu comme le principal virus entérique responsable de 58 % des maladies d'origine alimentaire dans le monde (Marshall & Bruggink, 2011).

Chaque groupe de virus a sa propre gamme typique d'hôte et sa préférence cellulaire (spécificité à l'hôte et aux cellules), aussi ils sont stables sans l'hôte et la plupart d'entre eux sont résistants aux acides, mais des cellules vivantes sont nécessaires pour leur réplication et leur migration vers d'autres organes.

Les bactéries lactiques évoluent comme une nouvelle vague d'antagonistes contre certains virus de contamination alimentaire (*Rotavirus*, *Norovirus*, *Calicivirus* et *Coronavirus*), soit par la médiation de leurs métabolites, soit par l'inhibition compétitive du cycle viral (Li et *al.*, 2019 ; Daliri et *al.*, 2020). Bien que les virus ne se répliquent pas dans les aliments, l'incorporation des bactéries lactiques dans les aliments ingérés peut exercer un effet antiviral chez l'hôte (Daliri et *al.*, 2020) ou servir d'adjuvant oral potentiel (Kim et *al.*, 2018).

### 2.3 Champignons de contamination alimentaire

Les champignons peuvent provoquer l'altération des produits agricoles avant la récolte, et parfois aussi pendant les conditions de post-récolte (stockage), certains pouvant produire des mycotoxines (principalement les espèces : *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*), des enzymes, de la cellulose, des volatiles et des spores potentiellement allergènes (Dwivedy et *al.*, 2016). *L'aspergillus* et le *pénicillium* sont deux champignons courants du stockage, qui produisent des aflatoxines, les mycotoxines les plus puissantes connues (Abbaszadeh et *al.*, 2014). Les champignons toxigènes sont largement présents dans les aliments de l'animal et de l'homme. De plus, les conditions de réfrigération commerciale ne peuvent pas empêcher la croissance de ces champignons. Les mauvaises conditions de récolte et de stockage peuvent également contribuer à la croissance des champignons et augmenter la production de mycotoxines, qui ont une grande stabilité thermique et de multiples effets toxiques, ce qui constitue une menace potentielle pour la santé humaine et animale (Walbeek et *al.*, 1968).

### CHAPITRE III. PROPRIETES ANTIMICROBIENNES DES BACTERIES LACTIQUES

Dans l'industrie laitière, la contamination par des moisissures indésirables est un problème sérieux et souvent inquiétant qui entraîne des pertes énormes dues à l'altération du fromage et d'autres aliments fermentés incriminés par une variété des mycoflores telles que : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus* et *Mucor* (Chen et al., 2018).

Tableau 5 : Symptômes des pathogènes alimentaires (Bintsis, 2017 ; Chen et al., 2018)

Pathogènes alimentaires	Aliments couramment associés	Symptômes
<i>Listeria</i>	Lait cru, fromages à pâte molle, viandes de charcuterie et poissons fumés	Fièvre, douleurs musculaires, fausse couche, mortinaiance, gastroentérite, nausées et parfois diarrhée ou méningite
<i>Salmonella</i>	(Eufs crus, volaille, viande et produits laitiers crus	Diarrhée, dysenterie, fièvre et crampes abdominales, vomissement, arthrite.
<i>E. coli</i>	Les aliments contaminés d'origine animale : Viande hachée crue, lait cru, fruits et légumes crus	Diarrhée, crampes abdominales et parfois nausées et vomissements, infection du tractus urinaire.
<i>Campylobacter</i>	Volaille crue ou mal cuite, lait cru et eau contaminée	Diarrhée (souvent sanglante), crampes abdominales et fièvre dans les 2 à 5 jours suivant l'exposition
<i>Clostridium botulinum</i>	Conserves ou aliments conservés de manière inappropriée, en particulier les aliments à faible acidité tels que les viandes, les poissons et les légumes	Nausées, vomissements, fatigue, vertiges, maux de tête, vision double, gorge sèche, insuffisance respiratoire, paralysie.
<i>Vibrio</i>	Coquillages crustacés et mollusques crus ou mal cuits,	Diarrhée, vomissements, crampes abdominales, fièvre et frissons.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Viandes, lait, fromages et autres aliments prêts à manger	Nausées, vomissements, crampes abdominales et fièvre.
Norovirus	Les produits contaminés : Fruits et légumes crus, coquillages et eau contaminée	Douleurs abdominales, nausées, diarrhée et vomissements.
<i>Bacillus cereus</i>	Viande, lait et produits laitiers.	Diarrhée, vomissements, crampes abdominales.
<i>Yersinia enterocolitica</i>	aliments réfrigérés contaminés, Lait cru, fruits de mer, eaux usées contaminées	Diarrhée, fièvre, crampes abdominales
Rotavirus, Astrovirus, Adenovirus entérique		Fièvre, vomissements, diarrhée aqueuse non inflammatoire
Mycotoxine	Aliments de stockage	Effet neurotoxique, hépatotoxique, et immunosuppresseur

Certaines bactéries lactiques présentent d'excellentes caractéristiques antifongiques (Lynch et al., 2014 ; Aunbjerg et al., 2015 ; Russo et al., 2017) dues par exemple à l'acide acétique et à l'acide lactique (Chen et al., 2018).

## 2.4 Flores de contamination du lait et du fromage

Il existe plusieurs micro-organismes qui peuvent conduire à la contamination et à l'altération du lait cru et ses dérivés et peuvent engendrer des risques sur la santé publique (Perin et al., 2019). Ces microorganismes peuvent provoquer l'altération du produit en perturbant sa stabilité et donc la réduction de sa durée de vie. Certains sont des pathogènes pour l'homme ou peuvent causer des intoxications ou des toxi-infections. Parmi ces micro-organismes on peut citer : *Listeria monocytogene*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Campylobacter*, *Bacillus cereus*...etc.

En 2017 l'Union Européenne déclare que 2,2 % des toxi-infections alimentaires collectives signalées sont dues à la consommation du fromage (EFSA, 2018).

Plusieurs cas de salmonelloses signalées sont dus à des toxi-infections alimentaires par *salmonella* et essentiellement causées par *S. enteritidis*.

*E. coli* est parmi les agents pathogènes contaminant le lait et le fromage. Aux États Unis entre 1998 et 2011, 11 % d'infections relevées sont liés à la consommation des fromages fabriqués au lait cru et ont été causées par *E. coli* (O'Sullivan & Cotter, 2017).

Depuis 2005, la campylobactériose reste la maladie d'origine alimentaire signalée fréquemment au niveau de l'UE (EFSA, 2015). *Campylobacter* est une bactérie pathogène qui peut contaminer les produits laitiers fabriqués à base du lait cru (Bintsis, 2017).

En général, la plupart des bactéries contaminant le fromage sont originaires du lait cru. Il s'agit des agents pathogène de mammites tels que : *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, et *Campylobacter* (Eck & Gillis, 2006), ou autres agents d'infections générales tels que : *Brucella*, comme il peut s'agir des germes exogènes de contamination. En absence de traitement thermique (pasteurisation) pour les fromages préparés à partir du lait cru, les pathogènes peuvent se développer facilement dans les conditions favorables. Les pathogènes peuvent être endogènes (animale malade, mammite) ou bien exogènes (environnement).

La présence et le développement des contaminants dans le fromage sont limités par de nombreux facteurs comme : la qualité du lait, les conditions de fabrication, les propriétés physico-chimiques du fromage (pH, teneur en eau et l'activité de l'eau), les conditions de pré-affinage (salage) et le stockage.

**DEUXIEME PARTIE**  
**ETUDE EXPERIMENTALE**

---

**CHAPITRE I. MATERIEL ET METHODES**

### 1 Cadre et objectifs de l'étude

Ce projet doctoral a été réalisé au Laboratoire des Sciences et Techniques de Production Animale (LSTPA) situé à Hassi Mamèche, Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem en Algérie. La caractérisation génotypique des isolats obtenus a été réalisée au sein du Laboratoire de Biotechnologie Alimentaire de l'INATAA à Constantine.

L'objectif de cette étude intitulée « Potentiel inhibiteur du fromage J'ben » est de caractériser et d'évaluer le potentiel inhibiteur des bactéries lactiques du fromage traditionnel algérien le « J'ben » issu de la fabrication artisanale de la Wilaya steppique algérienne de Naâma (particulièrement la région de Mecheria) par :

L'évaluation de leurs propriétés antimicrobiennes, de leurs potentialités intrinsèques fonctionnelles et technologiques.

Pour réaliser cet objectif :

- On a tout d'abord procédé en premier lieu à des analyses physico-chimiques des échantillons du fromage frais de type J'ben en vue de leur classification selon leur teneur en matière sèche, en lactose, en matière grasse, en matière minérale et en protéines, leur humidité et le rapport G/S.
- En deuxième lieu la réalisation des analyses microbiologiques pour la caractérisation des bactéries lactiques autochtones en trois étapes :
  - L'isolement et l'identification des bactéries lactiques sur un plan phénotypique et génotypique pour 15 isolats ;
  - Révélation de la capacité inhibitrice des bactéries lactiques issues de l'écosystème du J'ben vis-à-vis des souches pathogènes et d'altération ; ainsi que l'interaction entre les souches lactiques isolées (interactions positives ou négatives). Enfin, l'évaluation de l'activité inhibitrice des souches isolées dans des différentes conditions ;
  - Détermination de certaines potentialités fonctionnelles et technologiques des souches lactiques isolées pour leur utilisation éventuelle comme des levains lactiques adaptables à une application semi-industrielle.

### 2 Localisation de la zone d'étude et des sites de prélèvement

#### 2.1 Localisation de la zone d'étude

La commune de Mecheria est le chef-lieu de la daïra dans la wilaya de Naâma en Algérie. Cette commune est située dans l'ouest algérien, elle est considérée comme l'un des carrefours qui relient le sud algérien à l'Oranie (Figure 5).

Elle est la commune la plus peuplée de la wilaya de Naâma, et l'une des plus importantes agglomérations urbaines de la steppe Ouest.

La commune couvre une superficie de 736,25 km<sup>2</sup>, son territoire se situe au Nord-Est de la wilaya de Naâma, à 101 km d'Ain Sefra, 260 km de Tlemcen, 229 km d'Oran, et à 154 km de Saïda. Elle est dominée par le Djebel Antar qui culmine à 1721 m.

Le climat à Mecheria est semi-aride. La température moyenne est de 21.8 °C (06°C en hiver et 36°C en été). La moyenne des précipitations annuelles ne dépasse pas 300 mm.

Selon le recensement général de la population et de l'habitat de 2019 (ONS Algérien, 2019), la population de la commune de Mecheria est évaluée à 87 857 habitants, dont 85 948 habitants dans l'agglomération principale. Elle est la commune la plus peuplée de la wilaya de Naâma, et l'une des plus importantes agglomérations urbaines de la steppe ouest.

La région de Mecheria dispose d'un écosystème steppique aride, marqué par une grande diversité paysagère en relation avec une grande variabilité des facteurs écologiques. La région est à tradition pastorale avec une population composée essentiellement de pasteurs-éleveurs.

Mecheria dispose de bioressources naturelles dans divers secteurs ; des forêts, de l'apiculture, de l'agro-élevage et de la production de certains produits laitiers traditionnels dont un fromage typique à la région « le J'ben » produit d'une fermentation lactique par une flore lactique autochtone spécifique aux laits d'un cheptel laitier diversifié (bovin, ovin, caprin).

## 2.2 Sites de prélèvement

Pour entreprendre cette étude, l'échantillonnage du fromage a ciblé 05 fabriques de la région de Mecheria spécialisées dans la production du J'ben. Les 05 échantillons du fromage J'ben ont été obtenus des fabricants répartis dans la zone ciblée à partir des élevages bovins soumis à divers pratiques alimentaires pour augmenter la diversité :

**E1** : approvisionné à partir de Nehili (Nord) : alimentation au pâturage + concentré.

**E2** : approvisionné à partir d'El ksar (Nord) : alimentation en prairie.

**E3** : approvisionné à partir de Sidi Khelifa (Sud-Ouest) : alimentation d'une zone boisée en bosquet (composée d'arbustes et d'espèces végétales de la région).

**E4** : approvisionné à partir de Djebel Antar (Nord-Ouest) : alimentation d'une zone montagneuse.

**E5** : approvisionné à partir de Sidi Amar (Nord) : alimentation en céréales et en fourrage.  
Les cheptels des bovins laitiers sont de races croisées.

La date de prélèvement : 17 septembre 2019.

Les échantillons du J'ben ont été récupérés directement dans des récipients stériles et conservés à 4°C dans une glacière à thermorégulation pour des analyses lancées au niveau du laboratoire de recherche « Sciences et Techniques de Production Animale » (LSTPA) durant les 24 heures qui ont suivi les dates de prélèvements.

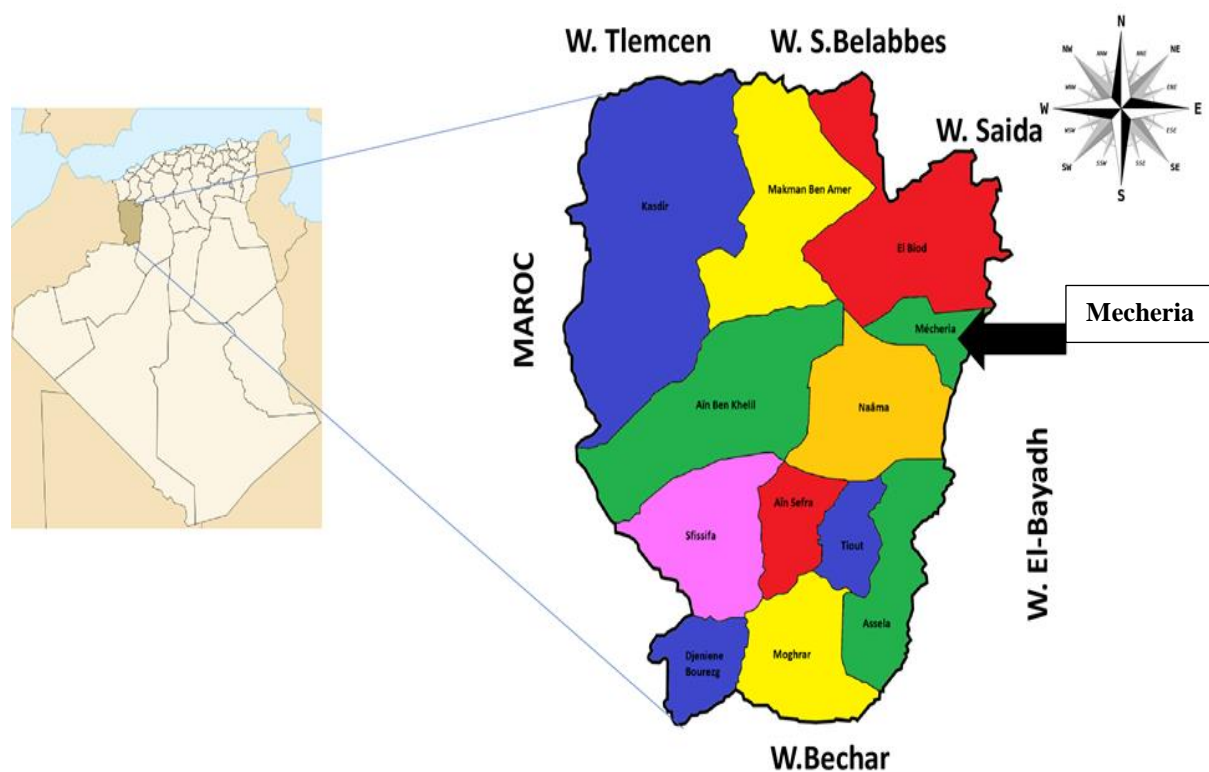


Figure 5: Zone d'échantillonnage

### 2.3 Diagramme de fabrication général du J'ben pratiqué par les fabricants

Le lait collecté a subi une filtration au remplissage dans une cuve à double paroi destinée au traitement thermique (de réchauffage) et à la maturation du lait. Le lait subi une maturation

naturelle à température ambiante (environ de 25°C) pendant 18 à 20 heures. Cette opération favorise la fermentation spontanée du lait, essentiellement en bactéries lactiques autochtones.

Le lait fermenté est légèrement chauffé à 40°C, avec une agitation lente pendant 15 à 30 minutes, ce qui provoque la formation d'un caillé lactique. La durée de formation du caillé est variable au dépend du la qualité physico-chimique du lait.

Après l'obtention d'un coagulum et la séparation d'une quantité de lactosérum, le caillé lactique obtenu est ensuite enroulé dans des sacs à base d'un tissu en mousseline pour continuer son égouttage. Ces sacs remplis de coagulum sont suspendus pour subir un égouttage spontané pendant 12 heures à 18°C. La durée de l'égouttage permet de retirer le maximum de lactosérum.

Le caillé égoutté est moulé dans des moules spécifiques au J'ben avec un léger pressage à l'aide d'une rehausse supérieure (contre- moule voir figure 6). Un seul retournement est effectué (après 02 heures du moulage).



Figure 6 : Moule et contre-moule utilisés dans la fabrication semi-industriel du J'ben

### **3 Analyses physico-chimiques des échantillons du fromage J'ben**

Les analyses physico-chimiques des fromages ont été établies selon le référentiel de la Fédération Internationale du Lait (FIL, 2018).

### 3.1 Potentiel d'hydrogène

Le potentiel d'hydrogène (pH) est une mesure de l'activité chimique des ions hydrogène. La mesure du pH est réalisée à l'aide d'un pH mètre avec une sonde à fromage de type HANNA® HI2210.

### 3.2 Matière grasse

La teneur de la matière grasse a été déterminée par la méthode acido-butyrométrique de Gerber. Cette méthode consiste à attaquer l'échantillon de fromage à tester, dans un butyromètre à fromage GERBER, par l'acide sulfurique puis à récupérer la matière grasse obtenue par centrifugation (à 1200 tours/min à 65°C) en présence d'alcool iso amylique (FIL, 2018).

### 3.3 Matière protéique

La teneur en azote total est déterminée par la méthode de Kjeldahl. Celle-ci consiste en la minéralisation de l'échantillon du fromage par chauffage en présence d'un mélange d'acide sulfurique concentré, de sulfate de potassium et de sulfate de cuivre, pour convertir l'azote organique de l'échantillon en sulfate d'ammonium. De la soude est ensuite ajoutée au produit de la réaction pour libérer de l'ammoniac en phase de distillation, qui est titré avec une solution d'acide chlorhydrique en présence d'acide borique (FIL, 2018).

Le calcul suivant sera ensuite appliqué, en considérant le facteur de conversion suivant : 1g d'azote total dosé après titrage en fin de distillation correspond à 6,25 g de protéines totales.

### 3.4 Eau et matière sèche

La teneur en eau et en matière sèche (extrait sec total) est déterminée comme suit : premièrement par évaporation au bain marie à 70°C puis par dessiccation de l'échantillon (10 g) pendant 3 heures dans une étuve à  $103 \pm 2^\circ\text{C}$  (FIL, 2018).

### 3.5 Lactose

Le lactose est déterminé par spectrophotométrie. Un gramme (1 g) de fromage est broyé puis est dissout dans 1 ml d'eau phénolée, additionné de 5 ml d'acide sulfurique et le tout est homogénéisé mécaniquement sur vortex (Cadillac) puis porté à ébullition pendant cinq minutes. L'absorbance est lue à 490 nm par rapport à un témoin préparé avec de l'eau distillée. Une courbe standard est réalisée à partir d'une solution mère contenant 1 g/l de lactose (FIL, 2018).

### 3.6 Matière minérale

La détermination de la matière minérale des fromages a été réalisée par la détermination du taux de cendres. Le taux de cendres est apprécié par calcination d'une prise d'essai de 3g de l'échantillon dans un creuset à une température de 500°C dans un four à moufle « LINN High Therm » pendant 5 heures, par la suite les cendres contenues dans les creusets sont transférées dans un dessiccateur puis pesées par une balance de précision (FIL, 2018).

$$\% \text{ cendres totales (matière minérale)} = \frac{M (\text{cendres}) \times 100}{M (\text{prise d'essai})}$$

## 4 Caractérisation microbiologique des bactéries lactiques

Les méthodes d'analyses, de caractérisation phénotypique ont été adaptées selon (Badis *et al.*, 2004a), Fanny *et al.* (2018) et Holzapfel & Wood, (2014).

### 4.1 Isolement et purification des bactéries lactiques

À partir des échantillons du fromage J'ben collectés, 10g ont été dilués avec 90ml d'eau physiologique et homogénéisés dans un broyeur-homogénéisateur de type Stomacher® 80 Biomaster. Après l'obtention de la solution mère, des dilutions décimales ont été préparées jusqu'à 10<sup>-7</sup>.

L'isolement des bactéries lactiques a été réalisé, d'une part, sur de la gélose MRS (Man Rogosa & Sharpe) et d'autre part sur de la gélose M17 à pH 6,5 (annexe). L'incubation a été effectuée en aérobie et en anaérobie à 30°C pendant 48 à 72 h.

La purification des isolats a été effectuée par des repiquages successifs sur les mêmes milieux d'isolement (MRS et M17). Les isolats purs ont été conservés à longue durée dans un milieu supplémenté par 20% de glycérol à une température de -20°C dans des eppendorfs.

### **4.2 Identification des bactéries lactiques**

#### **4.2.1 Pré-identification des isolats**

La pré-identification a été établie par la détermination de certains caractères distinctifs des bactéries lactiques (morphologiques, physiologiques et biochimiques) et établis comme suit :

##### **4.2.1.1 Test de la catalase**

Ce test permet de vérifier la capacité de la bactérie à produire l'enzyme de catalase.

Sur une lame, une goutte de l'eau oxygénée a été ajoutée à une colonie bactérienne ; la réaction positive se détermine par l'observation des bulles de gaz.

##### **4.2.1.2 Coloration de Gram**

Cette coloration débute par l'étalement sur une lame à l'aide d'une anse en platine d'une parcelle d'une colonie bactérienne sur une goutte d'eau stérile. Après émulsion et étalement du frottis en couche mince régulière, une fixation est effectuée, par passage 3 à 4 fois, d'une flamme d'un bec bunsen, puis le frottis a subi un séchage. Une coloration différentielle, appelée de Gram (annexes), est établie pour différencier les bactéries isolées en 02 groupes. Cette coloration est fondamentale pour l'identification des bactéries lactiques Gram positif. D'autre part, cette technique permet aussi d'observer la morphologie microscopique de ces BLs.

Seuls les isolats catalase négatif et Gram positif sont retenus et présumés comme des bactéries lactiques.

### **4.2.2 Identification phénotypique**

Les bactéries lactiques isolées du fromage traditionnel J'ben ont été identifiées en réalisant des méthodes classiques d'identification sur la base de tests morphologiques, physiologiques et biochimiques suivants :

### 4.2.2.1 Observation microscopique

Une observation microscopique a été établie avec un microscope optique OPTIKA B-292 au grossissement Gx100. Cette observation après coloration de Gram des frottis établis sur des colonies bactériennes purifiées et présumées lactiques.

La coloration des bactéries est un moyen d'augmenter leur contraste de manière à mieux les observer en microscope à fond clair. Dans les conditions normales, les procaryotes ont en général un pH intracellulaire neutre et une surface cellulaire globalement chargée négativement. Ceci explique l'efficacité des colorants basiques pour l'observation de la morphologie bactérienne.

L'examen microscopique de la forme et du mode d'organisation a permis de caractériser certains genres bactériens selon la forme tels que les lactobacilles, de même la mode d'organisation a facilité la caractérisation phénotypique de certains genres tels que le genre *pediococcus*.

### 4.2.2.2 Croissance à la température de 45°C

Une colonie bactérienne de 24h est transférée dans un tube qui contient le bouillon du milieu de culture spécifique. Après une incubation pendant 24h à 45°C, les bactéries sont appréciées pour leur croissance et par la formation d'un trouble caractéristique en comparaison avec un témoin négatif.

La capacité des bactéries lactiques à croître ou non à ce gradient de température en combinaison avec des tests phénotypiques a permis la caractérisation de certains genres.

### 4.2.2.3 Production du gaz à partir du glucose

Une colonie bactérienne d'une culture de 24h estensemencée dans un tube qui contient une cloche de Durham inversée puis incubée à 30°C pendant 24h à 48h. La production du gaz CO<sub>2</sub> est appréciée par l'accumulation des bulles dans la cloche (Badis et *al.*, 2004a).

Ce test est réalisé pour différencier les bactéries lactiques homofermentaires (qui ne produisent pas du gaz (CO<sub>2</sub>) à partir du glucose durant la fermentation) de celles

hétérofermentaires (qui sont capables de produire du gaz CO<sub>2</sub> à partir du glucose). Ce test est essentiel pour déterminer certains genres des bactéries lactiques soit de forme bacille ou coque.

#### **4.2.2.4 Tolérance au NaCl à la concentration de 6,5%**

Une culture de 24h estensemencée dans un tube qui contient le milieu de culture spécifique additionné du NaCl à la concentration de 6,5% (Bouillon hypersalé Annexes). Les tubes sont incubés à 30°C pendant 24h à 48h. L'apparition de la turbidité dans les tubes en comparaison avec le témoin est considérée comme une croissance positive (Badis et *al.*, 2004a).

L'évaluation de la tolérance des isolats lactiques au NaCl à une concentration de 6,5% est aussi un test fondamental pour la caractérisation du genre des bactéries lactiques en association avec les autres tests (la croissance à la température de 45°C), surtout pour différencier les entérocoques et les lactocoques.

### **4.2.3 Identification génotypique des isolats purifiés**

#### **4.2.3.1 Isolats retenus pour l'identification génotypiques**

Dans cette étude 15 isolats ont été caractérisés à échelle génotypique selon leur ADNr 16S. Les 15 isolats sont codés (KC01 jusqu'à KC15). Les étapes principales de l'identification moléculaire ont été réalisées comme suit :

Le Protocole d'identification est réalisé d'une part sur les différents isolats sélectionnés et d'autre part sur les souches de références utilisées au nombre de 4.

#### **4.2.3.2 Extraction de l'ADN**

L'ADN total bactérien est extrait selon la méthode d'extraction de (Cholet, 2006; Gevers et *al.*, 2001).

#### **4.2.3.3 Amplification de L'ADN par la PCR**

L'amplification des fragments d'ADN par la technique de la PCR est réalisée dans un cyclé de Biorad (Biorad, USA), en l'utilisant des amorces spécifiques pour les séquences

d'ADN codant la région ADNr 16S (Les séquences spécifiques des amorces utilisées sont du laboratoire Qbiogène Research Service Germany).

Tableau 6 : Composants de la solution mixte utilisée pour l'amplification d'ADNr 16S

Composant de la solution mixte	Concentration finale pour un volume finale de 20 $\mu$ l (pour un seul échantillon)
Solution Tampon	2.5 $\mu$ l
DNTP	2 $\mu$ l
Amorce (sens)	0.5 $\mu$ l
Amorce (antisens)	0.5 $\mu$ l
Taq polymerase	0.25 $\mu$ l
Eau distillé sterile	14.25 $\mu$ l

Les réactions de la PCR consistent à réaliser une mixture réactionnelle avec un volume de 20  $\mu$ l, qui est mélangée avec un volume de 4  $\mu$ l de l'ADN génomique, obtenu par extraction. Le tableau 6 illustre la mixture réactionnelle des composants utilisés pour l'amplification d'ADNr 16S.

Les tubes contenant l'ADN bactérien ont été placés dans un thermocycleur, et ont subi une pré-dénaturation à 94°C pendant 15 minutes.

Ensuite, le programme d'amplification a été exécuté selon trois étapes répétées en 35 cycles définis :

- Dénaturation à 94°C pendant 3 minutes.
- Hybridation des amorces à 53°C pendant 1 minute.
- Elongation (polymérisation) à 72°C pendant 2 minutes.
- Enfin, une étape d'extension finale est réalisée à 72°C pendant 5 minutes.

Les séquences amplifiées ont été visualisées à base d'une électrophorèse, sur gel d'agarose à 1.2%.

#### 4.2.3.4 Electrophorèse des produits de la réaction PCR

La visualisation de l'ADN sur le gel d'agarose est réalisée grâce à un colorant fluorescent, le bromure d'Ethidium (BET). Ce composé possède la propriété de s'intercaler entre les paires de bases des acides nucléiques. Le gel est visualisé dans l'obscurité à l'aide d'un appareil à UV puis photographié avec un appareil numérique.

### 4.2.3.5 Séquençage de l'ADN

Les produits de la PCR de l'ADNr 16S obtenus ont été purifiés et séquencés par l'utilisation des amorces spécifiques selon la technique décrite par Sanger. Les séquences obtenues sont comparées avec celles de la banque de données GeneBank par l'utilisation du programme blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) de NCBI.

Les différentes souches de référence utilisées sont :

- *Lactococcus lactis* ATCC 49032
- *Enterococcus faecium* ATCC 27270
- *Enterococcus durans* ATCC 19432
- *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 19254

## 5 Etude des interactions bactériennes

L'étude de différentes interactions bactériennes a été évaluée en utilisant de la méthode de diffusion en puits selon Bhola & Bhadekar (2019).

Brièvement, la méthode est comme suit :

Des bouillons de cultures jeunes des BLs et des bactéries indicatrices sont préparés avec une densité optique (DO) 0,5 (Norme McFarland) ;

Les bactéries indicatrices ont été écouvillonnées sur la totalité de la surface du milieu solide contenant du MH+MRS (v/v) comme indiqué dans les annexes.

Des puits de 6 mm de diamètre sont creusés sur ce milieu solide préalablement écouvillonné de la culture de la bactérie indicatrice.

Chaque puits creusé est inoculé de 50 µl de souche de BL correspondante.

Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées pendant 24h à 37°C puis observées pour la présence de zone d'inhibition.

### 5.1 Activité antimicrobienne des cultures bactériennes vis-à-vis des bactéries pathogènes

Nous avons évalué l'activité antimicrobienne de 15 souches de bactéries lactiques ayant subies une identification moléculaire par la technique de la PCR selon leur ADNr 16S.

L'activité antimicrobienne des souches est testée contre sept germes pathogènes (indicatrices) : *Serratia plymuthica*, *Staphylococcus warneri*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli 1*, *Escherichia coli 2*, *Staphylococcus aureus* et *Shigella sonnei*.

Les germes pathogènes, *Serratia plymuthica*, *Staphylococcus warneri*, *Enterobacter aerogenes* ont été récupérés du souchier du laboratoire LSTPA, isolés et identifiés par la méthode phénotypique (galerie Api-Staph et Api-20E pour *Staphylococcus* et *Enterobacteriaceae*, respectivement), dans le cadre d'un projet doctoral, qui a concerné l'étude de cas de mammites subcliniques (Meskini et al., 2021). Les germes pathogènes *Escherichia coli 1*, *Escherichia coli 2*, *Staphylococcus aureus* et *Shigella sonnei* sont des souches de références ATCC (Tableau 7).

Tableau 7 : Souches pathogènes indicatrices

La souche indicatrice	Origine
<i>Serratia plymuthica</i>	LSTPA
<i>Staphylococcus warneri</i>	LSTPA
<i>Enterobacter aerogenes</i>	LSTPA
<i>Escherichia coli1</i> (ATCC25922)	ATCC
<i>Escherichia coli2</i> (ATCC25922)	ATCC
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC29213)	ATCC
<i>Shigella sonnei</i> (ATCC 25931)	ATCC

### 5.2 Interactions entre les souches des bactéries lactiques sélectionnées

Les quinze souches isolées et identifiées génotypiquement par PCR ont été testées pour des inhibitions interactionnelles. Les interactions entre les souches ont été évaluées par la méthode de diffusion en puits sur un milieu solide (MRS) comme indiquée préalablement. Chaque souche a été étudiée comme indicatrice et comme inhibitrice. Ensuite, les boîtes de Pétri ont été incubées à 30°C pendant 24h puis une observation des zones d'inhibition a été faite et mesurée.

### 5.3 Activité synergétique des bactéries lactiques

Pour évaluer l'activité antimicrobienne en synergie, sept séries de bouillons de culture de trois souches : *Enterococcus durans* KC01, *Enterococcus faecium* KC02 et *Enterococcus*

*faecium* KC03 individuelles ou en combinaison, ont été préparées comme décrit ci-dessous pour tester leur activité antimicrobienne contre la culture standard d'*Escherichia coli*.

Les combinaisons sont obtenues en mélangeant des volumes égaux des souches concernées. Les séries sont comme suit :

I : KC01.

II : KC02.

III : KC03.

IV: KC01 + KC02 (v/v).

V: KC01 + KC03 (v/v).

VI: KC02 + KC03 (v/v).

VII: KC01 + KC02 + KC03 (v/v/v).

L'activité antimicrobienne a été déterminée par la méthode de diffusion en puits sur un milieu solide (MRS) selon Bholá and Bhadekar (2019) comme décrite préalablement.

### **5.4 Détermination de l'agent inhibiteur**

Les bactéries lactiques sont capables d'inhiber les autres microbes (bactéries, champignons... etc.) via la production des agents inhibiteurs qui sont des métabolites résultant de différents processus métaboliques, parmi ces agents inhibiteurs on peut citer : les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, et les bactériocines. Les tests de détermination de l'agent inhibiteur ont été réalisés par la méthode de diffusion en puits comme indiquée au-dessus.

#### **5.4.1 Préparation du surnageant**

Les bactéries lactiques sont cultivées dans le bouillon MRS puis incubées à 30°C pendant 24h. La culture a été centrifugée pendant 8 minutes à 10000 tours/min pour avoir un surnageant sans culture.

### 5.4.2 Activité antimicrobienne du surnageant

D'abord, l'activité antimicrobienne du surnageant (sans traitement) a été évaluée par la méthode de diffusion en puits contre les bactéries indicatrices suivantes : *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

Après, les surnageants sans culture ayant une activité antimicrobienne ont subi des différents traitements pour déterminer l'agent inhibiteur :

Les surnageants sans culture ont été neutralisés au pH 6.5 par 1M NaOH pour éliminer l'effet inhibiteur des acides organiques (Goa et *al.*, 2022).

Pour tester la sensibilité des molécules antimicrobiennes produites par les souches des BLs sélectionnées aux différentes enzymes, des volumes égaux (v/v) de surnageant neutralisé et d'enzymes suivantes : catalase, trypsine et chymotrypsine à une concentration finale (2mg/ml) ont été incubés à 37°C pendant 2 heures (Goa et *al.*, 2022). Le traitement du surnageant par la catalase a pour objectif d'éliminer l'effet du peroxyde d'hydrogène. Aussi, l'utilisation des enzymes protéolytique (trypsine et chymotrypsine) a pour objet d'évaluer la sensibilité des agents inhibiteurs de nature protéique (les bactériocines).

L'évaluation de l'activité antimicrobienne du surnageant traité par l'enzyme contre les bactéries indicatrices a été réalisée par la méthode de diffusion en puits. Le surnageant sans enzymes a été utilisé comme témoin de contrôle.

### 5.4.3 Sensibilité aux enzymes protéolytiques et à la catalase

La sensibilité aux enzymes protéolytiques et à la catalase des composés antibactériens a été étudiée par l'ajout de la trypsine et de la chymotrypsine à une concentration finale de 1 mg/ml au surnageant qui contient de la culture bactérienne (Ammor et *al.*, 2006). Les échantillons ont été incubés pendant 3 h à 37°C pour désactiver les enzymes et immédiatement, l'activité résiduelle a été déterminée par la méthode de diffusion en puits comme déjà décrite ci-dessus.

### 5.4.4 Sensibilité à la chaleur

La sensibilité à la chaleur des composés antibactériens a été étudiée en traitant les surnageant des cultures dans un bain-marie à 80°C pendant 10 minutes (Ammor et *al.*, 2006).

Immédiatement après, les échantillons ont été refroidis à 4 °C et l'activité résiduelle a été déterminée par la technique de diffusion en puits comme décrite ci-dessus.

### 5.4.5 Quantification de l'agent inhibiteur

L'acidité totale titrable a également été mesurée pour déterminer la quantité d'acide lactique produite selon l'AOAC (1990). Le lait écrémé reconstitué à (10% w/v) a été inoculé avec la souche bactérienne à (1% v/v), puis incubé à 37°C pendant 24 heures. Après incubation, 03 gouttes de phénolphtaléine ont été ajoutées comme indicateur de virage, puis le lait inoculé a été titré avec de l'hydroxyde de sodium 0,1M (NaOH) jusqu'à l'apparition d'une couleur rose qui doit persister pendant quelques secondes.

Chaque ml de NaOH 0,1M équivaut à 90,08 mg d'acide lactique.

Acidité totale titrable de l'acide lactique (mg/ml) = ml NaOH x N NaOH x M.E / Volume de l'échantillon utilisé

Où : ml NaOH = Volume de NaOH utilisé,

N NaOH = Molarité du NaOH utilisé,

M.E = Facteur d'équivalence = 90,08 mg.

## 5.5 Effet des facteurs cultureux sur l'activité inhibitrice

### 5.5.1 Effet du milieu de culture

Le milieu de culture influence le métabolisme bactérien selon leur composition en nutriments, l'influence sur le métabolisme se reflète sur la production des différents métabolites à activité antimicrobienne comme les bactériocines.

Les différents milieux de culture MRS, M17 et Mueller Hinton (MH) ont été testés pour leur effet sur l'activité inhibitrice.

Pour évaluer l'effet du milieu de culture sur l'inhibition, la méthode de diffusion en puits a été utilisée. Après incubation à 37°C pendant 24h, les boîtes de Pétri ont été observées pour la présence de zone d'inhibition.

### 5.5.2 Effet du NaCl

L'activité antimicrobienne peut être influencée par la concentration du NaCl, en particulier sur la production des bactériocines. Pour déterminer l'effet du sel NaCl, le milieu MRS a été supplémenté par des concentrations de 2%, 4% et 6% de NaCl. L'effet inhibiteur a été examiné par la méthode des puits. L'incubation a été réalisée à 37°C pendant 24h.

### 5.5.3 Effet du pH

Généralement le pH initial du milieu est considéré comme un facteur déterminant pour la croissance microbienne et la production des substances à activité antimicrobienne.

Pour déterminer l'effet du pH sur l'activité inhibitrice des bactéries lactiques. Le milieu MRS a été ajusté au pH 4.7 et 5.5. L'activité antagoniste vis-à-vis de la souche indicatrice a été réalisée par la méthode des puits comme décrite précédemment.

## 6 Etudes des aptitudes technologiques

### 6.1 Profil de bio-résistance des souches lactiques

#### 6.1.1 Température de croissance

Les souches ont été testées pour leur capacité de croissance à diverses températures qui sont : 15°C, 30°C et 45°C.

Des tubes de bouillon MRS ont été inoculés par une culture d'une souche lactique sélectionnée. Les tubesensemencés ont été incubés comme suit : pendant 24h à 72h pour les températures de 30°C et 45°C ; et pendant 7 jours pour la température de 15°C (Badis et *al.*, 2004b).

#### 6.1.2 Test de la thermorésistance

Le test de la thermorésistance est réalisé pour évaluer la capacité des souches à survivre après un traitement thermique de 60°C pendant 30 minutes (Samelis et *al.*, 1994). Les souches lactiques inoculées dans des tubes MRS ont subi le traitement thermique dans un bain marie.

Après ce traitement les souches ont été incubées à 30°C pendant 24 à 48h. Toute thermorésistance est perçue par un trouble caractéristique.

### 6.1.3 Tolérance au NaCl

Les souches ont été aussi évaluées pour leur capacité de croître dans un milieu hypersalé. Les cultures ont étéensemencées dans un bouillon à base du milieu de culture composé de (glucose 0.5%, extrait de viande 0.5%, peptone 1.5% additionné des concentrations de 6,5% de NaCl) puis incubées à 30°C pendant 24 à 72 h (Badis et *al.*, 2004b).

La croissance bactérienne est appréciée par l'apparition d'un trouble dans les tubes.

## 6.2 Profil métabolique des souches lactiques

### 6.2.1 Production du gaz à partir du glucose

Cette propriété est déterminée en utilisant des tubes du milieu MRS contenant des cloches de Durham inversé. Le milieu est inoculé par la souche bactérienne et incubé à 30°C pendant 24h à 48h. La production de gaz (CO<sub>2</sub>) se traduit par l'apparition de bulles dans la cloche (Badis et *al.*, 2004b).

### 6.2.2 Hydrolyse de l'esculine et de l'arginine

La capacité d'hydrolyser l'esculine est évaluée sur milieu gélosé à esculine (annexes). Après ensemencement des souches dans le milieu esculine, les boites de Pétri sont incubées à 30°C pendant 1 à 2 jours. L'activité enzymatique de l'hydrolyse de l'esculine s'exprime par un noircissement du milieu.

L'hydrolyse de l'arginine est testée sur un milieu gélosé additionné de l'arginine à 1%, en utilisant le rouge de phénol comme indicateur de pH (annexes). Les eppendorfs utilisés sont recouverts de l'huile de paraffine. Après ensemencement, l'incubation est réalisée à 30°C pendant 24h à 48h. La réaction est considérée comme positive si la couleur est virée vers le rose (Thomas, 1973).

### 6.2.3 Profil fermentaire des sucres

La fermentation des sucres a été évaluée dans le bouillon MRS modifié (MRSm) contenant du rouge de phénol (0,01 g/l) comme indicateur de pH. Le sucre a été ajouté au bouillon (MRSm) pour atteindre une concentration finale de 1% (w/v). Les hydrates de carbone testés sont le lactose, le glucose, le fructose, le maltose, le saccharose, le mélibiose, l'arabinose, le galactose, le raffinose, le xylose et le cellobiose. Pour assurer les conditions d'anaérobiose, chaque puits de microplaque rempli a été complété par deux gouttes de paraffine liquide stérile (Samelis et *al.*, 1994).

### 6.3 Activités protéolytiques et lipolytiques des souches lactiques

#### 6.3.1 Activités protéolytiques

Les souches sélectionnées ont été examinées pour leur activité protéolytique sur un milieu solide composé de caséine 0,5 %, d'extrait de levure 0,25 %, de dextrose 0,1 % et d'agar 1,5 %, additionné de 10 % de lait écrémé reconstitué. Des puits de 6 mm de diamètre ont été préparés sur la boîte de Pétri. Chaque puits a été inoculé par 50  $\mu$ l de la culture bactérienne. Les boîtes de Pétri ont été incubées à 30°C pendant 24h. L'existence d'une zone claire ou opaque entourant les puits indique une activité protéolytique positive (Silva et *al.*, 2019).

#### 6.3.2 Activités lipolytiques

La gélose à la tributyrine 10 % (annexes) a été utilisée pour évaluer l'activité lipolytique. Les boîtes de Pétri ont été incubées à 30°C pendant une 24h. L'activité positive a été définie par l'apparition de zones propres autour des puits dans la gélose à la tributyrine (Silva et *al.*, 2019).

### 6.4 Activité hémolytique des souches lactiques

L'hémolyse a été évaluée dans un milieu sélectif à base de gélose au sang Columbia additionnée de 5% de sang de mouton et incubée pendant 48 heures à 30°C (Jikang & Wenxiang, 2019). Les boîtes de pétri ont été examinées pour la présence de  $\beta$ -hémolyse (zones claires autour des colonies),  $\alpha$ -hémolyse (zones vertes autour des colonies), ou  $\gamma$ -hémolyse (pas de zones autour des colonies).

### 6.5 Production des exopolysaccharides par les souches lactiques

La capacité des isolats à produire des exopolysaccharides a été examinée selon la méthode décrite par Manini et *al.*, (2016). Les isolats ont été cultivés dans des boîtes de gélose MRS contenant du glucose (20g/L) pendant 5 jours à 30°C. Les boîtes de Pétri ont été examinées en fonction de l'apparition de colonies larges, visqueuses avec une propriété mucoïde.

### 6.6 Profil d'acidification des souches lactiques

Une culture jeune de 24h des souches lactiques sélectionnées a été inoculée (1% v/v) dans du lait écrémé reconstitué (10% w/v) et incubée à 37°C pendant 24h. Le pH a été mesuré à 0h, à 6h et à 24h à l'aide d'un pH-mètre étalonné. Pour estimer l'activité acidifiante, le test a été effectué en 02 répétitions.

L'acidité titrable totale est mesurée en degré Dornic (°Dornic) :

1°Dornic = 0.1g d'acide lactique/l de lait.

# CHAPITRE II. RESULTATS ET DISCUSSION

## 1 Analyses physico-chimiques du fromage J'ben

Les résultats des analyses physico-chimiques des fromages ont été comparés à la norme du *Codex alimentarius* standard 221-2001, les normes de FAO/OMS ([www.fao.org](http://www.fao.org)) et FIL (2018) : Pour les fromages non affinés y compris pour le fromage frais. Ces résultats sont présentés dans le tableau 8.

### 1.1 Potentiel d'hydrogène

Les résultats obtenus montrent une certaine variabilité du pH des fromages étudiés (pH entre 4,10 et 4,92). Ces valeurs, d'après FIL (2018), sont dans l'intervalle du pH d'un fromage frais. Le pH idéal d'un fromage frais est compris entre 4,5 et 4,9. Le pH joue un rôle important dans la texture du fromage (*Codex alimentarius* standard 221-2001). Un pH inférieur à 4, induit à une texture friable du fromage, un potentiel supérieur à 6, génère une structure trop molle. La variabilité du pH des fromages frais est sous l'influence de plusieurs facteurs liés à la richesse du lait en lactose (variable selon l'espèce animale), à la diversité de la microflore lactique et à l'alimentation du cheptel laitier. Le pH des fromages frais peut descendre jusqu'à 4,50 dans le Katiki (fromage frais italien au lait de chèvre), ou même atteindre une acidité aussi intense avec un pH autour de 3,80 dans le Galotyri (fromage frais italien au lait de brebis) selon Gobbetti et *al.*, (2018b). Plusieurs études dont celles de Dahou, et *al.*, (2015), Meghoufel, (2019) ont montré que le J'ben de Naâma en Algérie (même région) présente un pH compris entre 4,20 et 4,80 et varie selon la saison, la période de lactation et l'espèce animale.

Tableau 8 : Résultats physico-chimiques des échantillons de fromage J'ben étudiés

	E1	E2	E3	E4	E5
pH	04,10	04,74	04,52	04,68	04,92
Matière grasse	07,10%	06,25%	07,38%	08,25%	05,88%
Matière protéique	08,15%	06,78%	09,05%	07,89%	05,45%
Matière sèche	27,20%	22,50%	30,02%	29,83%	19,95%
Eau	72,80%	77,50%	69,98%	70,17%	80,05%
G/S (Gras sur sec)	26,10%	27,78%	24,58%	27,66%	29,47%
Lactose	08,25%	07,12%	08,38%	08,16%	06,42%
Matière minérale	03,65%	01,82%	04,41%	03,88%	01,52%

E: échantillon ;

E1 : Nehili; E2 :El ksar; E3 : Sidi Khelifa; E4 : Djebel Antar ; E5 : Sidi Amar

La flore microbienne, composée essentiellement de flore lactique, est responsable du pH du fromage, cette flore diminue le pH du lait autour du point isoélectrique qui permet la coagulation du lait, une phase importante de la transformation fromagère. La diminution du pH permet de bio-préserver naturellement le fromage et d'augmenter sa durée de vie.

### 1.2 Matière grasse

La matière grasse est un composant important du fromage qui représente la valeur nutritionnelle du produit. Elle peut influencer la texture et l'arôme du fromage et permet sa classification.

La teneur de la matière grasse du fromage est liée essentiellement à l'origine du lait. Un lait de vache présente un taux de matière grasse variable de 35 à 45g/l. Celui-ci est aussi sous l'influence de plusieurs facteurs tels que la race de l'animal, la saison, l'alimentation et la phase de la lactation.

En technologie de transformation fromagère, la teneur en matière grasse est d'une importance pour la classification. Selon les normes internationales pour les fromages (Codex Standard 221-2001), cette teneur est exprimée en pourcentage de matière grasse dans l'extrait sec G/S ou (Gras sur sec) et permet de déterminer 5 classes différentes. Les résultats physicochimiques de nos échantillons du fromage J'ben ont montré que le pourcentage en G/S (Gras sur sec) est entre 24,58 et 29,20 %. A partir de ces résultats nos échantillons sont classés dans la catégorie des fromages frais mi-gras ayant un G/S égale ou supérieur à 25% et inférieur à 45%.

Pour nos échantillons de fromage J'ben, le taux de la matière grasse varie entre 5,88 et 8,25 % comme rapporté dans le tableau 8. Ce taux est inférieur à celui de Meghoufel, (2019) qui a obtenu une teneur en matières grasse variant entre 8,5 et 13% pour un fromage J'ben de chèvre et à celui de Amimour, (2019) avec une valeur qui varie entre 7.63 et 12.32% pour des fromages J'ben (fromages contrôles) préparé du lait de vache. Hamama & Bayi, (1991) ont rapporté une valeur plus élevée ( $16.47 \pm 3.66\%$ ) dans un fromage J'ben marocain.

### 1.3 Matière protéique

Parmi les produits laitiers, le fromage est un aliment nutritif qui renferme tous les acides aminés indispensables qui couvrent les besoins de l'homme. C'est un aliment à haute valeur biologique qui contient des protéines nutritionnelles hautement digestibles. A l'instar de tous les fromages, la teneur de nos échantillons en protéines est essentiellement liée à la richesse du lait transformé en matière protéique. Il est noté que ce taux est de l'ordre de 3,2 à 3,4% dans le lait de vache.

Le taux de matière protéique est très variable dans les différents types de fromage. Il est lié aux facteurs extrinsèques comme le lait d'origine et aux facteurs intrinsèques comme la technologie de fabrication, sa teneur en eau, matière sèche, etc.

Les résultats obtenus dans les échantillons étudiés ont montré que la teneur en matière protéique varie entre 5,45 et 9,05 % ce qui constitue une plage de variation large pour ce type de fromage. Ces résultats sont plus bas de ceux de Meghoufel, (2019) qui a observé des valeurs variant entre 13,25 et 18,97% pour le fromage J'ben de chèvre, et celles de Hamama & Bayi, (1991) pour le J'ben marocain ( $15.8 \pm 3.2\%$ ). Nos résultats sont proches de ceux de Mohamed & El zubeir, (2018) qui ont montré une valeur de 7,7% pour un fromage blanc traditionnel du Soudan.

Comme la matière grasse, le taux protéique est variable d'un échantillon à un autre, qui serait influencé par les différents facteurs précédemment cités (race de l'animal, saison, alimentation et phase de la lactation).

### 1.4 Eau et matière sèche

D'après les résultats obtenus, nous constatons que la teneur en matière sèche de nos échantillons du fromage varie entre 19,95 à 30,02 % ce qui constitue une grande marge entre les échantillons. Tandis que la teneur en eau est variable entre 69,98 et 80,05%. L'étude d'Amimour, (2019) a montré que les teneurs des échantillons prélevés du fromage J'ben ont été de  $30.23\% \pm 4.38$  et de  $69.77\% \pm 4.38$  pour la matière sèche et la teneur en eau respectivement.

D'après les normes FAO/OMS N°A-6, ces teneurs permettent de classer nos fromages dans la catégorie du fromage à pâte molle (contient plus de 50–65% d'eau).

Selon la norme FAO/OMS N°A-6, les fromages à coagulation par voie lactique contiennent une faible teneur en matière sèche (20-25%), qui est en concordance avec nos résultats qui sont dans ou proches de cette intervalle.

La durée de la maturation du fromage est généralement inversement proportionnelle à la teneur en eau (Fox & McSweeney, 2017), expliquant pourquoi les fromages frais qui contiennent beaucoup d'eau subissent une courte maturation. Ils doivent être consommés rapidement car la teneur élevée en eau peut favoriser l'altération et la putréfaction du produit.

D'après les résultats obtenus, nos fromages présentent une teneur en eau et en matière sèche variable. Ces teneurs permettent de classer nos fromages dans la catégorie des fromages frais à caillé lactique de type pâte molle.

### 1.5 Lactose

Le taux lactose dans nos fromages est entre 6,42 et 8,38%. Ce taux est très élevé par rapport à la norme des fromages frais comme le fromage blanc qui est environ 3% de lactose. Ainsi que des résultats inférieures ( $4.1 \pm 0.1\%$ ) ont été rapportés par Hamama & Bayi, (1991).

Lactose est un très important sucre, un disaccharide présent dans le lait et les produits laitiers. Dans les fromages à coagulation par voie lactique, les flores lactiques utilisent cet élément pour la production de l'acide lactique qui favorise la production du coagulum pour obtenir un fromage. Le taux de lactose est diminué avec le temps dans le fromage (utilisé par les bactéries lactique) et on peut dire que la variation de taux de lactose dans les fromages est selon sa flore lactique, sa durée de vie, et bien sûr la teneur du lait transformé. Le taux élevé observé pose un problème pour les personnes ayant une intolérance au lactose et serait dû à une courte durée de conservation.

A la phase de la maturation et d'affinage du fromage, le processus d'acidification lactique continue par métabolisme du lactose résiduel en acide lactique. L'acide lactique permettant le développement de certains critères organoleptiques ainsi que la bio-protection du fromage contre les agressions par les agents d'altération bactériens et fongiques.

### 1.6 Matière minérale

La fraction minérale du lait joue un rôle important en technologie laitière et plus précisément fromagère (coagulation-synérèse et texture du caillé fromager). En effet toute modification dans la répartition minérale se répercute sur les propriétés technologiques des laits et les propriétés rhéologiques du coagulum, soit du fromage à caillé lactique (Desmaures, 1995 ; Eck *et al.*, 2006).

D'après les résultats obtenus (tableau 8), la matière minérale des fromages étudiés est en dessous de la norme tolérable (4,5 à 5,2) recommandée par la FIL Référence ISO 707/ FIL (2018) soit avec une différence notable constatée dans les échantillons de fromage avec une moyenne variable entre 1,52 et 4,41%. Cette variation serait due au lait, aux techniques de fabrication et au degré d'égouttage effectué (teneur en eau). Plus l'égouttage est poussé plus la teneur minérale est élevée (Fox & McSweeney, 2004).

D'après Hamama & Bayi (1991) le taux la matière minérale dans le J'ben marocain a été de  $1.26 \pm 0.28\%$ . Amimour, (2019) a trouvé un taux de  $2.19 \pm 0.27\%$  (entre 2.05 et 3.02%) pour des fromages J'ben prélevés de la région d'Ain Sefra (Algérie).

### 1.7 Synthèse sur les résultats des analyses physico-chimiques

D'après les résultats physico-chimiques obtenus, le J'ben de Mecheria est classé dans la catégorie des fromages frais à caillé lactique mi-gras de type pâte molle.

Le fromage J'ben est un fromage traditionnel préparé à partir de lait cru, ce qui explique les variations des paramètres physico-chimiques des échantillons. Des larges variations de valeur des paramètres biochimiques entre les échantillons de produit traditionnel de type fromage a été observé par plusieurs auteurs. Mohamed & El zubeir, (2018) ont trouvé que le taux de matière grasse était entre 18 et 27%, le taux de matière protéique entre 7,7 et 17,2% et matière minérale entre 3.8 et 15.6% (dans un fromage frais soudanais). L'inconstance des paramètres a été aussi observée par Meghoufel, (2019) et Amimour, (2019) dans un fromage de type J'ben de la même région que la nôtre.

La variation des caractéristiques du fromage traditionnel de type J'ben dépend du lait cru utilisé dont les caractéristiques physico-chimiques sont influencées par l'espèce animale, sa race,

son alimentation, et les conditions zootechniques ou mode de vie (Poznanski et *al.*, 2004, Salmeron et *al.*, 2002).

## 2 Caractérisation microbiologique des bactéries lactiques

### 2.1 Identifications des isolats

#### 2.1.1 Pré-identification des isolats

Les isolats purifiés ont été soumis à une identification de la morphologie, de la réaction de Gram et du test de la catalase. Cent vingt-deux (122) isolats ont été Gram positifs, catalase négatifs, et considérés comme des bactéries lactiques.

À l'issue des observations microscopique tous les isolats sont révélés des coques.

Soixante-seize (76) isolats ont été testés en vue d'une caractérisation morphologique et phénotypique plus approfondies.

L'aspect microscopique et macroscopique de certains isolats est présenté dans les figures 7 et 8.

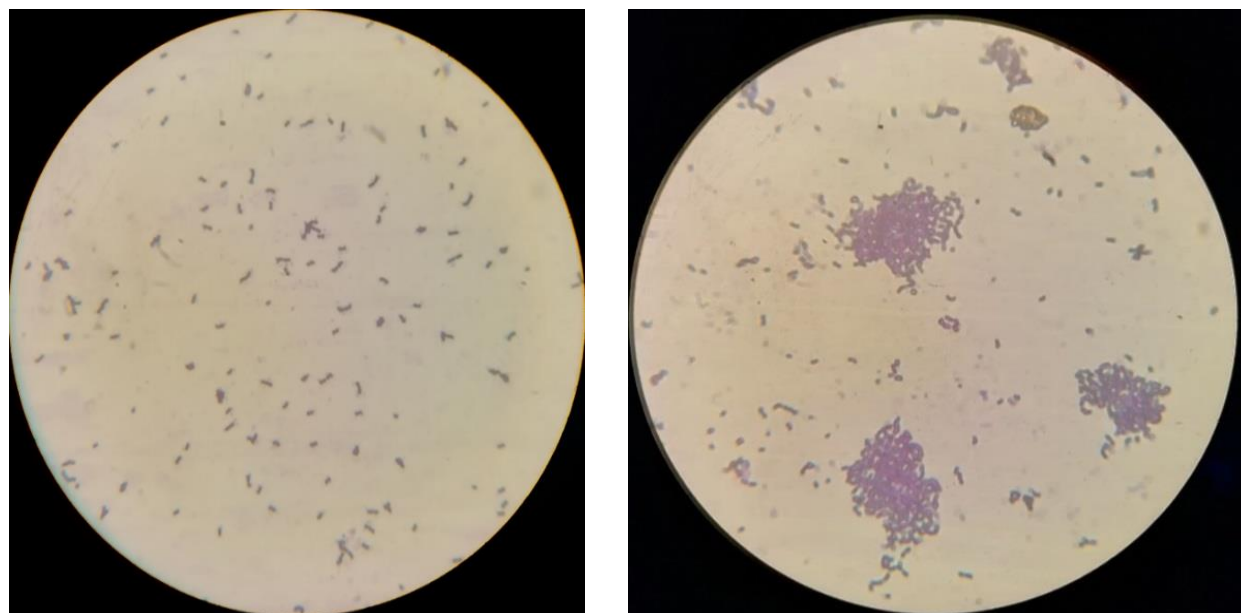


Figure 7 : Aspect microscopique des isolats (G\*100)

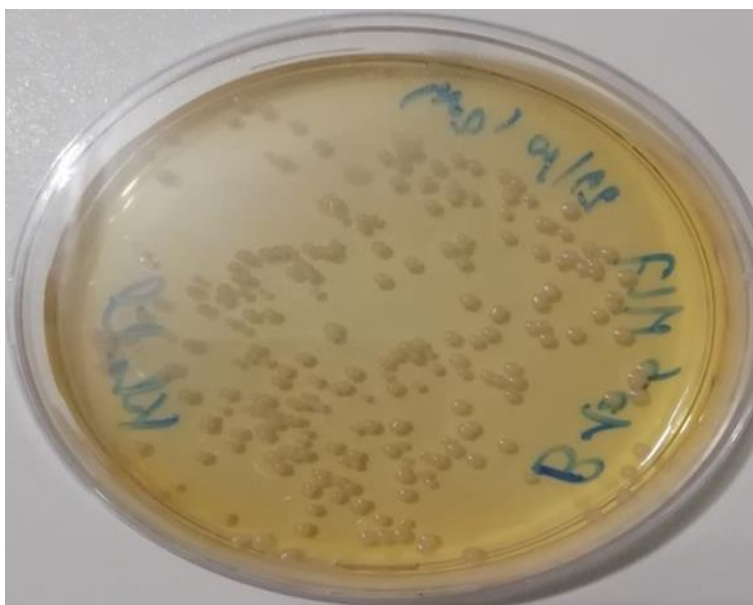


Figure 8 : Aspect macroscopiques des colonies des isolats

### 2.1.2 Identification phénotypique

Après pré-identification de 122 isolats considérés lactiques, 76 isolats ont été testés en vue d'une identification phénotypique.

Tous Les isolats ont été Gram positifs, catalase négatifs et en forme de Cocci.

Les résultats ont montré que la majorité des souches ont été capable de croître à 45C°.

Parmi les isolats, quatorze (14) souches ont été hétérofermentaire.

Pour la croissance à la concentration de 6,5% de NaCl, on a trouvé que la plupart des bactéries ont été tolérantes à cette concentration.

En se basant sur les résultats morphologiques, physiologiques et biochimiques, on a classé les isolats comme suit :

Les isolats qui ont été capables de croître à 45C° et à la concentration de 6,5% de NaCl ont été considérés appartenant au genre : *Enterococcus*.

Les isolats non capables de croître à 45C°, ni à la concentration de 6,5% de NaCl ont été classés parmi le genre *Lactococcus*. Les souches qui ont été capables de croître à 45C° mais pas à la concentration de 6,5% ont été aussi prises parmi le genre *Lactococcus*.

## RESULTATS ET DISCUSSION

Les isolats qui sont de forme en coque, hétérofermentaires et qui ont été capable de produire du gaz à partir du glucose sur les cloches de Durham, ont des critères qui répondent aux propriétés du genre *Leuconostoc*.

On a observé l'absence du genre *Bacillus* en se basant sur l'examen microscopique et aussi l'absence du genre *Pediococcus* qui se caractérise par l'organisation en paire ou en tétrade à l'examen microscopique.

La caractérisation morphologique et phénotypique de 76 isolats révélait aussi la dominance du genre *Enterococcus* (44 souches= 58 %), suivi par *Lactococcus* (18 souches = 24 %) puis le genre *Leuconostoc* (14 souches = 18 %), mais l'identification plus profonde est nécessaire pour confirmer ces résultats. Nos résultats sont similaires de celle de Meghoufel, (2019) et Meghoufel et al. (2019) qui ont trouvé que le fromage J'ben de Nâama préparé à partir du lait de chèvre contient 3 genres distincts : *Enterococcus*, *Leuconostoc* et *Lactococcus*, avec une dominance du genre *Enterococcus*.

La figure 9 montre la distribution des différents genres de bactéries lactiques identifiées phénotypiquement.

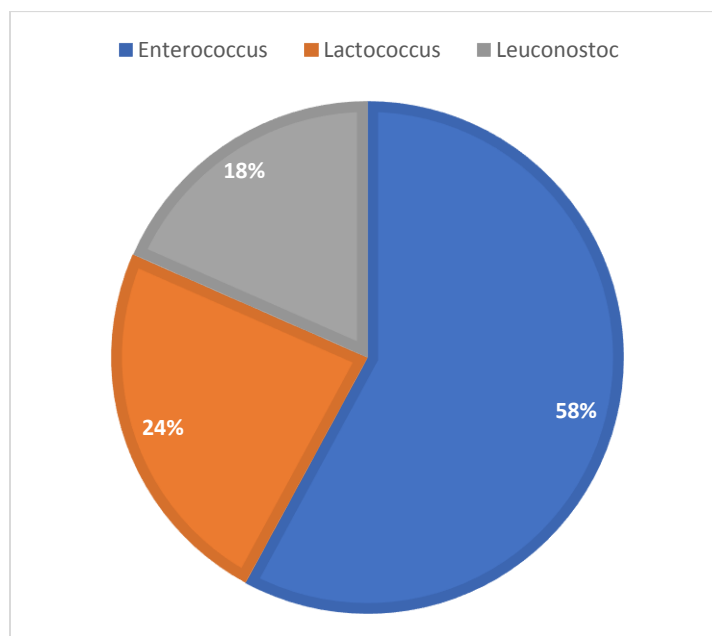


Figure 9 : Distribution des espèces de bactéries lactiques identifiées phénotypiquement

### 2.1.3 Identification génotypique

Après une identification phénotypique de 76 isolats, quinze isolats qui sont désignés par le code (KC01 jusqu'à KC15) ont été choisis et ont subi une identification génotypique comme indiqué dans le tableau 9.

Tableau 9 : Isolement et identification des bactéries lactiques à partir du fromage J'ben

Isolat	Test de catalase	Coloration de Gram	Espèce identifiée	Identité %
KC01	–	+	<i>Enterococcus durans</i>	100
KC02	–	+	<i>Enterococcus faecium</i>	100
KC03	–	+	<i>Enterococcus faecium</i>	100
KC04	–	+	<i>Enterococcus faecium</i>	100
KC05	–	+	<i>Enterococcus durans</i>	100
KC06	–	+	<i>Leuconostoc mesenteroide</i>	100
KC07	–	+	<i>Enterococcus durans</i>	100
KC08	–	+	<i>Leuconostoc mesenteroide</i>	100
KC09	–	+	<i>Enterococcus durans</i>	100
KC10	–	+	<i>Enterococcus durans</i>	100
KC11	–	+	<i>Leuconostoc mesenteroide</i>	100
KC12	–	+	<i>Lactococcus lactis</i>	100
KC13	–	+	<i>Enterococcus durans</i>	100
KC14	–	+	<i>Lactococcus lactis</i>	100
KC15	–	+	<i>Lactococcus lactis</i>	100

+ test positif ; –: test négatif

Etant donné que la caractérisation phénotypique ne donne pas une identification précise, les 15 isolats caractérisés par séquençage ont été aussi étudiés par électrophorèse sur gel d'agarose.

En effet, vu que le nombre de souches accordé pour étude génotypique est de 15, et que la comparaison des profils électrophorétiques directement sur le gel s'est avérée trop compliquée, il a été utilisé l'outil bioinformatique. Le logiciel Gel Compar II 6,5 qui nous a permis d'analyser avec précision les différents gels obtenus, afin de mieux comparer leur profil avec ceux des souches de référence incluses dans la base de données disponible au programme NCBI. Cette comparaison nous a permis d'identifier 15 isolats représentant 4 espèces.

Les photos des 4 gels d'électrophorèse des produits de (GTG)<sub>5</sub>-PCR sont présentées dans les figures 10,11, 12 et 13. Sur la figure 10, on trouve le gel sur lequel on a chargé les séquences des isolats KC12, KC14 et KC15 comme étant des *Lactococcus lactis* avec la souche de référence *L. lactis* ATCC 49032. La comparaison des profils à l'œil nu montre que les isolats

KC12, KC14 et KC15 ont des profils qui se ressemblent entre eux et avec la souche de référence surtout sur la partie située entre 300 bp et 600 bp. L'utilisation du logiciel bioinformatique Gel Compar II 6,5 nous a permis de mieux évaluer les ressemblances entre les différents profils. La figure 11, montre sur le dendrogramme obtenu après traitement du gel, qu'effectivement les isolats KC2, KC3 et KC4 forment un groupe avec plus de 99% de similitude que la souche de référence ATCC 27270 *Enterococcus faecium*. Cette similitude est dans la partie incluse entre 80 et 420 bp, ce qui permet de les identifier comme des *Enterococcus faecium* alors que les souches KC01, KC05, KC07, KC09, KC10 et KC13 (Figure 12) montrent des profils similaires à la souche de référence ATCC 19432 *Enterococcus durans* avec une ressemblance supérieure à 97% sur la bande des fragments électrophorétiques entre 120 et 310 bp.

La figure 13 montre la photo d'un gel d'électrophorèse des produits de (GTG)<sub>5</sub>-PCR des isolats identifiés phénotypiquement comme étant des *Leuconostoc mesenteroides*, avec la souche de référence *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 19254. Sur le gel on remarque que les trois isolats KC06, KC08 et KC011 présentent des profils similaires, identiques sur les zones situées entre 30 et 150 pb. Le traitement de ce gel par le logiciel Gel Compar II 6,5 confirme les ressemblances observées directement sur le gel (Figure 13).

Les données relatives à la séquence du gène de l'ADNr 16S ont révélé que les isolats KC01, KC05, KC07, KC09, KC10 et KC13 sont à 100% similaires à *Enterococcus durans*, tandis que les isolats KC02, KC03 et KC04 sont à 100% similaires à *Enterococcus faecium*. Les isolats KC06, KC08 et KC11 ont présenté une ressemblance de 100% avec *Leuconostoc mesenteroides*, tandis que les isolats KC12, KC14 et KC15 ont présenté une ressemblance de 100% avec *Lactococcus lactis* (Tableau 9).

La dominance du genre *Enterococcus* a été observée avec (9 souches) de 15 souches : *E. durans* (6 souches) et *E. faecium* (3 souches). Alors que *Lactococcus* et *Leuconostoc* sont représentés à un nombre équivalent de 3 souches de chaque genre.

Les résultats comparatifs entre l'identification phénotypique et génotypique des 15 isolats sélectionnés sont montrés dans le tableau 10. Ils ont été identiques à l'exception pour les souches KC05, KC07, KC09, KC10 (phénotypiquement *Leuconostoc* et génotypiquement *Enterococcus*) et KC13 (phénotypiquement *Lactococcus* et génotypiquement *Enterococcus*). L'identification génotypique est un moyen plus fiable pour la caractérisation des BLs surtout pour la détermination de l'espèce. Il est difficile de différencier phénotypiquement entre certaines

## RESULTATS ET DISCUSSION

bactéries comme par exemple entre les streptocoques et les lactocoques ce qui nécessite une caractérisation génotypique.

Tableau 10 : Résultat d'identification phénotypique et génotypique

Isolat	Identification phénotypique	Identification génotypique
KC01	<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus durans</i>
KC02	<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
KC03	<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
KC04	<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
KC05	<i>Leuconostoc</i>	<i>Enterococcus durans</i>
KC06	<i>Leuconostoc</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
KC07	<i>Leuconostoc</i>	<i>Enterococcus durans</i>
KC08	<i>Leuconostoc</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
KC09	<i>Leuconostoc</i>	<i>Enterococcus durans</i>
KC10	<i>Leuconostoc</i>	<i>Enterococcus durans</i>
KC11	<i>Leuconostoc</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
KC12	<i>Lactococcus</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
KC13	<i>Lactococcus</i>	<i>Enterococcus durans</i>
KC14	<i>Lactococcus</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
KC15	<i>Lactococcus</i>	<i>Lactococcus lactis</i>

D'après les études, les bactéries lactiques les plus isolées dans le lait cru et les produits laitiers sont *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* et *Lactobacillus* (Franciosi *et al.*, 2009; Karakas-Sen & Karakas, 2018).

Les bactéries lactiques sont naturellement présentes dans le lait et les produits laitiers. La diversité des LBs et la population dominante sont fortement influencées par le lait (son origine, sa qualité, etc.), la saison, les conditions environnementales des animaux (alimentation, etc.), processus et technique de fabrication du produit ainsi que les conditions hygiéniques de manipulation du lait (Siezen *et al.*, 2010 ; Gobbetti *et al.*, 2015 ; Tilocca *et al.*, 2020).

Les entérocoques font partie du microbiote dominant dans les fromages au lait cru (Jamaly *et al.*, 2010 ; Terzić-Vidojević *et al.*, 2015a). *Enterococcus spp* ont été présentés de manière significative dans certains fromages non affinés (Golić *et al.*, 2013 ; Terzić-Vidojević *et al.*, 2014b). Les trois espèces d'*Enterococcus* (*Enterococcus durans*, *Enterococcus faecium* et *Enterococcus faecalis*) constituent le microbiote le plus courant dans les fromages au lait cru (Martin *et al.*, 2009 ; Nieto-Arribas *et al.*, 2011; Terzić-Vidojević *et al.*, 2015b), contribuant à la

## RESULTATS ET DISCUSSION

saveur et à la texture du fromage (Martino et *al.*, 2016). En outre, de nombreuses souches d'entérocoques produisent des bactériocines, appelées entérocoques, qui sont actives contre les agents pathogènes et les bactéries d'altération, et jouent donc un rôle important dans la bio-préservation des aliments (Elkenany et *al.*, 2018).

Les *Lactococcus spp* sont les BLs les plus couramment isolées dans les produits laitiers artisanaux (Hayaloglu, 2016 ; Tilocca et *al.*, 2020) et *Lc. lactis* est le principal représentant des espèces des BLs dans les fromages frais dans Les pays des Balkans occidentaux (Fuka et *al.*, 2010; Golić et *al.*, 2013 ; Terzic-Vidojevic et *al.*, 2014b).

Des nombreux fromages traditionnels fabriqués à partir du lait cru contiennent des espèces de Leuconostocs (Alegría et *al.*, 2013; Sandra et *al.*, 2013; Terzić-Vidojević et *al.*, 2014a). Les leuconostocs sont généralement utilisés comme des starters secondaires pour améliorer les caractéristiques organoleptiques du produit final. Les souches de leuconostoc produisent des composés aromatiques importants pour la saveur du fromage (van Mastrigt et *al.*, 2019). Les leuconostocs produisent du CO<sub>2</sub> issu de la fermentation hétérolactique, un agent inhibiteur de plusieurs microbes.

Les caractéristiques des fromages traditionnels sont fortement influencées par la race animale, les qualités physico-chimiques et microbiologiques du lait cru et la technologie utilisée pour la fabrication du fromage (Coulon et *al.*, 2004 ; De Marchi et *al.*, 2008; Johnson, 2017).

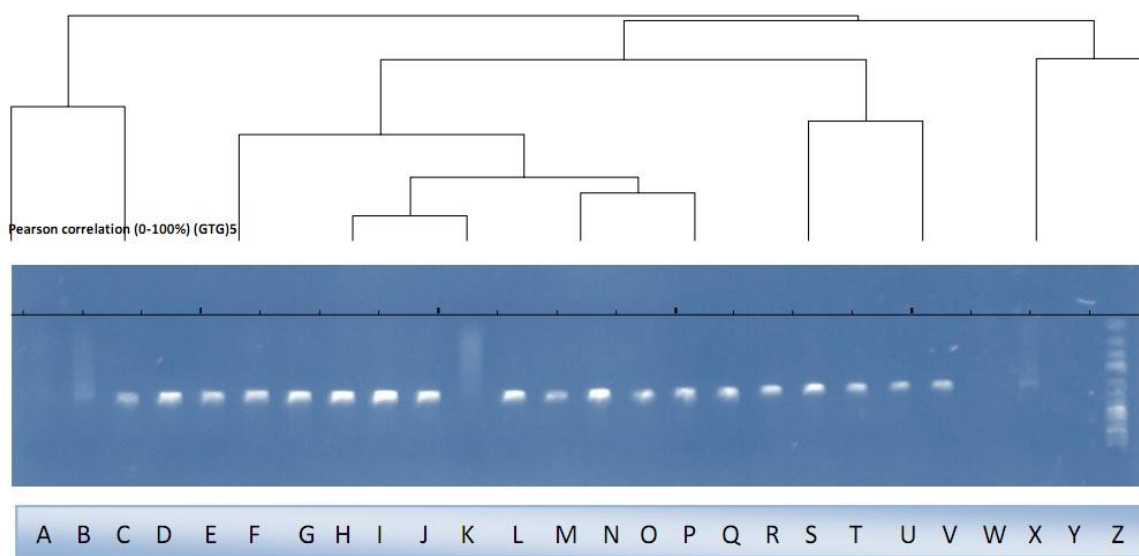


Figure 10 : Profil du dendrogramme de *Lactococcus lactis*

## RESULTATS ET DISCUSSION

Gel d'électrophorèse des produits de la (GTG)<sub>5</sub>-PCR des isolats des bactéries lactiques suivantes :

C : KC12

D : KC15

E : KC14

L : ATCC 49032 : *Lactococcus lactis*

Chaque souche est indiquée par une lettre correspond à la même lettre indiquée dans le profil de dendrogramme.

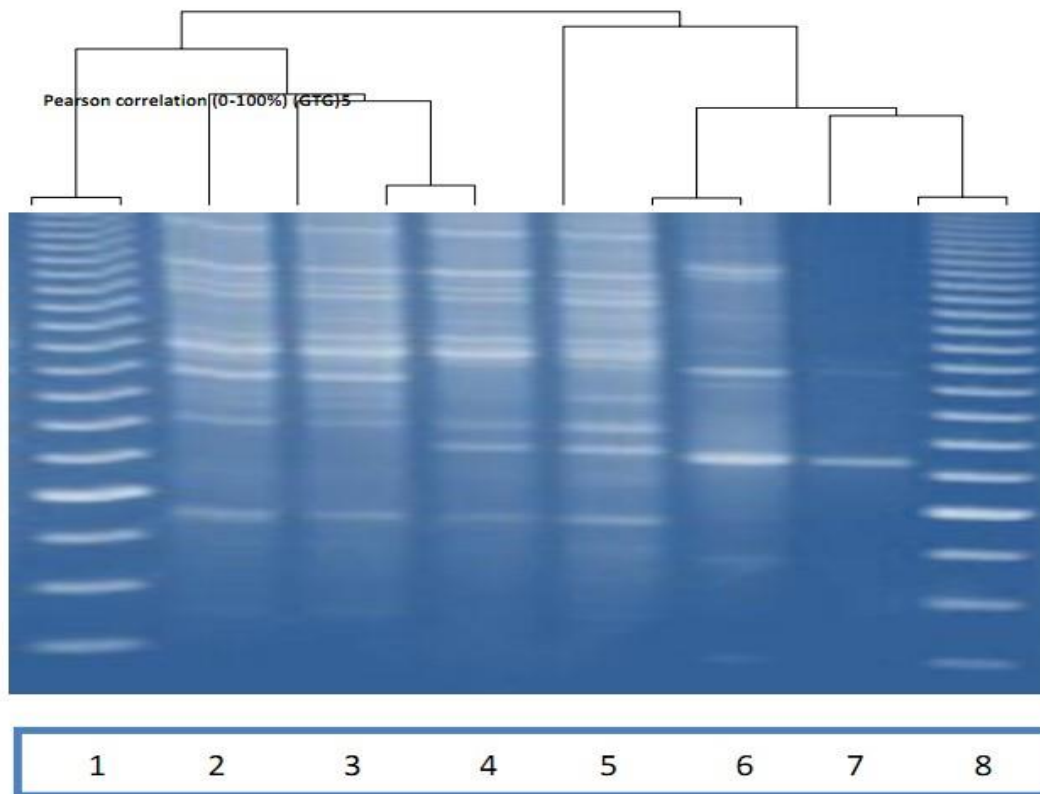


Figure 11 : Profil du dendrogramme d'*Enterococcus faecium*

Gel d'électrophorèse des produits de la (GTG)<sub>5</sub>-PCR des isolats des bactéries lactiques suivantes :

2 : ATCC 27270 : *Enterococcus faecium*

3 : KC03

## RESULTATS ET DISCUSSION

4 : KC02

5 : KC04

Chaque souche est indiquée par un numéro correspond au même numéro dans le profil de dendrogramme.

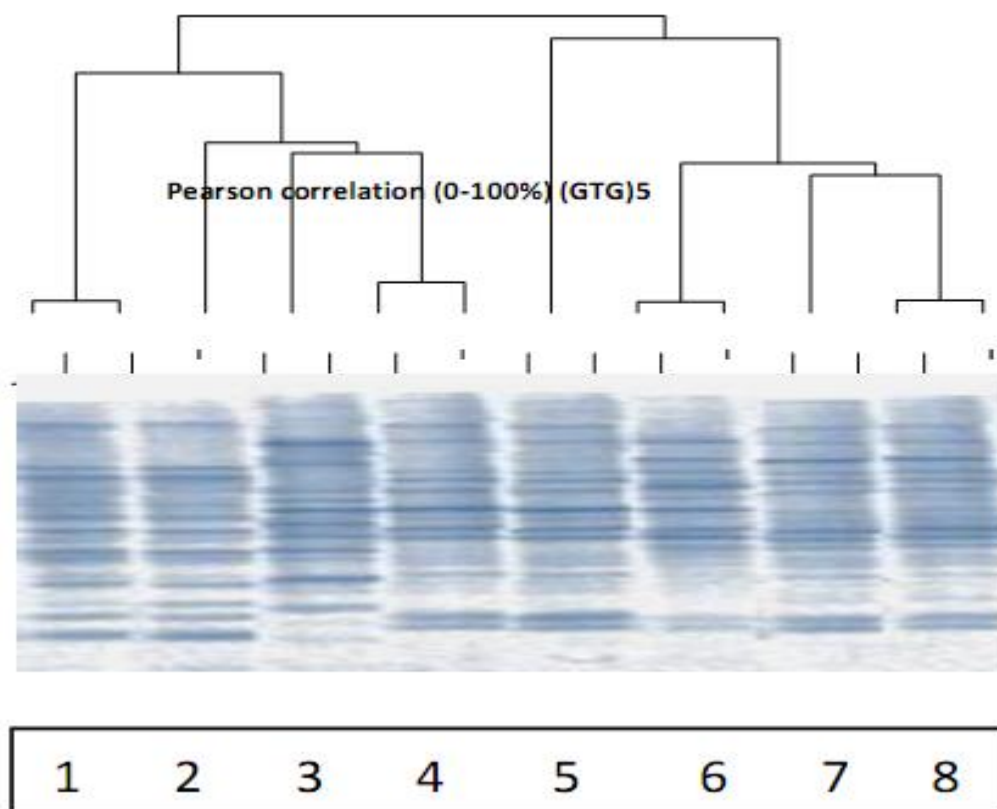


Figure 12 : Profil du dendrogramme d'*Enterococcus durans*.

Gel d'électrophorèse des produits de la (GTG)<sub>5</sub>-PCR des isolats des bactéries lactiques suivantes :

2 : KC10

3 : KC05

4 : KC07

5 : KC01

6 : KC09

7 : KC13

8 : ATCC 19432 : *Enterococcus durans*

Chaque souche est indiquée par un numéro correspond au même numéro dans le profil de dendrogramme.

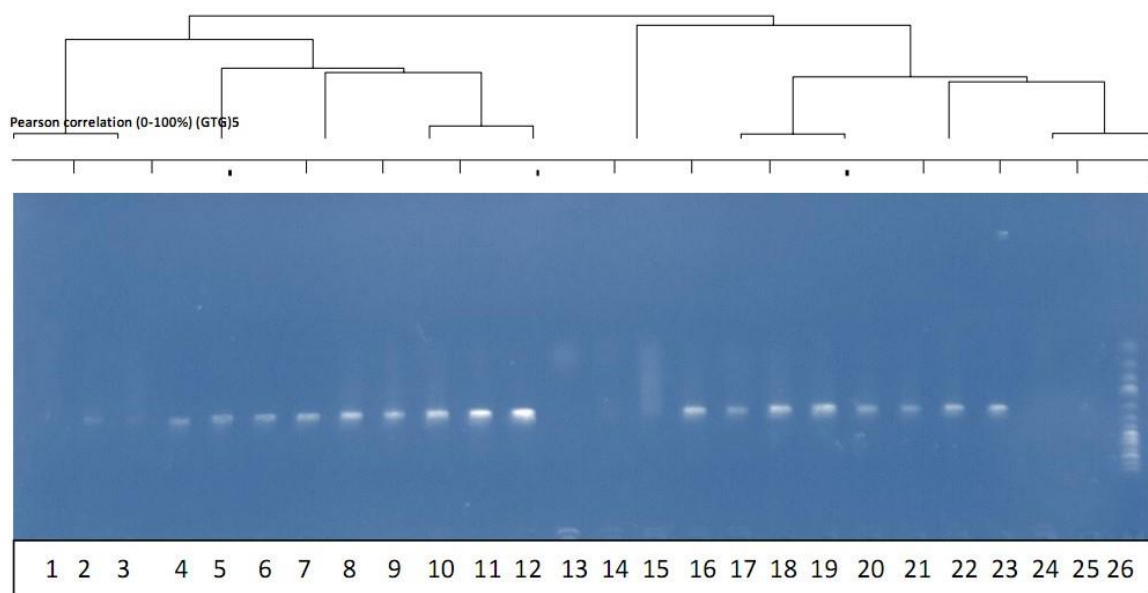


Figure 13 : Profil du dendrogramme de *Leuconostoc mesenteroides*

Gel d'électrophorèse des produits de la (GTG)<sub>5</sub>-PCR des isolats des bactéries lactiques suivantes :

4 : KC11

5 : KC08

6 : KC06

9 : ATCC 19254 : *Leuconostoc mesenteroides*

Chaque souche est indiquée par un numéro correspond au même numéro dans le profil de dendrogramme.

### 3 Etude des interactions bactériennes

L'interaction microbienne est un phénomène qui se déroule dans la nature entre les différents micro-organismes qui vivent en communauté dans un écosystème complexe. Cette

interaction peut être positive ou négative. La compréhension et la maîtrise de cette interaction entre les microbes est d'une grande importance technologique.

### 3.1 Activité antimicrobienne des cultures bactériennes vis-à-vis des bactéries pathogènes

Dans cette partie, les 15 souches isolées à partir des différents échantillons des fromages J'ben et qui ont été soumis à une identification moléculaire ont été testées pour leur activité antimicrobienne vis-à-vis les souches indicatrices comme montré dans le tableau 11

L'activité inhibitrice a été mesurée en estimant le diamètre de la zone circulaire après 24h d'incubation.

Tableau 11 : Spectre d'activité inhibitrice des souches vis-à-vis des germes indicatrices.

Souche	Indicatrices						
	<i>Serratia plymuthica</i>	<i>Staphylococcus warneri</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Escherichia coli1</i>	<i>Escherichia coli2</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Shigella sonnei</i>
KC01	+++	++	+	+++	+++	+	+
KC02	+++	++	+	+++	+++	-	-
KC03	-	++	+	+++	+++	++	-
KC04	-	+++	+	+++	+++	++	+
KC05	-	++	+	+++	++	++	-
KC06	+++	++	-	++	+++	++	+
KC07	+++	+++	-	+	+++	++	-
KC08	++	++	-	++	+++	+++	-
KC09	+++	+++	-	++	++	++	-
KC10	+	++	-	++	+	+	-
KC11	+	++	-	+++	++	+++	-
KC12	+++	+++	-	+++	+	+++	-
KC13	+++	++	-	+++	++	++	-
KC14	+++	++	-	+++	++	+	-
KC15	+	+	-	+++	+++	+	-

Activité antimicrobienne : +++ : diamètre 8 > mm (fort), ++ : 4-8 mm (modéré), + : 1-4 mm (faible), - : absence d'activité.

*Enterococcus durans* : KC01, KC05, KC07, KC09, KC10 et KC13 ; *Enterococcus faecium* : KC02, KC03 et KC04 ; *Leuconostoc mesenteroides* : KC06, KC08 et KC11 ; *Lactococcus lactis* : KC12, KC14 et KC15.

La technique de diffusion en puits a donné des résultats variables pour les diverses bactéries inhibitrices.

A partir de résultats obtenu on a observé 74,29% de cas d'inhibitions et 25,71% d'absence d'inhibition.

Les souches ont présenté une activité inhibitrice contre les bactéries à Gram positif que pour les bactéries à Gram négatif avec un spectre d'activité variables selon les souches inhibitrices et les bactéries indicatrices.

L'activité antibactérienne contre *Serratia plymuthica* a révélé que 8 souches des bactéries lactiques ont montré une activité d'inhibition élevée. Alors que 3 souches (KC03, KC04 et KC05) n'ont montré aucune activité.

Pour l'activité antibactérienne contre *Staphylococcus warneri* les résultats ont révélé que toutes les souches inhibitrices ont exercé un effet inhibiteur. Quatre souches (KC04, KC07, KC09 et KC12) ont exercé une activité inhibitrice élevée, alors que KC15 a exercé une faible activité.

Cinq souches de bactéries inhibitrices (KC01, KC02, KC03, KC04 et KC05) ont révélé une faible activité antibactérienne contre *Enterobacter aerogenes*. Les autres bactéries n'ont présenté aucune activité inhibitrice.

Toutes les souches ont présenté une inhibition vis-à-vis *Escherichia coli1*. Dix souches ont présenté une activité inhibitrice élevée, et une souche (KC07) a exercé une faible activité inhibitrice.

Toutes les souches ont présenté une inhibition vis-à-vis *Escherichia coli2*. Avec 8 souches ont donné une activité inhibitrice élevée, et 2 souches lactiques (KC10 et KC12) ont montré une faible inhibition.

Quatorze souches des bactéries lactiques inhibitrices ont montré une activité inhibitrice variable contre *Staphylococcus aureus*, sauf la souche (KC02) qui n'a présenté aucune inhibition.

*Shigella sonnei* semble être résistante à l'effet inhibiteur des bactéries lactiques inhibitrices testées. Douze (12) souches n'ont montré aucune activité inhibitrice vis-à-vis *Shigella sonnei* tandis que 3 souche (KC01, KC04 et KC06) ont montré une faible inhibition.

Les trois souches *Staphylococcus warneri*, *Serratia plymuthica* et *Enterobacter aerogenes* sont obtenues des cas de mammite subclinique étudiées au laboratoire de recherche LSTPA. Il est à signaler que certains agents de contamination du lait et des produits laitiers sont des agents de mammite, le risque de contamination alimentaire augmente avec la consommation de lait cru ou des produits laitiers artisanaux qui sont souvent préparés à partir du lait cru comme le fromage J'ben. Les produits laitiers artisanaux et les aliments fermentés représentent un potentiel inhibiteur principalement grâce à leurs flores lactiques. On observe une bonne activité

inhibitrice de nombreuses bactéries de nos souches lactiques vis-à-vis de *Staphylococcus warneri* et *Serratia plymuthica* qui sont considérées comme des pathogènes opportunistes qui peuvent être transmis par des aliments contaminés, ces pathogènes causent parfois des infections sévères de type septicémie. *Enterobacter aerogenes* a été résistante à nos souches lactiques ; en générale, le risque de cette bactérie sur la santé humain est faible.

*Escherichia coli1*, *Escherichia coli2*, *Staphylococcus aureus* et *Shigella sonnei* sont des souches de référence ATCC. Les trois espèces sont connues comme des agents pathogènes et de contamination alimentaire. Les deux souches d'*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* ont révélé une inhibition par plusieurs bactéries inhibitrices de nos souches lactiques. *Shigella sonnei* semble résistante à toutes nos souches lactiques. Ces bactéries pathogènes sont aussi responsables de plusieurs maladies et infections.

Les bactéries lactiques sont largement utilisées dans l'industrie alimentaire comme cultures starters et comme conservateurs biologiques contre les microorganismes pathogènes, car les bactéries lactiques peuvent produire des composants métaboliques ayant des propriétés technologiques et antimicrobiennes tels que : les acides organiques, le diacétyle, la reutéline, le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines. Aussi, grâce à leur activité antimicrobienne les bactéries lactiques sont utilisées dans le domaine de médecine pour lutter contre les agents des infections urogénitales (Hanson et al., 2016) et des diarrhées infectieuses (Kechagia et al., 2013). Elles sont aussi impliquées comme des alternatives des antibiotiques contre les bactéries qui ont développés une antibiorésistance et elles présentent une activité inhibitrice contre les (MDRS) (Bhola & Bhadekar, 2019).

De nombreuses études ont prouvés la capacité des bactéries lactiques appartenant aux groupes : *Enterococcus*, *Leuconostoc* et *Lactococcus* à inhiber divers microorganismes, ainsi que leur utilité dans l'industrie alimentaire et dans le domaine médical. Karakas-Sen & Karakas (2018) ont révélé que des souches de *Lactococcus lactis*, d'*Enterococcus durans* et d'*Enterococcus faecium* avaient une bonne activité antimicrobienne vis-à-vis les souches pathogènes comme : *Staphylococcus aureus*,

López-Seijas et al. (2019) ont décrit un effet inhibiteur intéressant de *Lactococcus lactis* contre le genre *Staphylococcus* ; et Musikasang et al. (2009) ont isolé deux *Enterococcus* (*Enterococcus faecium* et *Enterococcus durans*) qui avaient d'importantes propriétés probiotiques, y compris une forte activité antimicrobienne.

Morandi et *al.* (2013) ont identifié 35 souches de *Leuconostoc* isolées de fromages typiques du nord de l'Italie, dont *Leuconostoc mesenteroides*, qui présentent une activité antimicrobienne contre plusieurs bactéries indicatrices. Lee & Kim., (2019) ont révélé une forte activité inhibitrice de *Leuconostoc mesenteroides* MKSR envers *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri*, *Bacillus cereus* et *Listeria innocua*.

Les micro-organismes du lait cru jouent un rôle important dans la sécurité du produit, en empêchant l'accumulation des substances indésirables (Poveda et *al.*, 2015). Ils empêchent également la croissance des agents pathogènes et de contamination alimentaire lors de la fabrication du fromage. Koch et *al.* (2010) ont signalé que les fromages au lait cru causaient à un taux d'incidence plus faible de maladies liées au contamination alimentaire que le fromage au lait pasteurisé. De plus, il a été démontré qu'un pourcentage très faible à nul de fromages au lait cru sont contaminés par des agents pathogènes majeurs, comme *Listeria monocytogenes* (Ryser, 2007 ; Little et *al.*, 2008). C'est peut-être expliqué par le fait que les bactéries lactiques naturelles sont plus puissantes avec leurs agents antimicrobiens par rapport aux ferments industriels. À cet égard, le fromage au lait cru peut être considéré comme un aliment sûr sur le plan microbiologique (Brooks et *al.*, 2012 ; Masoud et *al.*, 2012) ce qui engendrerait un bon moyen pour l'isolement des bactéries lactique à haut potentiel inhibiteur.

La figure 14 montre certaines activités inhibitrices de nos souches lactiques représentées par des zones d'inhibitions autour des puits.

Les résultats de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques du fromage traditionnel J'ben testée dans cette étude avec des BLs qui appartiennent aux genres *Enterococcus*, *Leuconostoc*, et *Lactococcus*, indiquent que ces bactéries peuvent être utilisées dans différentes applications qui nécessitent le contrôle des contaminants ou des pathogènes. Elles peuvent être classées comme des agents bio-conservateurs intéressants. Leur propriété antibactérienne peut être nécessaire pendant la production du fromage et d'autres produits laitiers et permet de diminuer l'utilisation des conservateurs chimiques de synthèse.

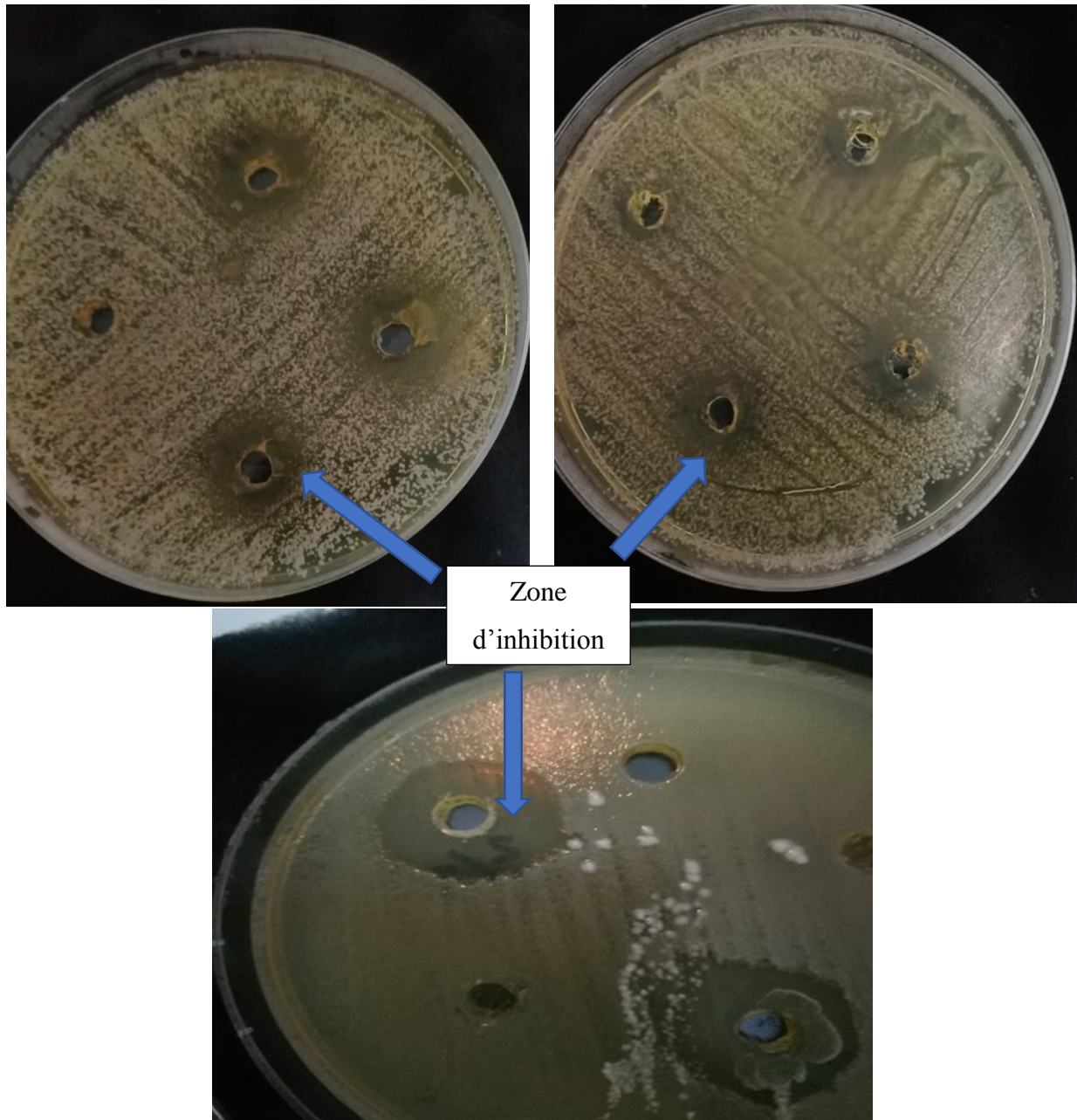


Figure 14 : Activité antimicrobienne des souches vis-à-vis de bactéries indicatrices.

### 3.2 Interactions entre les souches des bactéries lactiques sélectionnées

Les souches sélectionnées ont été testées pour observer l'inhibition entre elles (inhibition croisée) par la technique de diffusion en puits. Chaque souche de nos échantillons a été testée comme inhibitrice et comme indicatrice. Les résultats du test d'interactions entre les 15 souches testées sont présentés dans le tableau 12.

## RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats obtenus montrent que les souches KC01, KC02, KC03, KC04, KC05, KC12, KC13 et KC15 ne sont pas inhibées par les autres souches testées.

La souche indicatrice KC07 a été inhibée seulement par KC09 alors que la souche KC11 a été inhibée seulement par KC03 avec une faible inhibition.

Tableau 12 : Interactions entre les souches lactiques.

Souche	Souche indicatrice														
	KC 01	KC 02	KC 03	KC 04	KC 05	KC 06	KC 07	KC 08	KC 09	KC 10	KC 11	KC 12	KC 13	KC 14	KC 15
KC01	-	-	-	-	-	ND	-	+	-	+	-	-	-	+	-
KC02	-	-	-	-	-	ND	-	-	-	+	-	-	-	+	-
KC03	-	-	-	-	-	ND	-	++	+	-	+	-	-	+	-
KC04	-	-	-	-	-	ND	-	++	-	-	-	-	-	+	-
KC05	-	-	-	-	-	ND	-	+	-	-	-	-	-	+	-
KC06	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
KC07	-	-	-	-	-	ND	-	++		-	-	-	-	-	-
KC08	-	-	-	-	-	ND	-	-	-	+	-	-	-	-	-
KC09	-	-	-	-	-	ND	+	+	-	-	-	-	-	-	-
KC10	-	-	-	-	-	ND	-	+	-	-	-	-	-	-	-
KC11	-	-	-	-	-	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KC12	-	-	-	-	-	ND	-	+	-	-	-	-	-	-	-
KC13	-	-	-	-	-	ND	-	+	-	-	-	-	-	-	-
KC14	-	-	-	-	-	ND	-	+	-	-	-	-	-	-	-
KC15	-	-	-	-	-	ND	-	+	-	-	-	-	-	-	-

Activité antimicrobienne : +++ : diamètre 8 > mm (fort), ++ : 4-8 mm (modéré), + : 1-4 mm (faible), - : absence d'activité, ND : Non déterminé.

*Enterococcus durans* : KC01, KC05, KC07, KC09, KC10 et KC13 ; *Enterococcus faecium* : KC02, KC03 et KC04 ; *Leuconostoc mesenteroides* : KC06, KC08 et KC11 ; *Lactococcus lactis* : KC12, KC14 et KC15.

On observe une faible inhibition pour la souche indicatrice KC09 par uniquement deux souche KC03 et KC07. On observe aussi une faible inhibition pour la souche indicatrice KC10

par KC01, KC02 et KC08 et une faible inhibition pour la souche indicatrice KC14 par KC01, KC02, KC03, KC04 et KC05.

La seule souche indicatrice KC08 qui a été inhibé par la majorité des souches testées, sauf KC02 et KC11. Les souches KC03, KC04 et KC07 inhibent fortement la souche KC08 avec une inhibition modérée par KC01 et KC05. Cette inhibition indique que la souche KC08 ne doit être pas utilisée en association avec ces souches inhibitrices.

L'étude des interactions entre les souches porte un grand intérêt pour le choix des bactéries lactique qui peuvent être utilisé en mélange dans une communauté bactérienne. Il est important que la souche choisie pour faire partie d'une communauté bactérienne n'exerce pas un effet antagoniste contre les autres souches de communauté.

Meghoufel, (2019) a sélectionnée 6 souches lactiques pour former une communauté microbienne. Ces souches ont été isolées à partir du fromage J'ben préparé du lait cru de chèvre de la wilaya de Nâama. Les souches sélectionnées ont montré l'absence d'inhibition entre eux qui appartiennent à 3 espèces de *Lactococcus lactis* (LIJC1, LIJC2 et LIJC4) et à 3 autres espèces de *Leuconostoc mesenteroides* : (LmJC1, LmJC3 et LmJC5).

Ammor et al. (2006) a obtenu différents résultats d'inhibition entre les souches utilisées comme indicatrice et les souches utilisées comme inhibitrices, et dans la majorité des cas il a trouvé une absence ou une faible inhibition pour les souches lactiques utilisées comme indicatrices par les souches lactiques inhibitrices. Ces résultats sont similaires à nos résultats.

Tahlaiti, (2019) a observé que les interactions entre les bactéries lactiques isolées du blé fermenté ont donné des résultats variables selon la souche lactique utilisée comme indicatrice et inhibitrice.

Les résultats d'interaction entre les souches sélectionnées sont positifs et intéressants car dans la majorité des cas, il y a une absence d'antagonisme entre les souches, ce qui les qualifie pour faire partie d'une communauté bactérienne, pour être utilisées en association comme levain lactique dans des produits alimentaires ou comme des probiotiques.

L'utilisation des bactéries lactiques en communauté dans les aliments avec différentes propriétés métaboliques des carbohydrates est impliquée pour une bonne fermentation des produits et un meilleur développement des qualités alimentaires comme le montre Manini et al. (2016). En se basant sur le même principe, cette association bactérienne peut améliorer le

potentiel bio-protecteur des aliments liés à leurs variables capacités métaboliques et productrices de divers agents inhibiteurs.

Les bactéries lactiques sont commercialisées en tant que probiotiques associés ; dans ce cas l'activité antimicrobienne peut être plus importante par plus de production et de diversité des agents inhibiteurs. Au niveau du tube digestif, ces BLs créent une compétition par inhibition de l'adhésion intestinale et le soutien de l'intégrité de la barrière épithéliale et la stimulation du système immunitaire et donc l'élimination de l'agent pathogène (Jensen, 2014). L'association des bactéries lactiques assure davantage ces différentes fonctionnalités pour plus d'efficacité probiotique et antagoniste.

### **3.3 Activité synergétique des bactéries lactiques**

L'activité synergétique des trois souches lactiques a permis de réaliser sept séries comme décrites ci-dessus. Les boîtes de Pétri ont été incubées pendant 24h puis observées pour la présence d'inhibition et les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés (Tableau 13).

**Tableau 13 : Diamètre de zone d'inhibition des sept séries.**

Série	I	II	III	IV	V	VI	VII
<b>Diamètre de la zone d'inhibition (mm)</b>	<b>15,00</b>	<b>15,00</b>	<b>17,00</b>	<b>13.33</b>	<b>18.33</b>	<b>19 ,00</b>	<b>19.66</b>
<b>I : KC01 ; II : KC02 ; III : KC03 ; IV : KC01 + KC02 ; V : KC01 + KC03 ; VI : KC02 + KC03 ; VII : KC01 + KC02 + KC03.</b>							

Les trois souches KC01 (*Enterococcus durans*), KC02 et KC03 (*Enterococcus faecium*) qui ont été utilisées pour évaluer l'activité synergétique n'ont présenté aucune activité antagoniste entre eux.

Les interactions entre les bactéries lactiques sont soit négatives soit positives. Les interactions positives comme le mutualisme où les deux bactéries bénéficient l'une de l'autre, ou bien le commensalisme où l'une des bactéries bénéficie de l'autre sans effet négatif sur elle. Ces interactions positives favorisent la croissance des bactéries et donc la production des agents inhibiteurs ou bien optimisent la synthèse d'agents antimicrobiens comme les bactériocines. Mais il faut connaître que l'association des bactéries lactiques ne nécessite pas obligatoirement

une interaction entre eux (commensalisme ou mutualisme) pour un effet antagoniste contre les agents pathogènes.

D'après les résultats, on a observé que les trois souches et les combinaisons des souches ont effectué une activité antimicrobienne vis-à-vis de la souche indicatrice *Escherichia coli*1.

Le maximum de la zone d'inhibition est obtenu par la combinaison des trois souches (série VII : KC01+ KC02+ KC03) suivi par la combinaison de la série VI (KC02+ KC03) et de la série V (KC01+ KC03). Bhola & Bhadekar (2019) ont trouvé que l'activité antimicrobienne a été la plus élevée lors de la combinaison de trois souches de Lactobacilles : *L. plantarum*, *L. casei* et *L. acidophilus*.

La combinaison VII (KC01+ KC02+ KC03) a montré une inhibition maximale contre *Escherichia coli*1. Ces résultats démontrent l'effet synergique de la combinaison de trois souches lactiques d'*Enterococcus durans* KC01, d'*Enterococcus faecium* KC02 et d'*Enterococcus faecium* KC03 qui présente une activité antimicrobienne la plus élevée par rapport aux autres séries. De plus les combinaisons de la série VI : KC02 + KC03 (les deux *Enterococcus faecium*) et de la série V : KC01 + KC03 (*Enterococcus durans* + *Enterococcus faecium*) semblent intéressantes à cause de l'activité antimicrobienne synergétique importante de ces combinaisons. On peut dire que la combinaison de ces souches peut compléter les effets de chacune d'entre elles et améliorer leur activité antagoniste.

L'association des probiotiques peut compléter les effets des uns des autres et améliorer leurs propriétés bénéfiques (Bhola & Bhadekar, 2019). L'objectif de ce test a été donc de déterminer si les souches choisies dans les combinaisons testées peuvent augmenter ou renforcer ou de même préserver les propriétés bénéfiques de chacune. De plus leurs applications autant que probiotiques potentiels pour favoriser une inhibition maximale contre les pathogènes et les contaminants alimentaires.

L'effet synergétique est généralement préférable pour que les bactéries lactiques soient complétées l'une de l'autre et pour combler leurs points faibles. Cette combinaison augmentant le challenge vis-à-vis des bactéries pathogènes sur deux plans : soit en production des agents inhibiteurs variables ce qui va diminuer la résistance des pathogènes ou bien par plus de compétition dans le milieu environnant.

### 3.4 Détermination de l'agent inhibiteur

#### 3.4.1 Activité antimicrobienne du surnageant

Pour déterminer l'activité antimicrobienne de l'agent inhibiteur on a préparé le surnageant de chaque culture bactérienne. L'activité antimicrobienne du surnageant a été évaluée par la méthode de diffusion en puits contre les bactéries indicatrices suivantes : *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. Ces 2 souches indicatrices sont sensibles par contact direct avec nos 15 souches lactiques en utilisant des cultures bactériennes (Tableau 11).

Le surnageant sans culture a été testé par la méthode de diffusion en puits qui est basée sur le principe de la capacité des agents inhibiteurs à la diffusion. Cette diffusion de l'agent inhibiteur permet d'empêcher la bactérie indicatrice de pousser tout autour du puits, le diamètre de l'halo d'inhibition signifie que la quantité produite a été diffusé. Les bactériocines sont très diffusibles dans le milieu gélosé.

On observe une activité antibactérienne de 7 surnageants obtenus de KC01, KC02, KC03, KC04, KC05, KC06 et KC07 vis-à-vis d'*Escherichia coli*, alors qu'aucun effet inhibiteur n'a été observé contre *Staphylococcus aureus* (Tableau 14), bien que nos 15 souches lactiques ont une activité antimicrobienne contre les *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* (Tableau 11). Ces inhibitions des 7 surnageants obtenus peuvent être liées aux agents inhibiteurs comme les acides organiques (acide lactique etc.), au peroxyde d'hydrogène ou des agents de nature peptidique (bactériocines).

Plusieurs études ont montré que l'activité des surnageants est faible par rapport au contact direct avec des souches lactiques ou bien l'activité inhibitrice est totalement disparue dans certains cas. Des résultats similaires ont été constatés par Dalache, (2006) qui a observé la disparition totale de l'activité inhibitrice des bactéries lactiques après l'utilisation de la méthode des puits. Schillinger & L ucke, (1989) ont constaté aussi des résultats similaires où ils ont observé la disparition totale de l'activité inhibitrice des surnageants de 13 souches sur 19 souches révélées inhibitrices par contact direct. Cette absence d'inhibition peut s'expliquer par la faible quantité de l'agent inhibiteur produit, sa faible diffusion dans la gélose ou bien l'insuffisance de la quantité ou du volume du surnageant utilisé par rapport au diamètre du puits. Ammor et al. (2006) ont suggéré que ces résultats sont observés quand l'agent inhibiteur est une bactériocine, et ils donnent l'hypothèse suivante : les bactériocines ou les bactériocines-like doivent être

## RESULTATS ET DISCUSSION

attachées à la membrane de la cellule productrice et donc l'inhibition ne sera effectuée qu'au moment du contact direct entre la cellule productrice de la bactériocine et la cellule indicatrice.

Les composants antimicrobiens des surnageants des 7 souches actifs sur *Escherichia coli* ont été déterminés comme suit :

Le surnageant a été neutralisé au pH 6.5 par 1M NaOH pour éliminer l'effet inhibiteur des acides organiques.

L'addition de la catalase au surnageant des bactéries lactiques a été réalisée pour éliminer l'effet du peroxyde d'hydrogène.

Le traitement du surnageant par les enzymes protéolytiques (trypsine et chymotrypsine) a été fait pour éliminer l'effet de l'agent antimicrobien de nature protéique.

Tableau 14 : Activité antimicrobienne du surnageant

Souche	Bactérie indicatrice	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
KC01	+	-
KC02	+	-
KC03	+	-
KC04	+	-
KC05	+	-
KC06	+	-
KC07	+	-
KC08	-	-
KC09	-	-
KC10	-	-
KC11	-	-
KC12	-	-
KC13	-	-
KC14	-	-
KC15	-	-

+ : présence d'activité ; - : absence d'activité.

*Enterococcus durans* : KC01, KC05, KC07, KC09, KC10 et KC13 ; *Enterococcus faecium* : KC02, KC03 et KC04 ; *Leuconostoc mesenteroides* : KC06, KC08 et KC11 ; *Lactococcus lactis* : KC12, KC14 et KC15.

Les résultats ont montré que l'activité antimicrobienne n'a pu être détectée que pour les surnageants non traités et non neutralisés. Aucune activité antimicrobienne n'a été observée après élimination de l'effet des acides organiques et après addition des enzymes. Des résultats similaires ont été obtenus par Ammor et al. (2006) qui ont observé la disparition totale de

l'activité antimicrobienne du surnageant de toutes les 13 souches sélectionnées après neutralisation du pH et/ou l'addition de catalase.

Le surnageant sans culture ne permet pas de déterminer l'activité antimicrobienne liée aux différents agents inhibiteurs à cause d'une disparition spontanée de l'activité inhibitrice de certains et la disparition de l'activité des autres induite après neutralisation du pH. La sensibilité aux enzymes et à la chaleur est testée sur des surnageants des cultures.

### **3.4.2 Sensibilité aux enzymes protéolytiques et à la catalase**

Pour déterminer l'effet des différents enzymes, la catalase et les enzymes protéolytiques (trypsine et chymotrypsine) ont été testés sur le surnageant de la culture. *Escherichia coli*2 a été utilisée comme bactérie indicatrice.

L'addition des différentes enzymes a conduit à l'obtention des résultats figurant sur le tableau 15.

Tableau 15 : Activité antimicrobienne du surnageant après traitement par différents enzymes.

Souche	Catalase	Trypsine	Chymotrypsine
KC01	-	-	-
KC02	+	+	+
KC03	-	-	-
KC04	-	-	-
KC05	-	+	+
KC06	-	+	+
KC07	-	-	-
KC08	+	+	+
KC09	-	+	+
KC10	-	+	-
KC11	-	-	-
KC12	-	-	-
KC13	+	-	+
KC14	+	-	+
KC15	+	+	+

+ : présence d'activité ; - : absence d'activité

*Enterococcus durans* : KC01, KC05, KC07, KC09, KC10 et KC13 ; *Enterococcus faecium* : KC02, KC03 et KC04 ; *Leuconostoc mesenteroides* : KC06, KC08 et KC11 ; *Lactococcus lactis* : KC12, KC14 et KC15.

L'activité antimicrobienne des souches KC01, KC03, KC04, KC07, KC11 et KC12 a disparu après le traitement aux trois enzymes, la catalase et les enzymes protéolytiques (trypsine et chymotrypsine), alors que l'activité antimicrobienne de la souche KC10 a été levée par la

catalase et la chymotrypsine et donc l'activité antimicrobienne peut-être liée au peroxyde d'hydrogène et aux peptides (bactériocines).

Les souches KC02, KC08 et KC15 n'ont présenté aucun effet sur leur activité antimicrobienne qui reste conservée après le traitement aux trois enzymes, la catalase et les enzymes protéolytiques. L'activité antimicrobienne est peut-être liée aux acides organiques.

L'activité antimicrobienne des souches KC05, KC06 et KC09 est restée conservée après l'application des enzymes protéolytiques (trypsine et chymotrypsine) et disparue après l'addition de la catalase. On pense que l'activité antimicrobienne est due au peroxyde d'hydrogène.

L'activité antimicrobienne des souches KC13 et KC14 a été inactivée uniquement pour la trypsine. Ce qui indique qu'elle est peut-être due à la substance peptidique sensible à cette enzyme protéolytique.

La perte de l'activité antimicrobienne après traitement par une ou les deux enzymes protéolytiques a confirmé la sensibilité des agents inhibiteurs produits par les souches à l'action des enzymes. Nos résultats démontrent que les substances inhibitrices produites par ces souches sont de nature protéique (comme : bactériocine ou bactériocine-like).

Les résultats ont montré que nos souches sont capables de générer l'inhibition des pathogènes par différents agents inhibiteurs (acide organique, le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines) métabolisés par nos souches sélectionnées, sans oublier les autres composants non déterminés.

Les acides organiques représentés essentiellement par l'acide lactique sont connus par leur pouvoir inhibiteur. Ce sont des métabolites issus de la fermentation des carbohydrates, leur effet est double et donc ils affectent et inhibent la croissance des microbes indésirables qui sont incapables de se développer au pH bas. Ainsi que, sous la forme non dissociée, ces acides organiques peuvent pénétrer à l'intérieur de la cellule et provoquer l'acidification du cytoplasme ce qui va conduire à la perturbation de l'activité métabolique et à la perméabilité membranaire de la cellule (Podolak *et al.*, 1996).

Les bactéries lactiques produisent le peroxyde d'hydrogène en présence de l'oxygène. C'est un agent inhibiteur toxique avec une propriété antimicrobienne qui provoque la peroxydation de la membrane lipidique et augmente sa perméabilité. Le peroxyde d'hydrogène est le précurseur des radicaux libres bactéricide  $O_2^-$  et  $OH^+$  qui peut endommager les constituants intracellulaires (Olaoye & Ntuen, 2011).

Les souches hétéro-fermentaires telles que les leuconostocs (KC6, KC8 et KC11) produisent le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) au cours de la croissance. L'influence du dioxyde de carbone sur la conservation des produits est double : de plus de sa propre activité antimicrobienne liée à sa toxicité cellulaire, il crée un environnement anaérobie en remplaçant l'oxygène moléculaire existant (Eklund, 1984).

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens produites par diverses bactéries lactiques. Ces bactériocines inhibent de nombreuses flores de contamination et d'altération alimentaire de même que les bactéries pathogènes. Les genres : *Entérocooccus*, *Lactococcus* et *leuconostoc* sont capables de produire de : l'Enterocine, la Nisine et la leucocine respectivement (Hernández-González et al., 2021).

Toutes les bactéries lactiques sont capables de produire de l'acide lactique et du peroxyde d'hydrogène ; ces deux agents inhibiteurs sont caractérisés par un large spectre d'activité contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif et mêmes les levures (Šuškić et al., 2010).

Belguesmia et al. (2021) ont rapporté que la bactériocine enterocine DD14 produite par la souche lactique *Enterococcus faecalis* 14 présente une activité inhibitrice vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM). De mêmes, les résultats rapportés par Fernández et al. (2008) ont montré que *L. lactis* ESI 515 produit la bactériocine Nisine qui a un effet inhibiteur contre *S. aureus* et *S. epidermis*.

### 3.4.3 Sensibilité à la chaleur

Chaque surnageant qui contient de la culture bactérienne a été traité à 80°C pendant 10 minutes dans un bain-marie. Le traitement thermique a conduit à l'inactivation des activités antagonistes des surnageants de la culture.

L'absence d'une activité inhibitrice résiduelle après le traitement thermique a révélé que les substances antimicrobiennes induites par les souches lactiques sont sensibles à la chaleur. Ces résultats indiquent que l'activité antagoniste des souches est due à une substance thermolabile à la température utilisée dans le test (comme : la bactériocine ou la bactériocine-like thermolabile). Ces résultats sont différents de ceux d'Ammor et al. (2006) qui ont constaté une activité antimicrobienne résiduelle du surnageant de culture après un traitement thermique à 80°C pendant 10 minutes.

Les propriétés des bactériocines sont variables, ils ont différentes structures et caractéristiques et donc certaines sont thermostables où leur résistance à la température est variable selon le type de la bactériocine c'est le cas des lantobiotiques de classe I, dont certains sont thermolabiles. Il faut prendre en considération ces critères pour une bonne application des BLs et leur bonne gestion industrielle.

### **3.4.4 Quantification de l'agent inhibiteur**

La production d'acide lactique est l'une des fonctions technologiques les plus importantes chez les bactéries lactiques. Les souches des bactéries lactiques sélectionnées pour jouer ce rôle primordial de production de l'acide lactique sont catégorisées comme starters primaires.

La quantité d'acide lactique produite a été déterminée selon l'AOAC (1990). Les résultats sont résumés dans le tableau 16.

La plus grande quantité de l'acide lactique est produite par la souche d'*Enterococcus faecium* KC02 (6,12 mg/ml) et la plus faible quantité est produite par la souche de *Leuconostoc mesenteroides* KC06 (3,90mg/ml).

La quantité d'acide lactique produite après 24h de la croissance des souches testées sur le lait écrémé montrent une différence entre les souches de divers genres, et même entre les souches d'une même espèce. Les résultats obtenus sont en concordance avec de ceux de Meghoufel, (2019) qui ne dépassent pas 5.93mg/ml.

Tableau 16 : Production d'acide lactique par les souches lactiques.

souche	QAL (mg/ml)	souche	QAL(mg/ml)
KC01	5,40	KC09	5,66
KC02	6,12	KC10	5,92
KC03	5,04	KC11	4,50
KC04	4,00	KC12	5,63
KC05	5,60	KC13	5,18
KC06	3,90	KC14	5,15
KC07	4,50	KC15	4,91
KC08	4,50		

QAL : La quantité d'acide lactique produite.

*Enterococcus durans* : KC01, KC05, KC07, KC09, KC10 et KC13 ; *Enterococcus faecium* : KC02, KC03 et KC04 ; *Leuconostoc mesenteroides* : KC06, KC08 et KC11 ; *Lactococcus lactis* : KC12, KC14 et KC15.

Additionnellement à leur rôle technologique, la production des acides est considérée comme le mécanisme le plus important par lequel les BLs inhibent les pathogènes. La production des composants antimicrobiens comme l'acide lactique par ces souches de bactéries lactiques implique qu'elles peuvent servir comme de nouveaux produits de conservation dans les industries alimentaires.

Plusieurs recherches ont montré l'activité antimicrobienne des acides organique comme acide lactique et l'acide acétique (Ibrahim et *al.*, 2021).

### **3.5 Effet des facteurs cultureux sur l'activité inhibitrice**

#### **3.5.1 Effet du milieu de culture**

La production des agents inhibiteurs est influencée directement par le milieu de culture utilisé pour la cultivation des souches productrices. Les composants du milieu de culture influencent le métabolisme cellulaire et donc les métabolites issus de ce dernier parmi eux les agents inhibiteurs.

La bactérie *Escherichia coli*2 est utilisée comme indicatrice

L'activité antimicrobienne des souches a été testée dans différents milieux de culture : MRS, M17 et Mueller Hinton (MH). Les résultats sont indiqués dans le tableau 17.

On observe l'absence totale de l'activité inhibitrice en utilisant le milieu Mueller Hinton (MH) pour toutes les souches.

L'activité inhibitrice a été variable dans le milieu MRS et M17, mais les résultats ont été mieux perçues sur le milieu MRS par rapport au milieu M17, sauf pour la souche KC05 où aucune différence n'a été notée.

L'activité inhibitrice a été nulle dans le milieu M17 pour les souches KC04, KC07 et KC11 mais remarquable dans le milieu MRS.

Plusieurs études ont montré l'influence de la composition du milieu et de leur effet sur l'optimisation de la production de l'agent inhibiteur surtout des bactériocines (Sidooski et *al.*, 2019).

## RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau 17 : Effet du milieu de culture sur l'activité inhibitrice des bactéries lactiques.

Souche	M17	MRS	MH
KC01	++	+++	–
KC02	+++	ND	–
KC03	+	+	–
KC04	–	+++	–
KC05	++	++	–
KC06	++	+++	–
KC07	–	++	–
KC08	+++	+++	–
KC09	+	++	–
KC10	++	++	–
KC11	–	+++	–
KC12	++	+++	–
KC13	++	++	–
KC14	++	+++	–
KC15	+	+++	–

Activité antimicrobienne : +++ : diamètre  $8 >$  mm (fort), ++ : 4-8 mm (modéré), + : 1-4 mm (faible) ;

Absence d'activité : –

*Enterococcus durans* : KC01, KC05, KC07, KC09, KC10 et KC13 ; *Enterococcus faecium* : KC02, KC03 et KC04 ; *Leuconostoc mesenteroides* : KC06, KC08 et KC11 ; *Lactococcus lactis* : KC12, KC14 et KC15.

La richesse du milieu de culture en substances nutritionnelles telles que les sources de carbone, des matières azotées et des vitamines peut favoriser la croissance des bactéries lactiques et la production des agents inhibiteurs en particulier les bactériocines. Le MRS est un milieu très riche par rapport au M17 qui contient beaucoup de facteurs nutritionnels comme le glucose et le tween 80 expliquant la bonne activité inhibitrice de certaines souches. Ce n'est pas toujours le cas, car dans certaines conditions, un milieu très riche favorise bien la croissance bactérienne avec l'absence de l'inhibition liée à l'absence de facteurs nécessaires (le nutriment exigé) pour la production de l'agent inhibiteur comme : la bactériocine (Biswas et al. 1991 ; De Vuyst et al., 1996; Kim et al. 1997; Mataragas et al. 2002 ; Sidooski et al., 2019).

La variabilité de l'activité inhibitrice a été observée pour les souches bactériennes testées dans différents milieux de culture. L'absence ou la diminution de l'activité inhibitrice est expliquée par la variabilité des conditions optimales (le nutriment nécessaire ou facteur limitant) pour la production de l'agent inhibiteur selon la souche bactérienne. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Djadouni & Kihal (2012) où ils ont trouvé qu'une meilleure activité

antimicrobienne est obtenue dans le milieu MRS à 30C° avec une absence totale d'activité dans les milieux BHI et M17.

L'objectif de ce test est de trouver des souches qui ont une activité antimicrobienne préservée dans les différentes conditions du milieu pour s'assurer de leur pérennité et de leur activité contre les pathogènes lors de leur utilisation pour la conservation et la préservation des aliments fermentés où les composants nutritifs sont variables.

### 3.5.2 Effet du NaCl

Parmi les facteurs qui influencent la production de l'agent inhibiteur est la concentration du NaCl. L'effet du NaCl sur l'activité inhibitrice a été réalisé sur le milieu MRS additionné de trois différentes concentrations de NaCl à 2%, 4% et 6%.

La bactérie *Escherichia coli*2 est utilisée comme indicatrice pour les concentrations de 2% et de 4% et *Staphylococcus aureus* pour la concentration à 6% de NaCl où *Escherichia coli*2 ne peut pas croître.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 18.

Les résultats de l'activité antimicrobienne vis-à-vis d'*Escherichia coli* 2 est totalement nulle à la concentration de 4% pour toutes les souches testées.

Pour la concentration de 2% de NaCl, les souches KC01, KC03, KC07 et KC11 ont été incapables de générer une activité antagoniste contre la souche indicatrice. Pour les autres souches, l'activité antimicrobienne a été faiblement affectée, avec une meilleure efficacité pour les souches KC05, KC09, KC10 et KC13.

Plusieurs études ont montré l'effet du sel sur l'activité antagoniste et sur la production des substances inhibitrices comme les bactériocines. La concentration élevée en sels inhibe l'activité antimicrobienne mais à faible concentration, les sels optimisent la production des bactériocines liée à l'augmentation du taux de croissance des cellules (Sidooski et *al.*, 2019). Leal-Sánchez et *al.* (2002) ont trouvé que la meilleure concentration de NaCl pour la production des bactériocines varie entre 2,3 à 2,5% pour *L. plantarum* ce qui est en concordance avec nos résultats pour les souches (KC05, KC09, KC10 et KC13).

## RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau 18 : Effet du NaCl sur l'activité inhibitrice des bactéries lactiques.

Souche	<i>Escherichia coli</i> 2			<i>Staphylococcus aureus</i>
	2%	4%	Témoin	6%
KC01	–	–	+++	+
KC02	++	–	ND	–
KC03	–	–	+	–
KC04	+++	–	+++	+
KC05	+++	–	++	+
KC06	+++	–	+++	–
KC07	–	–	++	–
KC08	+++	–	+++	+
KC09	+++	–	++	–
KC10	+++	–	++	–
KC11	–	–	+++	–
KC12	+++	–	+++	–
KC13	+++	–	++	–
KC14	+++	–	+++	–
KC15	+++	–	+++	–

Activité antimicrobienne : +++ : diamètre  $8 >$  mm (fort), ++ : 4-8 mm (modéré), + : 1-4 mm (faible) ; – : absence d'activité.

*Enterococcus durans* : KC01, KC05, KC07, KC09, KC10 et KC13 ; *Enterococcus faecium* : KC02, KC03 et KC04 ; *Leuconostoc mesenteroides* : KC06, KC08 et KC11 ; *Lactococcus lactis* : KC12, KC14 et KC15.

Notre objectif est d'évaluer les souches qui ne sont pas affectées par les sels dans leur activité antimicrobienne. Les fromages salés comme le fromages Cheddar (Fox & McSweeney, 2017) et le fromage traditionnel Algérien le Bouhezza (Zitoun et *al.*, 2012) subissent un salage aux environ de 2 à 2,5 % de NaCl, cette concentration stimule la croissance des bactéries lactiques et théoriquement favorise la production des agents inhibiteurs. Il est important de choisir les souches qui exercent une activité antimicrobienne en présence des sels pour une utilisation dans la bio-conservation des aliments salés comme les fromages. Les souches KC02, KC04, KC05, KC06, KC08, KC09, KC10, KC12, KC13, KC14 et KC15 sont des candidates intéressantes pour une utilisation dans la bio préservation des aliments salés.

### 3.5.3 Effet du pH

Le pH est un facteur important qui influence le métabolisme et la croissance des bactéries lactiques et donc la production des agents inhibiteurs.

Il est connu que le pH a aussi un effet sur l'activité enzymatique et donc la production des métabolites à propriété antimicrobienne en particulier les bactériocines (Mataragas et al. 2002 ; Dominguez et al. 2007).

Dans ce contexte, on a testé l'activité antimicrobienne en utilisant le milieu MRS ajusté au pH 4,7 et 5,5.

Après inoculation du milieu par la souche indicatrice *Escherichia coli*2 et l'incubation à 37°C pendant 24h, les résultats ont montré l'absence totale de l'activité antimicrobienne pour toutes les souches inhibitrices.

Plusieurs recherches ont montré l'effet du pH sur l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques. Les recherches ont montré que le pH idéal pour la génération de l'activité antagoniste est au dépend de la souche bactérienne et du type de la bactériocine produite. Le pH optimal pour la croissance bactérienne n'est pas toujours le même pour l'activité antimicrobienne (Mataragas et al. 2002).

Ganzorig, (2016) a observé que l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques est élevée dans un intervalle de pH entre 4 et 8 avec une activité très bonne dans une plage de pH entre 5 et 7 vis à vis de deux souches indicatrices : *Bacillus subtilis* et *E. coli*. Il a observé que l'activité augmente avec l'augmentation du pH de cultivation fluctuant entre 4 et 8. Il a observé aussi que cette activité diminue après l'augmentation ou la diminution du pH ; et disparaît totalement au pH variant entre 2 et 10.

Djadouni & Kihal, (2012) ont trouvé que la production optimale de l'agent antimicrobien par l'isolat LBbb0141 a été à un pH initial de 7.5 avec une absence ou une faible activité antagoniste dans un intervalle de pH compris entre 3,5 et 9,5. Ces résultats sont en concordance avec les notre.

Généralement les aliments et les produits laitiers fermentés ont un pH bas, comme c'est le cas pour le fromage traditionnel J'ben et le Michouna (fromage traditionnel algérien) où le pH avoisine 4.5 à 5.5. Sur cette base on a choisi pour tester l'activité antagoniste les deux valeurs de pH (4.7 et 5.5). Il est intéressant que les bactéries lactiques soient capables de générer l'inhibition dans les conditions du pH bas pour leur application dans la bio-conservation des produits laitiers comme les fromages.

Nos souches peuvent être utilisées dans la première phase de production des aliments fermentés et des produits laitiers et pour l'inhibition contrôlée des flores de contamination selon

le potentiel d'inhibition obtenu. Nos souches ne s'adaptent pas dans les conditions où le pH initial est bas c'est-à-dire dans les produits fermentés en post-acidification.

### 4 Etudes des aptitudes technologiques

Le choix de levains lactiques à une propriété antimicrobienne doit répondre à certaines caractéristiques technologiques liées directement ou indirectement au pouvoir inhibiteur, ces propriétés sont généralement physiologiques et métaboliques qui influencent la croissance et la production des substances antimicrobiennes.

Les métabolites qui sont caractérisés par une activité antimicrobienne comme : les acides organiques, le CO<sub>2</sub> et le diacétyle sont responsables de la production et de l'amélioration des propriétés organoleptiques, de texture, de saveur, de divers produits alimentaires fermentés.

La connaissance des propriétés technologiques ont permis de bien déterminer les potentialités des bactéries lactiques pour les exploiter selon leur performance dans les différentes utilisations.

#### 4.1 Profil de bio-résistance des souches lactiques

La caractérisation technologique des isolats a été réalisée afin d'évaluer l'adéquation des souches au processus de l'industrie alimentaire et de fabrication des produits fermentés comme le fromage et leur tolérance aux conditions hostiles.

Les souches ont été testées pour leur capacité de croissance à différentes températures : 15, 30 et 45°C, comme indiquées dans le tableau 19.

Sept souches ont pu croître à 45°C. Cinq souches du genre *Enterococcus* qui sont : KC01 et KC13 (*Enterococcus durans*) ; KC02, KC03 et KC04 (*Enterococcus faecium*) en concordance avec les différentes études qui ont montré, un critère préférentiel, soit la capacité du genre *Enterococcus* à croître à cette température (Holzapfel & Wood, 2014).

Trois souches du genre *Lactococcus* KC12, KC14 et KC15 (*Lactococcus lactis*) ont été aussi capables de croître à la température de 45°C en concordance avec les résultats de Franciosi et al. (2009). Les souches ayant ce pouvoir de croissance à une large gamme de températures peuvent être importantes dans l'industrie des aliments fermentés, car dans la transformation alimentaire les bactéries lactiques sont exposées à différentes températures. Par exemple dans le

## RESULTATS ET DISCUSSION

cas des fromages du Trentin (fromage italien), la cuisson du caillé est effectuée à une température avoisinante de 45°C (Franciosi et *al.*, 2009).

Tableau 19 : Profil de bio-résistance des souches lactiques

Souche	Températures °C			Thermorésistance (60°C, 30min)	Concentrations de 6,5% de NaCl
	15	30	45		
KC01	+	+	+	-	+
KC02	+	+	+	+	+
KC03	+	+	+	+	+
KC04	+	+	-	-	+
KC05	+	+	-	-	-
KC06	+	+	-	-	-
KC07	+	+	-	-	-
KC08	+	+	-	-	-
KC09	+	+	-	-	-
KC10	+	+	-	-	-
KC11	+	+	-	-	-
KC12	F	+	+	+	-
KC13	F	+	+	+	-
KC14	F	+	+	-	-
KC15	-	+	+	+	-

+ : réaction positive ; - : réaction négative ; F : faible croissance.

*Enterococcus durans* : KC01, KC05, KC07, KC09, KC10 et KC13 ; *Enterococcus faecium* : KC02, KC03 et KC04 ; *Leuconostoc mesenteroides* : KC06, KC08 et KC11 ; *Lactococcus lactis* : KC12, KC14 et KC15.

La croissance à 45°C pourrait être une caractéristique intéressante pour le genre *Lactococcus*, puisque ce caractère n'est pas rapporté comme typique pour ce genre de bactéries lactiques (Teuber, 1995), et surtout pour l'importance des *Lactococcus* en tant que starters primaires ou même en tant que cultures secondaires dans le développement à terme des caractéristiques organoleptiques des aliments, où il est préférable d'optimiser sa capacité à se développer à 45°C.

La plupart des souches testées se sont développées à 15°C, à l'exception de KC15 (Tableau 19).

La thermorésistance a été observée pour les souches KC02, KC03, KC12, KC13 et KC15. Cette propriété est considérée comme une caractéristique technologique intéressante. Certaines variétés de fromages subissent une cuisson jusqu'à 55°C par exemple : l'emmental (Fox & McSweeney, 2017) donc il est important que les souches utilisées dans la fabrication de ces fromages soient thermorésistantes (Tableau 19 et Figure 15).

Seuls 04 *Enterococcus* KC01 et KC13 (*Enterococcus durans*) ; KC02, KC03 et KC04 (*Enterococcus faecium*) ont pu se développer en présence de 6,5% de NaCl (Tableau 19, Figure 16). Généralement le genre *Enterococcus* peut tolérer cette concentration sauf pour certaines exceptions, ces résultats sont en concordance avec les résultats obtenus par Holzapfel & Wood, (2014).

Au cours de la fabrication du fromage, les bactéries lactiques sont exposées à différentes températures et à un environnement à forte teneur en sel (Morandi et al., 2013). La concentration en NaCl est souvent comprise entre 0.7% à 4% avec des cas spéciaux sur des fromages traditionnels tels que : Domiati qui peut atteindre de 10% à 12% de NaCl (Fox & McSweeney, 2017). Les quantités de sel ajoutées dans la fabrication peuvent fortement affecter les activités des bactéries lactiques et pour cette raison, l'évaluation de la réponse au stress osmotique dans l'étape de sélection est nécessaire (Reale et al., 2020).

Les souches entérocoques (KC01, KC02 et KC03) ont révélé un pouvoir de croissance à diverses températures et à une concentration de 6,5% de NaCl et aussi une thermorésistance à l'exception de KC01. Ces trois souches sont intéressantes pour leur implication dans la fabrication des fromages à pâte cuite (qui subissent une cuisson et un salage). Les souches *Lactococcus lactis* (KC12 et KC15) et *Enterococcus durans* (KC13) semblent être des bons ferments pour les fromages à pâte cuite.

En général, les résultats obtenus pour le profil de bio-résistance aux conditions hostiles de nos souches lactiques sont variables selon le genre de la bactérie lactique, et même variables entre les souches d'une même espèce bactérienne. Ces résultats nous ont permis de connaître leurs diversités et leurs propriétés fonctionnelles pour une exploitation individuelle ou en culture des souches dans les différentes applications technologiques de l'industrie alimentaire.

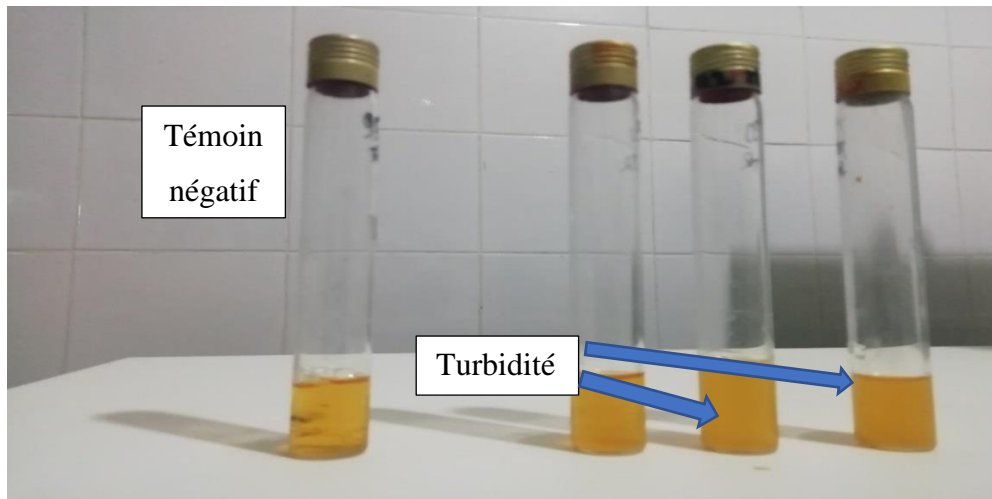


Figure 15 : Résultats de thermorésistance

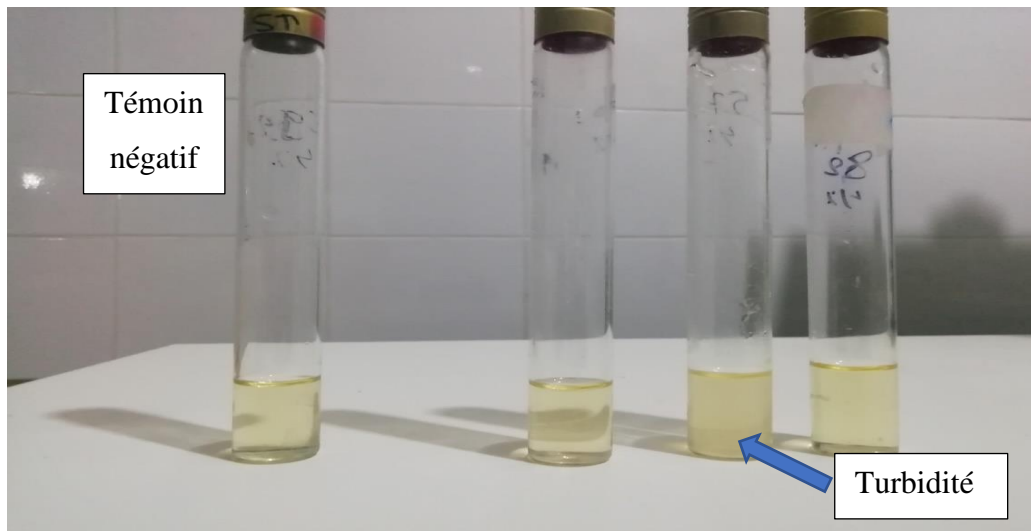


Figure 16 : Résultats de croissance à la concentration de 6,5% de NaCl

## 4.2 Profil métabolique des souches lactiques

### 4.2.1 Production du gaz à partir du glucose

La production du gaz ( $\text{CO}_2$ ) à partir du glucose est une caractéristique typique généralement utilisée pour caractériser les *Leuconostocs* parmi les bactéries lactiques ayant la forme en coques,

Dans cette étude, en plus des *Leuconostocs* KC06, KC08 et KC11, les souches d'espèce (*Enterococcus durans*) KC05, KC07, KC9 et KC10 ont montré la capacité de produire du ( $\text{CO}_2$ )

## RESULTATS ET DISCUSSION

en concordance avec les résultats obtenus par Franciosi et *al.* (2009) qui ont montré qu'une souche parmi les trois souches de l'espèce (*Enterococcus durans*) ayant eu la capacité de produire du gaz (CO<sub>2</sub>) à partir du glucose.

Les résultats sont illustrés dans la figure 17 et le tableau 20.

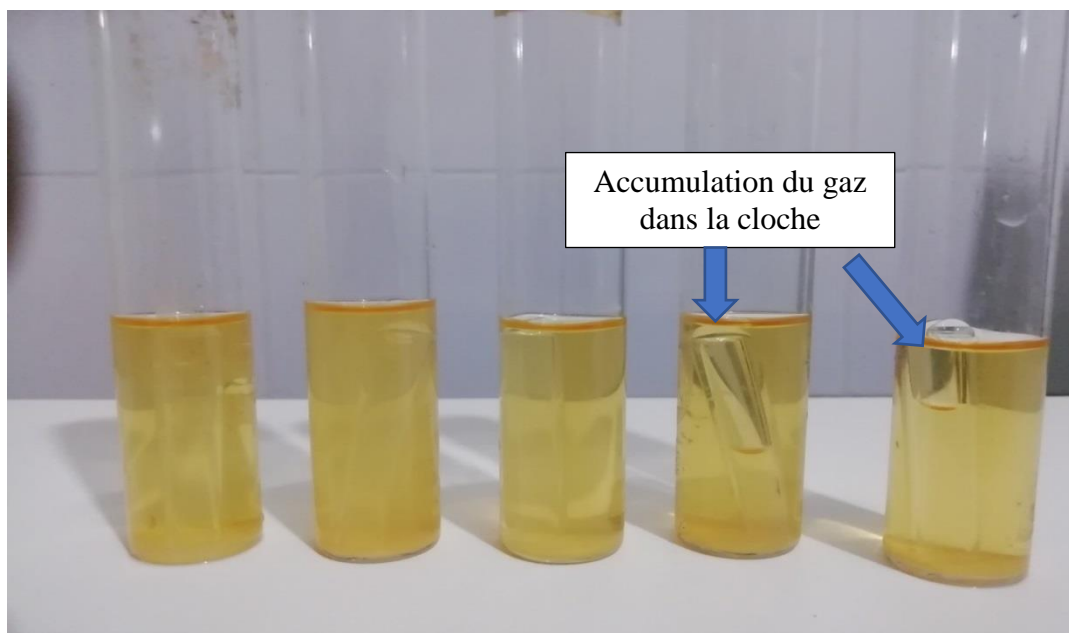


Figure 17 : Résultats de production du gaz à partir du glucose

Le CO<sub>2</sub> est un agent antimicrobien résultant de la fermentation hétérolactique qui produit de l'acide lactique, du CO<sub>2</sub> et de l'éthanol. *Leuconostoc spp* assure la sécurité et la qualité sensorielle des aliments en excréant des acides organiques avec de nombreux autres composés antimicrobiens tels que le CO<sub>2</sub> (Holzapfel & Wood, 2014 ; van Mastriigt et *al.*, 2019). Les leuconostocs sont importants dans la production des produits laitiers comme des starters responsables du développement de l'arôme. Les leuconostocs se trouvent significativement parmi les flores lactiques autochtones de certains fromages artisanaux préparés à partir du lait cru (Alegría et *al.*, 2013 ; Sandra et *al.*, 2013 ; Holzapfel & Wood, 2014).

Cependant, les souches ayant cette aptitude peuvent provoquer la détérioration des aliments, notamment la formation du dextrane et le gonflement des emballages en raison de la formation du CO<sub>2</sub>, qui est un signe typique de la détérioration par *leuconostoc* (Holzapfel & Wood, 2014).

## RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau 20 : Résultats de production du gaz et de l'hydrolyse de l'arginine et de l'esculine

Souche	Gaz	Arginine	Esculine
KC01	-	+	+
KC02	-	+	+
KC03	-	+	+
KC04	-	+	+
KC05	+	-	-
KC06	+	-	-
KC07	+	-	-
KC08	+	-	-
KC09	+	-	-
KC10	+	-	-
KC11	+	-	-
KC12	+	+	+
KC13	-	+	+
KC14	-	-	+
KC15	-	+	+

+ : réaction positive ; - : réaction négative ; Gaz : production de gaz à partir du glucose.

*Enterococcus durans* : KC01, KC05, KC07, KC09, KC10 et KC13 ; *Enterococcus faecium* : KC02, KC03 et KC04 ; *Leuconostoc mesenteroides* : KC06, KC08 et KC11 ; *Lactococcus lactis* : KC12, KC14 et KC15.

La production du CO<sub>2</sub> provoque également une formation indésirable de l'œil et des poches de gaz visibles dans le fromage. En général la production du CO<sub>2</sub> doit être contrôlée au cours de la fabrication des produits laitiers comme le fromage en contrôlant les souches lactiques impliquées dans sa manufacture.

Les entérocoques et les leuconostocs sont naturellement des bactéries ubiquistes capables de se développer à différents environnements et avec leur capacité de produire du CO<sub>2</sub> et d'autres composants antimicrobiens, nos souches seraient de bonnes candidates pour une utilisation ciblée dans les aliments fermentés ou comme des probiotiques.

### 4.2.2 Hydrolyse de l'esculine, de l'arginine et fermentation des sucres

À travers les résultats, les souches KC01, KC02, KC03 et KC04, KC12, KC13, KC14 et KC15 ont été capables d'hydrolyser l'esculine et l'arginine. La souche KC13 n'a pas hydrolysé l'arginine (Figure 18 et 19).

## RESULTATS ET DISCUSSION

Les souches KC05, LC06, KC07, KC08, KC09, KC10 et KC11 ont montré une absence d'hydrolyse de l'esculine et de l'arginine (Tableau 20).

La fermentation des sucres est présentée dans le tableau 21.

Toutes les souches étaient capables de fermenter le lactose, le glucose, cependant, quelques-unes étaient capables de fermenter la raffinose et la xylose.

La fermentation des sucres a été variable d'une souche lactique à une autre et dès fois diffère au sein d'une même espèce bactérienne (Tableau 21, Figure 20).

Tableau 21 : Profil de fermentation des sucres

Sucres	Souches														
	KC 01	KC 02	KC 03	KC 04	KC 05	KC 06	KC 07	KC 08	KC 09	KC 10	KC 11	KC 12	KC 13	KC 14	KC 15
Lac	+	ND	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	+	+	+	+	+
Glu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fru	+	ND	+	+	-	ND	ND	ND	ND	ND	+	+	+	+	+
Mal	+	ND	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	-	+	+	+	+
Sac	+	ND	-	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	+	-	+	+	-
Mel	+	ND	+	+	-	ND	ND	ND	ND	ND	-	+	+	-	-
Ara	+	ND	+	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	-	+	+	-	+
Gal	+	ND	+	+	-	ND	ND	ND	ND	ND	+	+	+	+	+
Raf	+	ND	-	+	-	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-	-	-
Xyl	+	ND	-	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-	-	-
Cel	+	ND	+	+	-	ND	ND	ND	ND	ND	-	+	+	+	+

+ : réaction positive ; - : réaction négative ; ND : non déterminé.

Lac : lactose ; Glu : glucose ; Fru : fructose ; Mal : maltose ; Sac : saccharose ; Mel : mélibiose ; Ara : arabinose ; Gal : galactose ; Raf : raffinose ; Xyl : xylose ; Cel : cellobiose.

*Enterococcus durans* : KC01, KC05, KC07, KC09, KC10 et KC13 ; *Enterococcus faecium* : KC02, KC03 et KC04 ; *Leuconostoc mesenteroides* : KC06, KC08 et KC11 ; *Lactococcus lactis* : KC12, KC14 et KC15.

La fermentation des carbohydrates est un processus métabolique crucial pour les bactéries lactiques qui garantit leur multiplication et leur survie. Les bactéries lactiques ont une capacité de fermenter diverses sucres en acide lactique. Ces sucres appartiennent aux sucres simples ou aux monosaccharides tels que les hexoses (glucose, galactose), aux pentoses (xylose), aux sucres composés tels que les dissaccharides (lactose, saccharose, maltose,) comme ils peuvent être des sucres-alcools comme des hexitols ou des pentitols (mannitol, sorbitol) ou des hétérosides (esculine). La capacité à métaboliser les sucres est fonction des souches considérées.

## RESULTATS ET DISCUSSION

Les bactéries lactiques qui sont capables de métaboliser plusieurs carbohydrates par leur système métabolique semblent être moins exigeantes et elles ont plus de capacité de dominer et de se développer facilement dans divers environnements en utilisant les sources de carbone disponibles. De point de vue biotechnologique, l'absence d'exigence nutritionnelle et la facilité de cultivation sont considérées parmi les critères de choix des bactéries lactiques probiotiques.

L'acidification est le résultat du processus de fermentation des hydrates de carbone ce qui confère aux BLs le rôle principal d'être utilisées comme des starters dans les aliments fermentés. La fermentation améliore les propriétés organoleptiques des aliments, telles que la texture et la saveur. Ainsi que la bio-conservation et le contrôle des flores indésirables par la création d'un environnement à pH bas défavorable à leur croissance et à la production des acides organiques, des métabolites antimicrobiens.

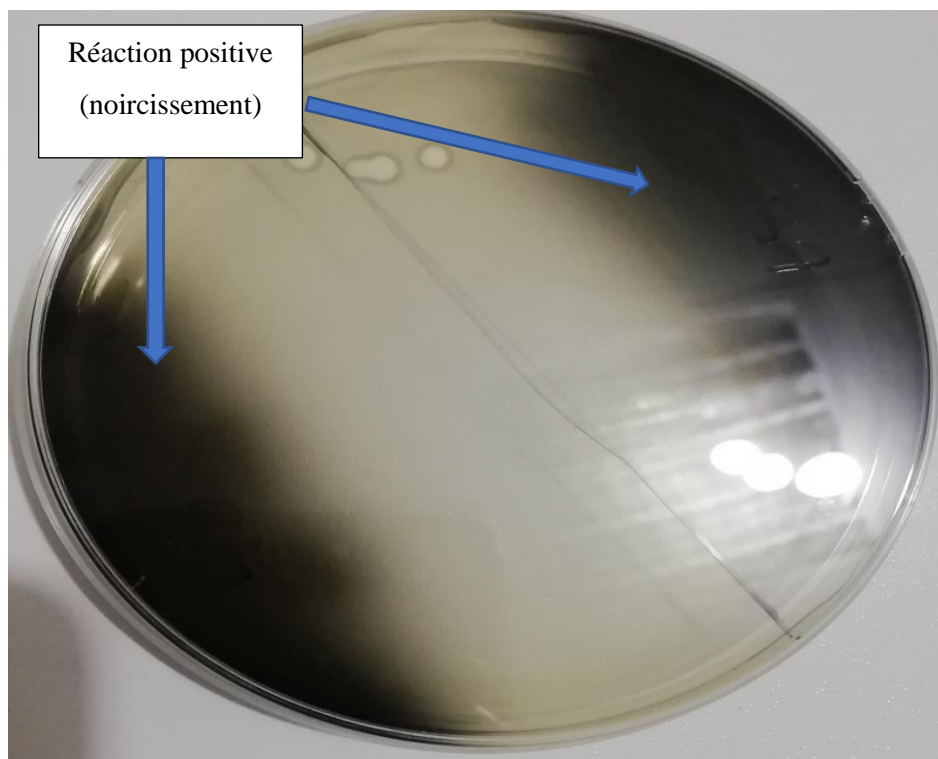


Figure 18 : Hydrolyse de l'esculine.

Des mélanges de souches ayant des capacités différentes de métabolisation des hydrates de carbone sont largement utilisés pour assurer une fermentation optimale et améliorer la qualité sensorielle des aliments (Manini et *al.*, 2016).

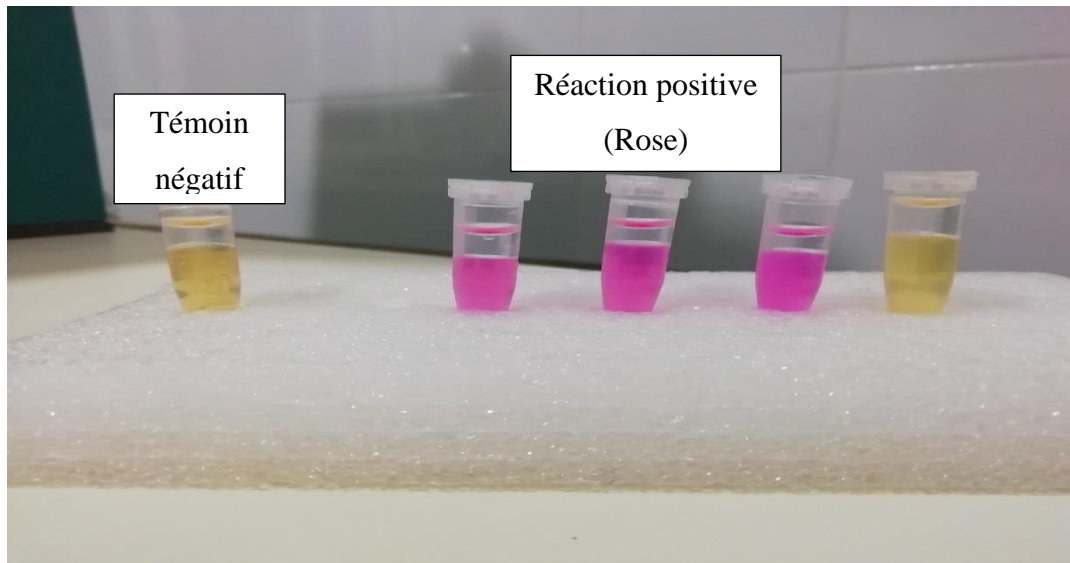


Figure 19 : Hydrolyse de l'arginine.

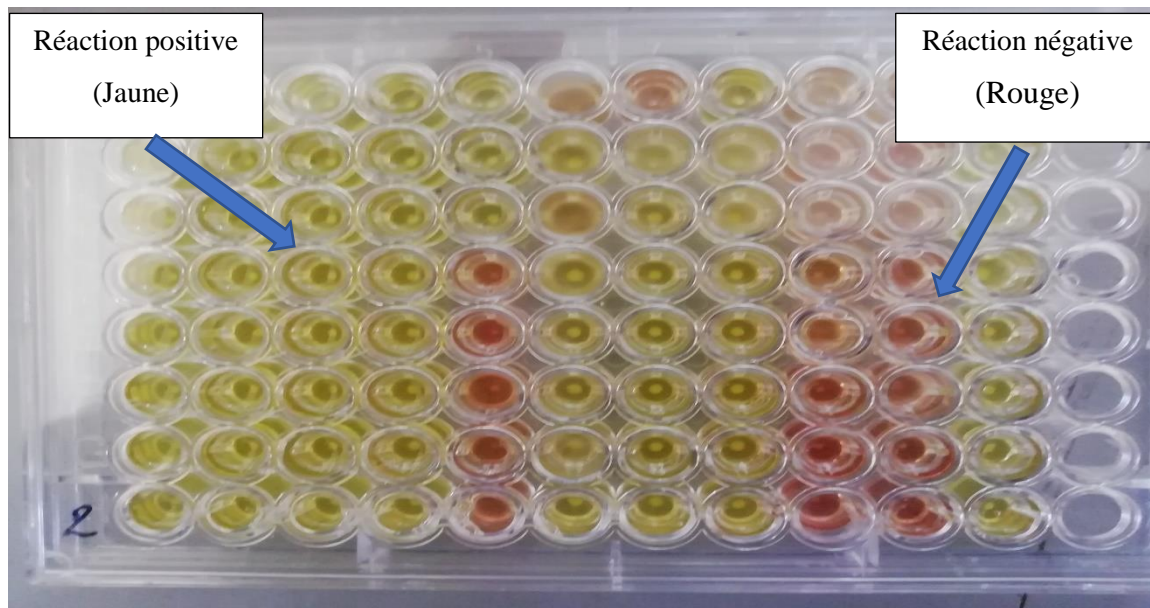


Figure 20 : Résultats de fermentation de des sucres.

### 4.3 Activité protéolytique et lipolytique des souches lactiques

Dans cette étude, les souches de bactéries lactiques ont été testées pour leurs activités de protéolyse et de lipolyse (Tableau 22) qui se sont manifestées par l'apparition de zones claires autour des puits.

## RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau 22 : Activité protéolytique et lipolytique et Production d'exopolysaccharides.

Souche	Zone d'activité (mm)		Exopolysaccharides
	AP	AL	
KC01	15,00 ± 1,00	-	-
KC02	14,50 ± 0,50	-	-
KC03	12,50 ± 0,50	-	-
KC04	13,50 ± 0,50	-	-
KC05	23,50 ± 1,50	-	+
KC06	11,50 ± 1,50	-	+
KC07	17,50 ± 2,50	-	-
KC08	16,50 ± 2,50	-	-
KC09	18,00 ± 2,00	-	+
KC10	21,75 ± 0,25	-	+
KC11	15,00 ± 1,00	-	+
KC12	12,00 ± 0,00	-	+
KC13	14,00 ± 2,00	-	+
KC14	12,50 ± 0,50	-	+
KC15	12,00 ± 0,00	-	+

AP : activité protéolytique ; AL : activité lipolytique ;

+ : activité / production positive ; - : activité / production négative.

*Enterococcus durans* : KC01, KC05, KC07, KC09, KC10 et KC13 ; *Enterococcus faecium* : KC02, KC03 et KC04 ; *Leuconostoc mesenteroides* : KC06, KC08 et KC11 ; *Lactococcus lactis* : KC12, KC14 et KC15.

Les résultats ont montré que toutes les souches testées présentaient une activité protéolytique en donnant une zone de protéolyse dans le milieu solide au lait.

Selon les résultats, la plus grande zone est obtenue par la souche KC05 (23,50 ± 1,50 mm) est la plus petite zone a été de la souche KC06 (11,5 ± 1,50 mm). Toutes nos souches lactiques ont été classées comme ayant une activité protéolytique significative (taille du halo > 10mm) comme indiqué dans la figure 21.

L'activité protéolytique a été au dépend de la souche lactique elle-même et différente entre les souches de la même espèce bactérienne.

Aucune des quinze souches testées n'a présenté d'activité lipolytique en milieu gélosé Tributyrine (Tableau 22). Des résultats similaires sont obtenus par Fusco et al. (2019) qui ont rapporté l'absence totale d'activité lipolytique des 126 souches lactiques, parmi eux 4 *Leu. mesenteroides* et 46 *Lc. lactis*, et 12 *Lactococcus spp* isolées à partir du fromage traditionnel.

Mechai et al. (2014) ont constaté que seules deux souches du genre *Lactococcus* isolées du lait fermenté et du fromage traditionnel avaient une forte activité protéolytique ; cependant Dahou et al. (2021) ont constaté que dix *Lactococcus lactis* isolés du fromage traditionnel algérien "J'ben" avaient une activité protéolytique. Franciosi et al. (2009) ont rapporté des

## RESULTATS ET DISCUSSION

caractéristiques similaires chez un *Lactococcus* (*Lc. lactis* subsp. *Lactis*) et deux *Enterococcus* (*E. durans*) isolés du lait cru de vache.

Le système protéolytique est essentiel dans les processus de fermentation et permet la croissance des BLs dans le lait ; ce système contient des enzymes qui hydrolysent la caséine et fournissent les acides aminés nécessaires aux cellules (Mayo et al., 2010 ; Balthazar et al., 2017 ; Farahani et al., 2017 ; Karakas-Sen & Karakas, 2018). Le système protéolytique contribue également à la formation de plusieurs propriétés organoleptiques dans divers produits laitiers fermentés (Savijoki et al., 2006 ; Gobbetti et al., 2018).

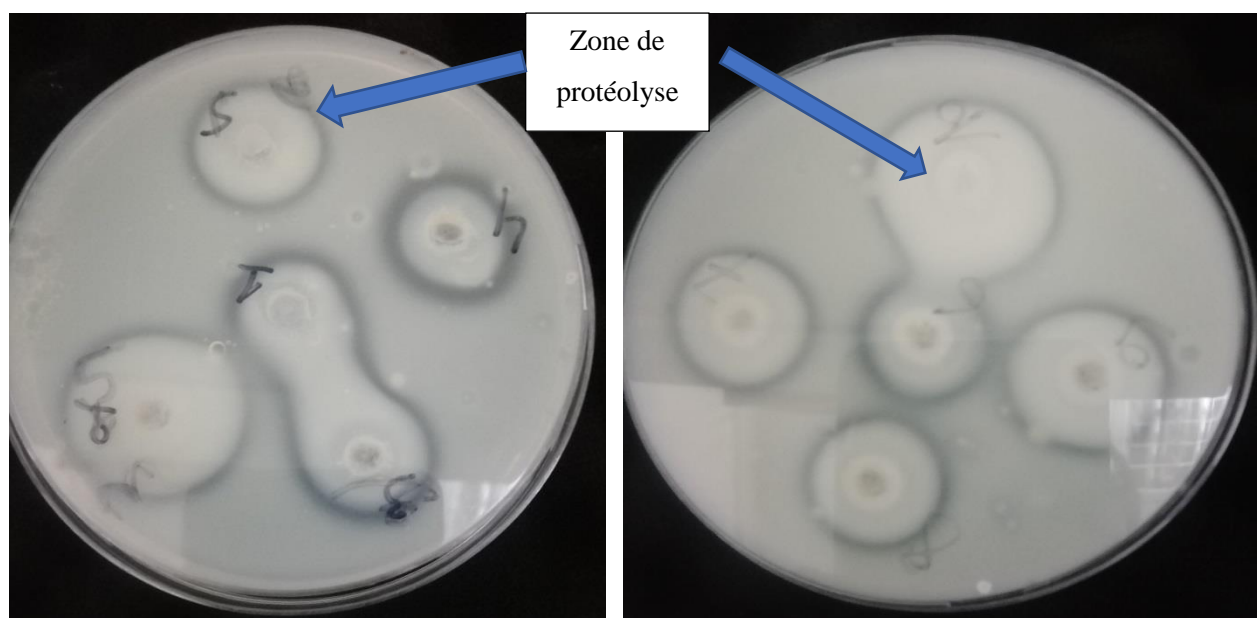


Figure 21 : Activité protéolytique des souches lactiques

Les activités protéolytiques et lipolytiques sont des critères très recherchés chez les BLs pour une utilisation comme culture starter secondaire dans la production du fromage car ces deux processus jouent un rôle vital pendant la maturation du fromage (Bruno & Carvalho, 2009).

La lipolyse est un processus important dans la maturation de certaines variétés de fromages qui joue un rôle dans le développement de la texture moelleuse chez le fromage de type Swiss (Farahani et al., 2017).

### 4.4 Activité hémolytique des souches lactiques

La présence d'une zone lytique sur les boîtes de gélose au sang a été utilisée pour évaluer l'activité hémolytique de nos souches.

Les bactéries ayant une activité hémolytique peuvent produire de l'hémolysine et détruire les globules rouges des humains ou des animaux. Nous avons constaté que toutes nos souches lactiques ont présenté une activité hémolytique de type  $\gamma$ -hémolytiques (aucune zone entourant les colonies) ce qui montre qu'elles sont sans danger pour être utilisées dans les aliments ou pour les applications probiotiques.

L'absence d'activité hémolytique est un indicateur important de sécurité lors de la sélection d'une souche probiotique (Jikang & Wenxiang, 2019).

### 4.5 Production d'exopolysaccharides par les souches lactiques

Pour la production d'exopolysaccharides, les souches ont été testées pour leur capacité à produire de l'EPS pendant leur croissance sur du MRS contenant du glucose.

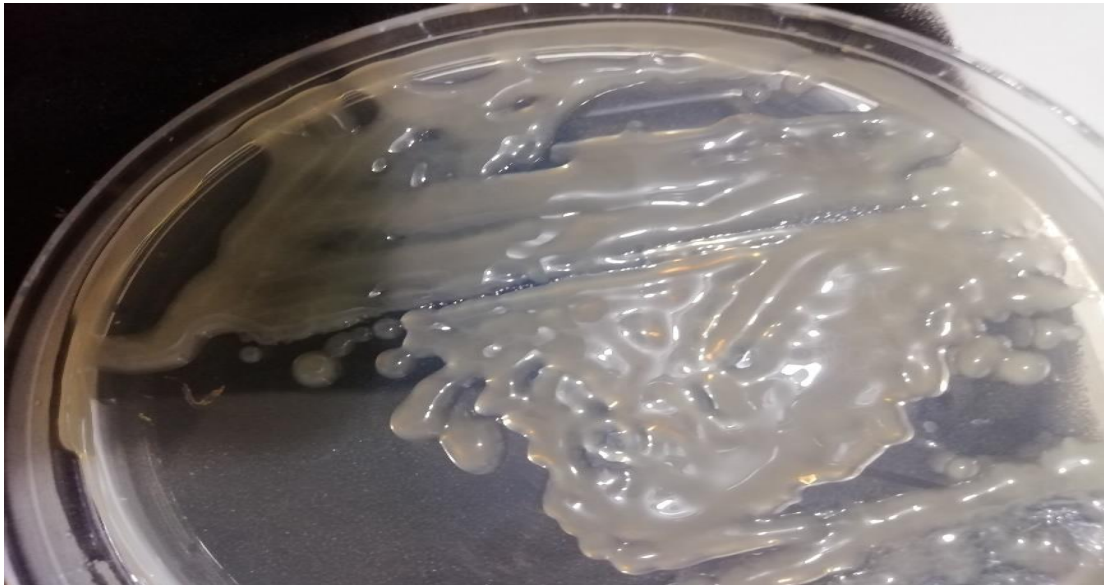


Figure 22 : Aspect de production des exopolysaccharides

Neuf souches (KC05, KC06, KC09, KC10, KC11, KC12, KC13, KC14 et KC15) ont été capables de produire des EPS lorsqu'elles étaient cultivées sur un milieu gélosé MRS contenant

du glucose (20g/L) comme source de carbone. KC15 a produit une plus grande quantité d'EPS (Figure 22).

La production d'EPS est considérée comme une caractéristique unique des BLs utilisées comme starters pour certains produits laitiers, car ces substances contribuent à améliorer la texture et la viscosité des aliments, comme la texture lisse et crémeuse du yaourt, qui est l'aspect le plus important de la qualité du yaourt.

Les EPS ont également montré un certain nombre d'effets bénéfiques sur la santé humaine, en particulier dans le traitement des maladies gastro-intestinales, des tumeurs et des maladies du foie (Gibson & Rastall, 2005).

### 4.6 Profil d'acidification des souches lactiques

La capacité d'acidification des souches est l'une des propriétés technologiques les plus importantes pour les bactéries lactiques.

Le tableau 23 montre les résultats du pH après 6h et 24h ainsi que l'acidité Dornic après 24h d'incubation à 30°C.

D'après ces résultats, on observe que la totalité de nos souches lactiques présentent un abaissement du pH du milieu (Tableau 23). Les résultats des valeurs de l'acidité titrable sont montrés après 24h et la valeur la plus élevée est celle de la souche KC02 : 61,25 degrés Dornic après 24 h d'incubation, ces valeurs sont faibles par rapport à celles obtenues par Dahou, (2017) qui a enregistré des valeurs jusqu'à 112 degrés Dornic pour le genre *Lactococcus*, 115 degrés Dornic pour *Leuconostoc* et 121 degrés Dornic pour *Enterococcus*. Meghoufel, (2019) a enregistrée des valeurs faibles qui ne dépassent pas de 59,33 degrés Dornic après 20 h qui sont des résultats proches de ceux de la présente étude.

Les valeurs du pH après 6h ont été entre 6,04 et 6,70 alors qu'après 24h ont été entre 4,47 et 5,30. Mais ces résultats ne reflètent pas vraiment la capacité de l'acidification et de diminution du pH des souches lactiques car le pH au temps 0h n'était pas similaire. Donc on a évalué l'acidification par unités du pH, qui nous a permis de définir trois classes en tenant compte des résultats obtenus par Morandi et *al.* (2013) : classe I, isolats très acidifiants présentant une baisse du pH supérieure à 2 unités de pH ; classe II, groupe d'activité acidifiante moyenne, présentant une baisse du pH comprise entre 1,5 et 2,0 unités de pH ; classe III, isolats peu acidifiants, provoquant une baisse du pH inférieure à 1,5 unités de pH (Tableau 24).

## RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau 23 : Variations des mesures du pH et de l'acidité titrable des souches

souche	pH			Degré Dornic après 24h
	0h	6h	24h	
KC01	6,78	6,31	4,53	54,05
KC02	6,82	6,32	4,70	61,25
KC03	6,75	6,30	4,86	50,40
KC04	6,75	6,25	4,85	40,00
KC05	6,63	6,24	4,63	56,00
KC06	6,91	6,70	5,30	40,00
KC07	6,92	6,50	5,19	45,00
KC08	6,94	6,28	5,12	45,00
KC09	6,63	6,25	4,58	56,60
KC10	6,46	6,10	4,77	59,20
KC11	6,60	6,14	4,70	45,00
KC12	6,60	6,23	4,47	56,30
KC13	6,55	6,04	4,76	51,80
KC14	6,51	6,06	4,66	51,50
KC15	6,55	6,07	4,79	49,10

*Enterococcus durans* : KC01, KC05, KC07, KC09, KC10 et KC13 ; *Enterococcus faecium* : KC02, KC03 et KC04 ; *Leuconostoc mesenteroides* : KC06, KC08 et KC11 ; *Lactococcus lactis* : KC12, KC14 et KC15.

L'activité d'acidification est évaluée après 6H et après 24H. Aucune de nos souches ne s'est révélée rapidement acidifiante après 6H et elles réduisent le pH de moins de 1,0 unité de pH. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Meghoufel, (2019) et Morandi et al. (2013).

Cependant, après 24H, toutes les souches réduisent le pH de plus de 1,5 unités, et seules 5 souches KC01, KC02, KC5, KC9 et KC12 réduisent le pH de 2,0 unités ou plus, et dans ce cas, on peut les classer dans la classe I comme des isolats très acidifiants ; les souches KC03, KC04 et KC11 réduisent également le pH de 1,9 unités.

Les restes des souches sont classés parmi le groupe de classe II avec une activité acidifiante moyenne. Meghoufel, (2019) a rapporté une baisse de pH de 1,16 à 1,29 unités de pH après 20h et donc des souches peu acidifiantes, contrairement à nos souches.

Plusieurs auteurs ont indiqué que la réduction du pH est au dépend de la souche lactique, il existe une variation entre les différentes espèces, et au sein des souches de la même espèce (Aquilanti et al., 2007; Morandi et al., 2011 ; Fusco et al., 2019).

Nos résultats ont montré que l'activité d'acidification se situait entre pH 4,47 et 5,30. Nos résultats sont en accord avec Karakas-Sen & Karakas, (2018) où ils ont trouvé que parmi les cocci appartenant à (*Enterococcus durans*, *Enterococcus faecium* et *Lactococcus lactis*) une capacité d'acidification dans le lait écrémé qui se situait à un pH entre 4,33 et 5,3. Cependant, Fusco et al. (2019) ont isolé des souches de *Lactococcus lactis* à partir de fromages traditionnels

## RESULTATS ET DISCUSSION

italiens dont la capacité d'acidification était plus élevée où le pH était inférieur à 4,5, mais l'acidification des souches de *Leuconostoc mesenteroides* était variable.

Tableau 24 : Profil d'acidification des souches

Souche	ΔpH 6h		ΔpH 24h	
	Classe III ΔpH<1,5	Classe II 1,5<ΔpH<2	Classe I ΔpH>2	
KC01	0,47		2,25	
KC02	0,50		2,12	
KC03	0,45	1,89		
KC04	0,50	1,90		
KC05	0,39		1,98	
KC06	0,21	1,61		
KC07	0,42	1,73		
KC08	0,66	1,82		
KC09	0,38		2,05	
KC10	0,36	1,69		
KC11	0,46	1,90		
KC12	0,21		2,13	
KC13	0,51	1,76		
KC14	0,45	1,85		
KC15	0,48	1,76		

*Enterococcus durans* : KC01, KC05, KC07, KC09, KC10 et KC13 ; *Enterococcus faecium* : KC02, KC03 et KC04 ; *Leuconostoc mesenteroides* : KC06, KC08 et KC11 ; *Lactococcus lactis* : KC12, KC14 et KC15.

La capacité d'acidification est l'élément principal pour le choix des bactéries lactiques comme des starters primaires destinés à la production d'aliments fermentés et des produits laitiers tels que les fromages. L'acidification est aussi le principal élément qui assure la bio-préservation des produits alimentaires par la diminution du pH et la production des acides organiques.

De point de vue technologique, la capacité d'acidification d'une souche lactique est en fonction du temps c'est-à-dire dépend de la vitesse d'acidification qui est en fonction du degré de l'acidification et de la valeur d'abaissement du pH à la limite de la consommation des carbohydrates. Sur ce principe que les bactéries lactiques sont classées en trois classes dont nous avons énumérées ci-dessus.

Les résultats obtenus ont montré une bonne capacité d'acidification des souches lactiques, qui pourraient être des candidats intéressants pour la bio-fermentation et la bio-conservation des aliments avec des aptitudes biotechnologiques requises.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les bactéries lactiques présentent un grand intérêt comme des agents de sécurité alimentaire. Leur utilisation est reconnue depuis l'antiquité pour la bio-préservation et l'augmentation de la durée de vie des aliments ainsi que l'amélioration de leur qualité nutritionnelle. Le fromage traditionnel "J'ben" est une denrée alimentaire incontestable avec une grande diversité de bactéries lactiques, un important potentiel de sécurité sanitaire et des propriétés technologiques multiples.

Les analyses physicochimiques des différents échantillons du fromage J'ben ont montré des grandes variabilités des valeurs. Celles-ci seraient dues principalement à celle du lait d'origine utilisé pour la fabrication. Les valeurs obtenues ont confirmé que le fromage traditionnel étudié était inconstant sur le plan de sa composition. Les résultats nous ont permis de classer néanmoins ces fromages dans la catégorie des fromages frais mi-gras de type pâte molle.

L'étude microbiologique a mis en évidence la biodiversité de la flore lactique du fromage traditionnel J'ben de Naâma. La caractérisation morphologique et phénotypique de 76 isolats a donné les résultats comme suit : *Enterococcus* (44 souches = 57,89 %), *Lactococcus* (18 souches = 23,68 %) et *Leuconostoc* (14 souches = 18,42 %). Parmi ces isolats, 15 ont subi une identification moléculaire selon leur séquence du gène de leur ADNr 16S et ont révélé les résultats suivants : *Enterococcus durans* (6/15 souches) et *Enterococcus faecium* (3/15 souches), *Lactococcus lactis* (3/15 souches) et *Leuconostoc mesenteroides* (3/15 souches). On a observé que l'identification phénotypique des 15 isolats a été similaire à leur caractérisation génotypique à l'exception de KC05, KC07, KC09 et KC10 qui ont été phénotypiquement *Leuconostoc* et génotypiquement *Enterococcus* et KC13 qui a été phénotypiquement du genre *Lactococcus* et génotypiquement du genre *Enterococcus*.

L'activité inhibitrice vis-à-vis des différentes souches pathogènes a montré que toutes les souches lactiques sélectionnées ont cette propriété. Néanmoins, les résultats d'inhibition sont variables en fonction de la souche lactique considérée et de la souche indicatrice.

L'interaction entre les souches lactiques a donné des résultats positifs significatifs. Dans la majorité des cas, il y a eu absence d'inhibition entre les souches, ou parfois une faible inhibition, sauf pour la souche KC08. On peut conclure que les bactéries lactiques isolées sont

qualifiées pour une utilisation en association ou au sein d'une communauté microbienne sans impact négatif.

L'activité inhibitrice est due à la production de différents agents inhibiteurs en fonction de la souche lactique. Ces agents ont été déterminés comme suit : les acides organiques, le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, et les agents de nature protéique (bactériocines). Cette activité peut être due aussi à un effet combiné entre les agents inhibiteurs caractérisés, ou d'autres non déterminés dans le cadre de cette étude.

Dans ce travail, l'étude de l'effet des différents facteurs sur l'activité inhibitrice des bactéries lactiques, a été réalisée dans l'objectif de connaître la capacité d'inhibition de chaque souche dans les différentes conditions. Cela permettra de maîtriser et orienter leur utilisation dans les aliments en fonction de leurs aptitudes. L'activité inhibitrice a été évaluée par rapport à différents facteurs : les milieux de culture (M17, MRS et MH), le NaCl et le pH. Les résultats obtenus ont été variables avec l'observation d'une activité inhibitrice recherchée dans les différents milieux de cultures sauf dans le MH et une activité inhibitrice dans 2% de NaCl mais avec aucune inhibition dans les pH acide (pH 4.7 et 5.5).

Les bactéries lactiques sélectionnées ont été testées pour leurs propriétés technologiques avec des caractéristiques pertinentes comme leur croissance dans les conditions hostiles et leurs activités acidifiante et protéolytique. Avec leurs aptitudes biotechnologiques et leurs activités antimicrobiennes dans les différentes conditions vis-à-vis des souches pathogènes, ces souches semblent être qualifiées pour être des bons candidats pour une utilisation comme des starters en biotechnologie et comme probiotiques. L'absence des inhibitions inter bactériennes leur confère les potentialités d'être associées au sein d'une communauté.

Les résultats préliminaires obtenus sont relativement encourageants pour poursuivre et approfondir plus le travail entrepris.

Parmi les perspectives envisagées pour consolider et promouvoir cette étude, les actions suivantes sont préconisées :

- Prise en compte des procédés de fabrication du fromage et des conditions de production du lait et de son origine (vache, brebis, chèvre ou mélanges).
- L'identification approfondie des isolats sélectionnés, ainsi que la caractérisation moléculaire des autres isolats pour valoriser leur activité antimicrobienne et leurs propriétés technologiques.

- L'étude de l'activité antimicrobienne des souches identifiées contre un panel plus large de bactéries pathogènes.
  - La détermination et la quantification des agents inhibiteurs (peroxyde d'hydrogène, les différents acides organiques, le diacétyl, etc.).
  - L'étude de la production des bactériocines par les souches selon les différents paramètres (identification des bactériocines, quantification, optimisation de leur production, évaluation de leur activité antimicrobienne...).
  - L'étude des possibilités d'association des différentes souches lactiques (Entérocoques, Lactocoques, leuconostocs...) et la détermination de leur efficacité antimicrobienne et technologique au sein d'une communauté.
    - L'étude de leurs paramètres de sécurité (antibiorésistance, production des amines biogéniques...) ainsi que les autres propriétés technologiques et les caractéristiques probiotiques.
    - L'exploitation des activités antimicrobiennes et les propriétés technologiques dans différentes matrices alimentaires ou des formes pharmaceutiques (probiotiques) en vue de lutter contre les agents de contamination et d'altération alimentaire, ainsi que les pathogènes qui causent des problèmes sanitaires.
    - Développement de levains lactiques spécifiques contenant des combinaisons de souches pourvues de capacités antimicrobiens et fonctionnelles pour d'éventuelles applications dans des modèles des produits fermentés.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbaszadeh, S., Sharifzadeh, A., Shokri, H., Khosravi, A., & Abbaszadeh, A. (2014).** Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. *Journal de mycologie médicale*, 24(2), e51-e56.
- Abo-Amer, A. E. (2011).** Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus acidophilus* AA11, a strain isolated from Egyptian cheese. *Annals of microbiology*, 61, 445-452.
- Adams, M., & Hall, C. (1988).** Growth inhibition of food-borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. *International Journal of Food Science & Technology*, 23(3), 287-292.
- Adebayo, O. O. (2018).** Evaluation of bacterial polymers as protective agents for sensitive probiotic bacteria. Doctoral thesis. University of Wolverhampton, Wolverhampton. United Kingdom. 268 pages.
- Aguirre, M., & Collins, M. (1993).** Lactic acid bacteria and human clinical infection. *Journal of Applied Bacteriology*, 75(2), 95-107.
- Albano, H., Pinho, C., Leite, D., Barbosa, J., Silva, J., Carneiro, L., Magalhães, R., Hogg, T., & Teixeira, P. (2009).** Evaluation of a bacteriocin-producing strain of *Pediococcus acidilactici* as a biopreservative for “Alheira”, a fermented meat sausage. *Food control*, 20(8), 764-770.
- Alegria, Á., Delgado, S., Flórez, A. B., & Mayo, B. (2013).** Identification, typing, and functional characterization of *Leuconostoc spp.* strains from traditional, starter-free cheeses. *Dairy Science & Technology*, 93, 657-673.
- Almena-Aliste, M., & Mietton, B., 2014.** Cheese classification, characterization and categorization: a global perspective. *Microbiol. Spectr.* 2 (1), CM-0003-2012.
- Amimour, M. (2019).** Essais d’optimisation des procédés de fabrication des fromages traditionnels de qualité (*J’ben*). Thèse de Doctorat en Science et Technologie Alimentaire. Université de Mostaganem, 209 pages.
- Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E., & Chevallier, I. (2006).** Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1-Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food control*, 17(6), 454-461.
- AOAC. (1990).** Official methods of analysis. In: Aoac Washington, DC.

- Aquilanti, L., Silvestri, G., Zannini, E., Osimani, A., Santarelli, S., & Clementi, F. (2007).** Phenotypic, genotypic and technological characterization of predominant lactic acid bacteria in Pecorino cheese from central Italy. *Journal of Applied Microbiology*, *103*(4), 948-960.
- Arroyo, R., Martín, V., Maldonado, A., Jiménez, E., Fernández, L., & Rodríguez, J. M. (2010).** Treatment of infectious mastitis during lactation: antibiotics versus oral administration of *Lactobacilli* isolated from breast milk. *Clinical Infectious Diseases*, *50*(12), 1551-1558.
- Ashraf, R., & Shah, N. P. (2014).** Immune system stimulation by probiotic microorganisms. *Critical reviews in food science and nutrition*, *54*(7), 938-956.
- Atrih, A., Rekhif, N., Moir, A.J.G., Lebrihi, A. & Lefebvre, G. (2001)** Mode of action, purification and amino acid sequence of plantaricin C19, an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19. *Int. J. Food Microbiol.* *68*: 93–104.
- Aunbjerg, S. D., Honoré, A. H., Marcussen, J., Ebrahimi, P., Vogensen, F. K., Benfeldt, C., ... & Knøchel, S. (2015).** Contribution of volatiles to the antifungal effect of *Lactobacillus paracasei* in defined medium and yogurt. *International journal of food microbiology*, *194*, 46-53.
- Ayivi, R. D., Gyawali, R., Krastanov, A., Aljaloud, S. O., Worku, M., Tahergorabi, R., ... & Ibrahim, S. A. (2020).** Lactic acid bacteria: Food safety and human health applications. *Dairy*, *1*(3), 202-232.
- Bachmann, H. P., Frohlich-Wyder, M. T., Jakob, E., Roth, E., Wechsler, D., Beuvier, E., & Buchin, S. (2011).** Raw milk cheeses. In J. W. Fuquay, P. F. Fox & P. L. H. Mc Sweeney (Eds.) *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 652–660). (2nd ed. Vol. 1). San Diego: Academic Press, Elsevier Ltd.
- Bacon, R. T., & Sofos, J. N. (2003).** Characteristics of biological hazards in foods. *Food safety handbook*, *10*, 157-95.
- Badis, A., Guetarni, D., Boudjema, B. M., Henni, D. E., & Kihal, M. (2004a).** Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiology*, *21*(5), 579-588.
- Badis, A., Guetarni, D., Moussa-Boudjemaa, B., Henni, D. E., Tornadijo, M. E., & Kihal, M. (2004b).** Identification of cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw

- goat's milk and evaluation of their technological properties. *Food Microbiology*, 21(3), 343-349.
- Bajagai, Y. S., Klieve, A. V., Dart, P. J., & Bryden, W. L. (2016).** Probiotics in animal nutrition: production, impact and regulation. FAO.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016).** Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), 71-79.
- Balthazar, C., Pimentel, T., Ferrão, L., Almada, C., Santillo, A., Albenzio, M., Mollakhalili, N., Mortazavian, A., Nascimento, J. S., & Silva, M. (2017).** Sheep milk: physicochemical characteristics and relevance for functional food development. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 16(2), 247-262.
- Batdorj, B., Dalgalarondo, M., Choiset, Y., Pedroche, J., Métro, F., Prévost, H., Chobert, J. M., & Haertlé, T. (2006).** Purification and characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolian airag. *Journal of Applied Microbiology*, 101(4), 837-848.
- Belguesmia, Y., Spano, G., & Drider, D. (2021).** Potentiating effects of leaderless enterocin DD14 in combination with methicillin on clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* S1 strain. *Microbiological Research*, 252, 126864.
- Beresford, T., & Williams, A. (2004).** The microbiology of cheese ripening. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M. & Guinee, T.P. (eds), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. London: Elsevier, pp. 287–318.
- Bhola, J., & Bhadekar, R. (2019).** In vitro synergistic activity of lactic acid bacteria against multi-drug resistant staphylococci. *BMC complementary and alternative medicine*, 19, 1-8.
- Björkroth, J., & Holzapfel, W. (2006).** Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. *The prokaryotes*, 4, 267-319.
- Bian, X., Evivie, S. E., Muhammad, Z., Luo, G. W., Liang, H. Z., Wang, N. N., & Huo, G. C. (2016).** In vitro assessment of the antimicrobial potentials of *Lactobacillus helveticus* strains isolated from traditional cheese in Sinkiang China against food-borne pathogens. *Food & function*, 7(2), 789-797.
- Bintsis, T. (2017).** Foodborne pathogens. *AIMS microbiology*, 3(3), 529.

- Bintsis, T. (2018).** Lactic acid bacteria: their applications in foods. *J. Bacteriol. Mycol*, 6(2), 89-94.
- Biswas, S. R., Ray, P., Johnson, M. C., & Ray, B. (1991).** Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(4), 1265-1267.
- Bosch, A., Pintó, R. M., & Guix, S. (2016).** Foodborne viruses. *Current Opinion in Food Science*, 8, 110-119.
- Braga, R. M., Dourado, M. N., & Araújo, W. L. (2016).** Microbial interactions: ecology in a molecular perspective. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 86-98.
- Brogden, K. A. (2005).** Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), 238-250.
- Brooks, J. C., Martinez, B., Stratton, J., Bianchini, A., Krokstrom, R., & Hutkins, R. (2012).** Survey of raw milk cheeses for microbiological quality and prevalence of foodborne pathogens. *Food Microbiology*, 31(2), 154-158.
- Bruno, L. M., & Carvalho, J. D. G. (2009).** Microbiota láctica de queijos artesanais.
- Bungenstock, L., Abdulmawjood, A., & Reich, F. (2020).** Evaluation of antibacterial properties of lactic acid bacteria from traditionally and industrially produced fermented sausages from Germany. *PLoS One*, 15(3), e0230345.
- Burkhalter, G. (1981).** Catalogue of Cheese, Document 141. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
- Califano, A. N., & Bevilacqua, A. E. (2000).** Multivariate analysis of the organic acids content of Gouda type cheese during ripening. *Journal of Food Composition and Analysis*, 13(6), 949-960.
- Callon, C., Millet, L., & Montel, M. C. (2004).** Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers cheese. *Journal of Dairy Research*, 71(2), 231-244.
- Câmara, S. P., Dapkevicius, A., Riquelme, C., Elias, R. B., Silva, C. C. G., Malcata, F. X., & Dapkevicius, M. L. N. E. (2019).** Potential of lactic acid bacteria from Pico cheese for starter culture development. *Food Science and Technology International*, 25(4), 303-317.

- Campion, A., Casey, P. G., Field, D., Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2013).** In vivo activity of Nisin A and Nisin V against *Listeria monocytogenes* mice. *BMC microbiology*, 13(1), 1-8.
- Caplice, E., & Fitzgerald, G. F. (1999).** Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International journal of food microbiology*, 50(1-2), 131-149.
- Carminati, D., Giraffa, G., Quiberoni, A., Binetti, A., Suárez, V., & Reinheimer, J. (2010).** Advances and trends in starter cultures for dairy fermentations. *Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications*, 177-192.
- Cary, J. W., Linz, J. E., & Bhatnagar, D. (Eds.). (1999).** *Microbial foodborne diseases: mechanisms of pathogenesis and toxin synthesis*. CRC Press.
- Casalta, E., Sorba, J. M., Aigle, M., & Ogier, J. C. (2009).** Diversity and dynamics of the microbial community during the manufacture of Calenzana, an artisanal Corsican cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 133(3), 243-251.
- Castro, M. P., Palavecino, N., Herman, C., Garro, O. A., & Campos, C. A. (2011).** Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. *Meat Science*, 87(4), 321-329.
- Chambre, M., & Daurelles, J. (1997).** Le fromage fondu. *ECK, A., GILLIS, JC Le Fromage, Paris: Technique et documentation Lavoisier. Terceira edição*, 691-708
- Chen, W., Narbad, A., Narbad, A., & Wang, G. (2018).** Lactic acid bacteria and foodborne pathogens. *Lactic Acid Bacteria in Foodborne Hazards Reduction: Physiology to Practice*, 183-212.
- Chittora, D., Meena, B., Jain, T., & Sharma, K. (2022).** Biopreservation: bacteriocins and lactic acid bacteria. *Journal of Postharvest Technology*, 10(2), 1-15.
- Cholet, O. (2006).** Etude de l'écosystème fromager par une approche biochimique et moléculaire. INAPG (AgroParisTech).
- Chung, T. C., Axelsson, L., Lindgren, S. E., & Dobrogosz, W. J. (1989).** In vitro studies on reuterin synthesis by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial ecology in health and disease*, 2(2), 137-144.

- Claesson, M.J., van Sinderen, D., & O'Toole, P.W. (2007).** The genus *Lactobacillus* – a genomic basis for understanding its diversity. *FEMS Microbiol. Lett.* 269(1):p. 22-8.
- Codex Alimentarius . (2001).** Group standard for unripened cheese including fresh cheese. Codex Standard, 221.
- Cogan, T.M. (2014).** Starter cultures: employed in cheese making. In: Tortorello, M.L. (Ed.), *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, Oxford, pp. 508–514.
- Cogan, T. M., O'Dowd, M., & Mellerick, D. (1981).** Effects of pH and sugar on acetoin production from citrate by *Leuconostoc lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 41(1), 1-8.
- Coman, M. M., Verdenelli, M. C., Cecchini, C., Silvi, S., Orpianesi, C., Boyko, N., & Cresci, A. (2014).** In vitro evaluation of antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501®, *Lactobacillus paracasei* IMC 502® and SYN BIO® against pathogens. *Journal of applied microbiology*, 117(2), 518-527.
- Corsetti, A., Gobbetti, M., Rossi, J., & Damiani, P. (1998).** Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. *Applied microbiology and biotechnology*, 50, 253-256.
- Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2005).** Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10), 777-788.
- Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2013).** Bacteriocins : a viable alternative to antibiotics?. *Nature Reviews Microbiology*, 11(2), 95-105.
- Coulon, J. B., Delacroix-Buchet, A., Martin, B., & Pirisi, A. (2004).** Relationships between ruminant management and sensory characteristics of cheeses: a review. *Le Lait*, 84(3), 221-241.
- Crow, V., Curry, B., & Hayes, M. (2001).** The ecology of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and their use as adjuncts in New Zealand Cheddar. *International Dairy Journal*, 11(4-7), 275-283.
- Csibrikné Németh, E. (2007).** Investigation of the efficiency and mode of action of lactic acid bacteria suitable for probiotic food production. Central Food research Institute. Budapest. p: 11-12.

- da Costa, R. J., Voloski, F. L., Mondadori, R. G., Duval, E. H., & Fiorentini, Â. M. (2019).** Preservation of meat products with bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from meat. *Journal of Food Quality*, 2019, 1-12.
- Dahou, A. (2017).** Etude de l'évolution de la flore microbienne indigène d'un fromage industriel à pâte molle type camembert au cours de son affinage et évaluation de ses aptitudes technologiques. Thèse de Doctorat en Production et Biotechnologie Animale. Université de Mostaganem, 168 pages.
- Dahou, A., Bekada, A., & Homrani, A. (2021).** Identification of a *Lactococcus lactis* isolated from a fresh local cheese of the western algerian steppe "J'ben of Naama". *Asian Journal of Dairy and Food Research*, 40(1), 40-44.
- Dahou, A., Homrani, A., Bensaleh, F., & Medjahed, M. (2015).** La microflore lactique d'un fromage traditionnel Algérien «type j'ben»: connaissance des écosystèmes microbiens laitiers locaux et de leurs rôles dans la fabrication des fromages. *Afrique Science*, 11(6), 1-13.
- Dalache, F. (2006).** Effets inhibiteurs des bactéries lactiques. Bactériocines de *Lactococcus* et d'*Enterococcus* : mise en évidence d'un support plasmidique. Thèse de Doctorat en microbiologie moléculaire et génétique. Université d'Oran Es-Senia. 162 pages.
- Daliri, F., Aboagye, A. A., & Daliri, E. B.-M. (2020).** Inactivation of foodborne pathogens by lactic acid bacteria. *Journal of Food Hygiene and Safety*, 35(5), 419-429.
- Davis, J.G. (1965).** Cheese. Volume 1: Basic Technology. Churchill Livingstone, London.
- De Marchi, M., Bittante, G., Dal Zotto, R., Dalvit, C., & Cassandro, M. (2008).** Effect of Holstein Friesian and Brown Swiss breeds on quality of milk and cheese. *Journal of dairy science*, 91(10), 4092-4102.
- de Moreno de LeBlanc, A., Matar, C., LeBlanc, N., & Perdigón, G. (2005).** Effects of milk fermented by *Lactobacillus helveticus* R389 on a murine breast cancer model. *Breast Cancer Research*, 7, 1-10.
- Dembélé, T., Obdrálek, V., & Votava, M. (1998).** Inhibition of bacterial pathogens by lactobacilli. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 288(3), 395-401.

- Deraz, S. F., Karlsson, E. N., Hedström, M., Andersson, M. M., & Mattiasson, B. (2005).** Purification and characterisation of acidocin D20079, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079. *Journal of biotechnology*, 117(4), 343-354.
- Desmaures, N. (1995).** Étude des laits de haute qualité : caractéristiques et aptitude microbiologique à la transformation en camembert au lait cru. Thèse de doctorat de l'université de Caen, 18-58p.
- De Vuyst, L. (1994).** Lactostrepcins, bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* strains. In *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications* (pp. 291-299). Boston, MA: Springer US.
- Dewey-Mattia, D., Manikonda, K., Hall, A. J., Wise, M. E., & Crowe, S. J. (2018).** Surveillance for foodborne disease outbreaks—United States, 2009–2015. *MMWR Surveillance Summaries*, 67(10), 1.
- Dicks, L. M., Dreyer, L., Smith, C., & Van Staden, A. D. (2018).** A review: the fate of bacteriocins in the human gastro-intestinal tract: do they cross the gut–blood barrier? *Frontiers in Microbiology*, 9, 2297.
- Dominguez, A. P. M., Bizani, D., Cladera-Olivera, F., & Brandelli, A. (2007).** Cerein 8A production in soybean protein using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, 35(2), 238-243.
- Dortu, C., & Thonart, P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques: caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 13(1).
- Dwivedy, A. K., Kumar, M., Upadhyay, N., Prakash, B., & Dubey, N. K. (2016).** Plant essential oils against food borne fungi and mycotoxins. *Current Opinion in Food Science*, 11, 16-21.
- Eck, A., & Gillis J.C. (2006).** Le Fromage, 3 édition ; Éditeur, Tec & Doc Lavoisier (25 février 2006). 891 pages.
- EFSA. (2015).** Les infections à *Campylobacter* et *Listeria* toujours en hausse dans l'UE – déclarent l'EFSA et l'ECDC. <https://www.efsa.europa.eu/fr/press/news/151217>, (27/05/2019).
- EFSA. (2018).** The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal*, 16(12).

- Eklund, T. (1984).** The effect of carbon dioxide on bacterial growth and on uptake processes in bacterial membrane vesicles. *International Journal of Food Microbiology*, 1(4), 179-185.
- El-Ziney, M. G., Arneborg, N., Uyttendaele, M., Debevere, J., & Jakobsen, M. (1998).** Characterization of growth and metabolite production of *Lactobacillus reuteri* during glucose/glycerol cofermentation in batch and continuous cultures. *Biotechnology Letters*, 20, 913-916.
- Elegado, F. B., Kim, W. J., & Kwon, D. Y. (1997).** Rapid purification, partial characterization, and antimicrobial spectrum of the bacteriocin, Pediocin AcM, from *Pediococcus acidilactici* M. *International journal of food microbiology*, 37(1), 1-11.
- Elkenany, R. M., Elsayed, M. M., Eltaysh, R. A., Zakaria, A. I., & El-Baz, A. H. (2018).** In vitro probiotic characteristics of *Enterococcus* species isolated from raw cow milk. *International Journal of Probiotics & Prebiotics*, 13.
- Erkus, O., De Jager, V. C., Spus, M., van Alen-Boerrigter, I. J., Van Rijswijck, I. M., Hazelwood, L., Janssen, P. W., Van Hijum, S. A., Kleerebezem, M., & Smid, E. J. (2013).** Multifactorial diversity sustains microbial community stability. *The ISME journal*, 7(11), 2126-2136.
- Fanny, G., Daniel, C., Thomas, M., Singer, E., Guilbaud, A., Tessier, F.J, Revol-Junelles, A.M, , F., & Foligné, B. (2018).** Occurrence and Dynamism of Lactic Acid Bacteria in Distinct Ecological Niches : A Multifaceted Functional Health Perspective. *Front.Microbiol.*, 27(11).Vol.9.
- Farahani, Z., Rasooli, I., & Owlia, P. (2017).** Isolation, identification and characterization of indigenous lactic acid bacteria for flavour improvement. *International Food Research Journal*, 24(1).
- Farkye, N. Y. (2004).** Cheese technology. *International journal of dairy technology*, 57(2-3), 91-98.
- Fernández, L., Delgado, S., Herrero, H., Maldonado, A., & Rodriguez, J. M. (2008).** The bacteriocin nisin, an effective agent for the treatment of staphylococcal mastitis during lactation. *Journal of Human Lactation*, 24(3), 311-316.
- FIL. (2018).** Normes de la Fédération Internationale du Lait « F.I.L » d'évaluation de la qualité hygiénique, microbiologique et physico-chimiques des laits : Référence ISO 707/ F.I.L

octobre 2018. Normes définies pour les analyses microbiologiques et chimiques des produits laitiers .Bruxelles (Belgique). 26-112p.

- FIL, (2021).** Cheese and Varieties Part II: Cheese Styles. [https://www.fil-idf.org/wp-content/uploads/2021/02/Cheese-and-varieties-Part-2\\_-Cheese-styles-.pdf](https://www.fil-idf.org/wp-content/uploads/2021/02/Cheese-and-varieties-Part-2_-Cheese-styles-.pdf).
- Fox, P.F. (1993).** Cheese: an overview. Fox, P.F. (Ed.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, vol. 1, second ed. Chapman & Hall, London, pp. 1–36.
- Fox, P.F. & McSweeney, P.L. (2004).** Cheese: an overview. In *Cheese : Chemistry Physics and Microbiology, general aspects, Volume 1, Third edition*. 1: 1-8.
- Fox, P. F., & McSweeney, P. L. (2017).** Cheese: an overview. *Cheese*, 5-21
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., & McSweeney, P.L. (2000).** *Fundamentals of Cheese Science. Aspen Publishers, Inc., USA.*
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. (2017a).** Microbiology of cheese ripening. *Fundamentals of cheese science*, 333-390.
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., McSweeney, P. L., Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. (2017b).** Principal families of cheese. *Fundamentals of cheese science*, 27-69.
- Fox P.F., Cogan T.M., Guinee T.P., (2017c).** Factors That Affect the Quality of Cheese. In: *Cheese. Elsevier*, 617-641.
- Fox, P., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P., O'Mahony, J., Fox, P., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P., & O'Mahony, J. (2015).** Chemistry and biochemistry of cheese. *Dairy chemistry and biochemistry*, 499-546.
- Franciosi, E., Settanni, L., Cavazza, A., & Poznanski, E. (2009).** Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. *International Dairy Journal*, 19(1), 3-11.
- Fuka, M. M., Engel, M., Skelin, A., Redžepović, S., & Schloter, M. (2010).** Bacterial communities associated with the production of artisanal Istrian cheese. *International journal of food microbiology*, 142(1-2), 19-24.

- Fuka, M. M., Wallisch, S., Engel, M., Welzl, G., Havranek, J., & Schloter, M. (2013).** Dynamics of bacterial communities during the ripening process of different Croatian cheese types derived from raw ewe's milk cheeses. *PLoS One*, 8(11), e80734.
- Fusco, V., Quero, G. M., Poltronieri, P., Morea, M., & Baruzzi, F. (2019).** Autochthonous and probiotic lactic acid bacteria employed for production of “advanced traditional cheeses”. *Foods*, 8(9), 412.
- Ganzorig, O. (2016).** Study on isolation and identification of lactic acid bacteria with high biological activities in mongolian traditional fermented beverage, Airag. Doctoral thesis. University of KITAMI. Kitami Institute of Technology. Japan.
- García-Cano, I., Rocha-Mendoza, D., Ortega-Anaya, J., Wang, K., Kosmerl, E., & Jiménez-Flores, R. (2019).** Lactic acid bacteria isolated from dairy products as potential producers of lipolytic, proteolytic and antibacterial proteins. *Applied microbiology and biotechnology*, 103, 5243-5257.
- Gevers, D., Huys, G., & Swings, J. (2001).** Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS microbiology letters*, 205(1), 31-36.
- Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2005).** Gastrointestinal infections and the protective role of probiotics and prebiotics. *Food Science and Technology Bulletin: Fu*, 1(2), 1-17.
- Goa, T., Beyene, G., Mekonnen, M., & Gorems, K. (2022).** Isolation and characterization of lactic acid bacteria from fermented milk produced in Jimma Town, Southwest Ethiopia, and evaluation of their antimicrobial activity against selected pathogenic bacteria. *International Journal of Food Science*, 2022(1), 2076021.
- Gao, Z., Daliri, E. B.-M., Wang, J., Liu, D., Chen, S., Ye, X., & Ding, T. (2019).** Inhibitory effect of lactic acid bacteria on foodborne pathogens: A review. *Journal of food protection*, 82(3), 441-453.
- Gobbetti, M., De Angelis, M., Di Cagno, R., Mancini, L., & Fox, P. F. (2015).** Pros and cons for using non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) as secondary/adjunct starters for cheese ripening. *Trends in Food Science & Technology*, 45(2), 167-178.
- Gobbetti, M., Di Cagno, R., Calasso, M., Neviani, E., Fox, P. F., & De Angelis, M. (2018).** Drivers that establish and assembly the lactic acid bacteria biota in cheeses. *Trends in Food Science & Technology*, 78, 244-254.

- Gobbetti, M., Neviani, E., & Fox, P. (2018b).** *The cheeses of Italy: Science and technology.* Springer.
- Golić, N., Čadež, N., Terzić-Vidojević, A., Šuranská, H., Beganović, J., Lozo, J., Kos, B., Šušković, J., Raspor, P., & Topisirović, L. (2013).** Evaluation of lactic acid bacteria and yeast diversity in traditional white pickled and fresh soft cheeses from the mountain regions of Serbia and lowland regions of Croatia. *International journal of food microbiology*, 166(2), 294-300.
- Gratia, A. (1925).** Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de coillbacille. *CR Seances Soc. Biol. Fil.*, 93, 1040-1041.
- Grilli, E., Messina, M., Catelli, E., Morlacchini, M., & Piva, A. (2009).** Pediocin A improves growth performance of broilers challenged with *Clostridium perfringens*. *Poultry science*, 88(10), 2152-2158.
- Guerra, N. P., Bernárdez, P. F., & Castro, L. P. (2008).** Modelling the stress inducing biphasic growth and pediocin production by *Pediococcus acidilactici* NRRL B-5627 in re-alkalized fed-batch cultures. *Biochemical Engineering Journal*, 40(3), 465-472.
- Guinane, C., Cotter, P., Hill, C., & Ross, R. (2005).** Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. *Journal of Applied Microbiology*, 98(6), 1316-1325.
- Guinee, T. P., & O'brien, B. (2010).** The quality of milk for cheese manufacture. *Technology of cheesemaking*, 1-67.
- Guo, C., & Li, J. (2013).** Hypocholesterolaemic action of *Lactobacillus casei* F0822 in rats fed a cholesterol-enriched diet. *International Dairy Journal*, 32(2), 144-149.
- Hamama, A., & Bayi, M. (1991).** Composition and microbiological profile of two Moroccan traditional dairy products: raib and jben. *International Journal of Dairy Technology*, 44(4), 118-120.
- Hammes, W.P., Weiss, N. & Holzapfel, W. (1991).** The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. & Schleifer, K.H. (eds), *The Prokaryotes*, vol. II, 2nd edn. New York: Springer-Verlag, pp. 1535–94.
- Hancock, R., & Patrzykat, A. (2002).** Clinical development of cationic antimicrobial peptides: from natural to novel antibiotics. *Current drug targets-Infectious disorders*, 2(1), 79-83.

- Hanson, L., VandeVusse, L., Jerme, M., Abad, C. L., & Safdar, N. (2016).** Probiotics for treatment and prevention of urogenital infections in women: a systematic review. *Journal of Midwifery & Women's Health*, 61(3), 339-355.
- Hastings, J. W., Stiles, M. E., & von Holy, A. (1994).** Bacteriocins of leuconostocs isolated from meat. *International journal of food microbiology*, 24(1-2), 75-81.
- Hayaloglu, A. (2016).** Cheese: Microbiology of cheese. *Reference module in food science*, 1, 1-11.
- Hayes, M., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2007).** Putting microbes to work: dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part I: overview. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*, 2(4), 426-434.
- Hemme, D., & Foucaud-Scheunemann, C. (2004).** *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy Journal*, 14(6), 467-494.
- Heng, N. C., Burtenshaw, G. A., Jack, R. W., & Tagg, J. R. (2007).** Ubericin A, a class IIa bacteriocin produced by *Streptococcus uberis*. *Applied and environmental microbiology*, 73(23), 7763-7766.
- Heredia-Castro, P. Y., Méndez-Romero, J. I., Hernández-Mendoza, A., Acedo-Félix, E., González-Córdova, A. F., & Vallejo-Cordoba, B. (2015).** Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocin-like inhibitory substances produced by *Lactobacillus spp.* isolated from artisanal Mexican cheese. *Journal of dairy science*, 98(12), 8285-8293.
- Hernandez, D., Cardell, E., & Zarate, V. (2005).** Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. *Journal of Applied Microbiology*, 99(1), 77-84.
- Hernández-González, J. C., Martínez-Tapia, A., Lazcano-Hernández, G., García-Pérez, B. E., & Castrejón-Jiménez, N. S. (2021).** Bacteriocins from lactic acid bacteria. A powerful alternative as antimicrobials, probiotics, and immunomodulators in veterinary medicine. *Animals*, 11(4), 979.
- Herve-Jimenez, L., Guillouard, I., Guedon, E., Boudebbouze, S., Hols, P., Monnet, V., Maguin, E., & Rul, F. (2009).** Postgenomic analysis of *Streptococcus thermophilus*

cocultivated in milk with *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*: involvement of nitrogen, purine, and iron metabolism. *Applied and environmental microbiology*, 75(7), 2062-2073.

**Hirsch, A., Grinsted, E., Chapman, H. R., & Mattick, A. (1951).** 446. A note on the inhibition of an anaerobic sporeformer in Swiss-type cheese by a nisin-producing streptococcus. *Journal of Dairy Research*, 18(2), 205-206.

**Höltzel, A., Gänzle, M. G., Nicholson, G. J., Hammes, W. P., & Jung, G. (2000).** The first low molecular weight antibiotic from lactic acid bacteria: reutericyclin, a new tetramic acid. *Angewandte Chemie International Edition*, 39(15), 2766-2768.

**Holzappel, W. H., & Wood, B. J. (2014).** *Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy*. John Wiley & Sons.

**Huang, F., Teng, K., Liu, Y., Cao, Y., Wang, T., Ma, C., Zhang, J., & Zhong, J. (2021).** Bacteriocins: Potential for human health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 1-17.

**Iskandar, C. F., Cailliez-Grimal, C., Borges, F., & Revol-Junelles, A.-M. (2019).** Review of lactose and galactose metabolism in Lactic Acid Bacteria dedicated to expert genomic annotation. *Trends in Food Science & Technology*, 88, 121-132.

**Ito, A., Sato, Y., Kudo, S., Sato, S., Nakajima, H., & Toba, T. (2003).** The screening of hydrogen peroxide-producing lactic acid bacteria and their application to inactivating psychrotrophic food-borne pathogens. *Current Microbiology*, 47, 0231-0236.

**Jamaly, N., Benjouad, A., Comunian, R., Daga, E., & Bouksaim, M. (2010).** Characterization of *Enterococci* isolated from Moroccan dairy products. *Afr J Microbiol Res*, 4(16), 1768-1774.

**Jensen, H. (2014).** In vitro characterization of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria: Interactions with human cells. Doctoral thesis. Norwegian University of Life Sciences. Norway.

**Jikang, J., & Wenxiang, L. (2019).** Characterization and in vitro properties of *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides* for probiotic potential and nitrite degradation. *Science Asia*, 45(6), 555-561.

- Jo, Y., Benoist, D. M., Barbano, D. M., & Drake, M. A. (2018).** Flavor and flavor chemistry differences among milks processed by high-temperature, short-time pasteurization or ultra-pasteurization. *Journal of Dairy Science*, *101*(5), 3812-3828.
- Johnson, M. (2017).** A 100-year review: cheese production and quality. *Journal of dairy science*, *100*(12), 9952-9965.
- Johnson M.E. (2011).** Cheese | Preparation of Cheese Milk. *In: Encyclopedia of Dairy Sciences*. Elsevier, 544-551.
- Joo, N. E., Ritchie, K., Kamarajan, P., Miao, D., & Kapila, Y. L. (2012).** Nisin, an apoptogenic bacteriocin and food preservative, attenuates HNSCC tumorigenesis via CHAC 1. *Cancer medicine*, *1*(3), 295-305.
- Juillard, V., & Richard, J. (1991).** Indirect interaction in milk between proteolytic and isogenic non-proteolytic strains of *Lactococcus lactis*. II. Effect of pre-culturing by a proteolytic strain. *Le lait*, *71*(1), 55-64.
- Kabuki, T., Saito, T., Kawai, Y., Uemura, J., & Itoh, T. (1997).** Production, purification and characterization of reuterin 6, a bacteriocin with lytic activity produced by *Lactobacillus reuteri* LA6. *International journal of food microbiology*, *34*(2), 145-156.
- Kalantzopoulos, G.C. (1993).** Cheese from ewes' and goats' milk. Fox, P.F. (Ed.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, vol. 2, second ed. Chapman & Hall, London, pp. 507-553.
- Karakas-Sen, A., & Karakas, E. (2018).** Isolation, identification and technological properties of lactic acid bacteria from raw cow milk. *Biosci. j.(Online)*, 385-399.
- Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N., & Fakiri, E. M. (2013).** Health benefits of probiotics: a review. *International Scholarly Research Notices*, 2013.
- Kieliszek, M., Pobiega, K., Piwowarek, K., & Kot, A. M. (2021).** Characteristics of the proteolytic enzymes produced by lactic acid bacteria. *Molecules*, *26*(7), 1858.
- Kilcawley, K. N. (2017).** Cheese flavour. In P. F. Fox, T. P. Guinee, T. M. Cogan & P. L. H. Mc Sweeney (Eds.) *Fundamentals of Cheese Science* (pp. 443-474). (2nd ed.). Boston: Springer US.

- Kim, K., Lee, G., Thanh, H. D., Kim, J.-H., Konkit, M., Yoon, S., Park, M., Yang, S., Park, E., & Kim, W. (2018).** Exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* LRCC5310 offers protection against rotavirus-induced diarrhea and regulates inflammatory response. *Journal of dairy science*, *101*(7), 5702-5712.
- Kim, W. S., Hall, R. J., & Dunn, N. W. (1997).** The effect of nisin concentration and nutrient depletion on nisin production of *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *48*, 449-453.
- Koch, J., Dworak, R., Prager, R., Becker, B., Brockmann, S., Wicke, A., ... & Stark, K. (2010).** Large listeriosis outbreak linked to cheese made from pasteurized milk, Germany, 2006–2007. *Foodborne Pathogens and Disease*, *7*(12), 1581-1584.
- Kodali, V. P., Das, S., & Sen, R. (2009).** An exopolysaccharide from a probiotic: biosynthesis dynamics, composition and emulsifying activity. *Food research international*, *42*(5-6), 695-699.
- Kongo, J.M., & Malcata, F.X., (2016).** Cheese: Processing and Sensory Properties. In: *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier, 748-754.
- König, H., Unden, G., & Fröhlich, J. (2009).** *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Springer.
- Kouakou, P., Ghalfi, H., Dortu, C., Evrard, P., & Thonart, P. (2010).** Combined use of bacteriocin-producing strains to control *Listeria monocytogenes* regrowth in raw pork meat. *International Journal of Food Science & Technology*, *45*(5), 937-943.
- Langa, S., Martín-Cabrejas, I., Montiel, R., Landete, J. M., Medina, M., & Arqués, J. L. (2014).** Combined antimicrobial activity of reuterin and diacetyl against foodborne pathogens. *Journal of dairy science*, *97*(10), 6116-6121.
- Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A., Gobbetti, M. (2000).** Purification and characterisation of novel antifungal compounds by sourdough *Lactobacillus plantarum* 21B. *Appl. Environ. Microbiol.* *66*: 4084–90.
- Leal-Sánchez, M. V., Jiménez-Díaz, R., Maldonado-Barragán, A., Garrido-Fernández, A., & Ruiz-Barba, J. L. (2002).** Optimization of bacteriocin production by batch fermentation of *Lactobacillus plantarum* LPCO10. *Applied and environmental microbiology*, *68*(9), 4465-4471.

- Lebeer, S., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C. (2008).** Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(4), 728-764.
- LeBlanc, J. G., Laiño, J. E., Del Valle, M. J., Vannini, V. V., van Sinderen, D., Taranto, M. P., ... & Sesma, F. (2011).** B-Group vitamin production by lactic acid bacteria—current knowledge and potential applications. *Journal of applied microbiology*, 111(6), 1297-1309.
- LeBlanc, J. G., Laiño, J. E., del Valle, M. J., de Giori, G. S., Sesma, F., & Taranto, M. P. (2015).** B-group vitamins production by probiotic lactic acid bacteria. *Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications*, 279-296.
- Leboffe, M., & Pierce, B. (2011).** Photographic Atlas for the microbiology laboratory. 4th editio. USA: Douglas N. Morton.
- Lee, S., & Kim, M. (2019).** *Leuconostoc mesenteroides* MKSR isolated from kimchi possesses  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity, antioxidant activity, and cholesterol-lowering effects. *LWT*, 116, 108570.
- Leksir, C. (2018).** Caractérisation, fabrication et consommation du dérivé laitier traditionnel «Klila» dans l’Est algérien. Thèse de Doctorat en Sciences Biologiques. Université 8 Mai 1945 Guelma. 156 pages.
- Leksir, C., Boudalia, S., Moujahed, N., & Chemmam, M. (2019).** Traditional dairy products in Algeria: case of Klila cheese. *Journal of Ethnic Foods*, 6(1), 1-14.
- Leyva Salas, M., Mounier, J., Maillard, M.B., Valence, F., Coton, E., Thierry, A. (2019).** Identification and quantification of natural compounds produced by antifungal bioprotective cultures in dairy products. *Food Chem.* 301, 125260.
- Li, Y.-T., Xu, H., Ye, J.-Z., Wu, W.-R., Shi, D., Fang, D.-Q., Liu, Y., & Li, L.-J. (2019).** Efficacy of *Lactobacillus rhamnosus* GG in treatment of acute pediatric diarrhea: A systematic review with meta-analysis. *World journal of gastroenterology*, 25(33), 4999.
- Libudzisz, Z., & Galewska, E. (1991).** Citrate metabolism in *Lactococcus lactis subsp. lactis* var. diacetylactis strains. *Food/Nahrung*, 35(6), 611-618.
- Line, J., Svetoch, E., Eruslanov, B., Perelygin, V., Mitsevich, E., Mitsevich, I., Levchuk, V., Svetoch, O., Seal, B., & Siragusa, G. (2008).** Isolation and purification of enterocin E-

760 with broad antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(3), 1094-1100.

- Liptáková, D., Matejčková, Z., & Valík, L. (2017).** Lactic acid bacteria and fermentation of cereals and pseudocereals. *Fermentation processes*, 10, 65459.
- Little, C. L., Rhoades, J. R., Sagoo, S. K., Harris, J., Greenwood, M., Mithani, V., ... & McLauchlin, J. (2008).** Microbiological quality of retail cheeses made from raw, thermized or pasteurized milk in the UK. *Food microbiology*, 25(2), 304-312.
- Liu, M., Bayjanov, J. R., Renckens, B., Nauta, A., & Siezen, R. J. (2010).** The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. *BMC genomics*, 11, 1-15.
- Liu, W., Pang, H., Zhang, H., & Cai, Y. (2014).** Biodiversity of lactic acid bacteria. *Lactic acid bacteria: Fundamentals and practice*, 103-203.
- López-Seijas, J., García-Fraga, B., da Silva, A. F., & Sieiro, C. (2019).** Wine lactic acid bacteria with antimicrobial activity as potential biocontrol agents against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Agronomy*, 10(1), 31.
- Lynch, K. M., Pawlowska, A. M., Brosnan, B., Coffey, A., Zannini, E., Furey, A., ... & Arendt, E. K. (2014).** Application of *Lactobacillus amylovorus* as an antifungal adjunct to extend the shelf-life of Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 34(1), 167-173.
- Lytvyn, L., Quach, K., Banfield, L., Johnston, B., & Mertz, D. (2016).** Probiotics and synbiotics for the prevention of postoperative infections following abdominal surgery: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of hospital infection*, 92(2), 130-139.
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y. et al. (2006).** Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *PNAS* 103: 15611–16.
- Malheiros, P. S., Sant’Anna, V., Todorov, S. D., & Franco, B. D. (2015).** Optimization of growth and bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei*2a. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46, 825-834.
- Manini, F., Casiraghi, M., Poutanen, K., Brasca, M., Erba, D., & Plumed-Ferrer, C. (2016).** Characterization of lactic acid bacteria isolated from wheat bran sourdough. *LWT-food Science and Technology*, 66, 275-283.

- Marshall, J. A., & Bruggink, L. D. (2011).** The dynamics of norovirus outbreak epidemics: recent insights. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8(4), 1141-1149.
- Martin, B., Hurtaud, C., Graulet, B., Ferlay, A., Chilliard, Y., & Coulon, J. (2009).** Grass and the nutritional and organoleptic qualities of dairy products. *Fourrages*(199), 291-310.
- Martino, G. P., Quintana, I. M., Espariz, M., Blancato, V. S., & Magni, C. (2016).** Aroma compounds generation in citrate metabolism of *Enterococcus faecium*: Genetic characterization of type I citrate gene cluster. *International journal of food microbiology*, 218, 27-37.
- Masoud, W., Vogensen, F. K., Lillevang, S., Al-Soud, W. A., Sørensen, S. J., & Jakobsen, M. (2012).** The fate of indigenous microbiota, starter cultures, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus* in Danish raw milk and cheeses determined by pyrosequencing and quantitative real time (qRT)-PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 153(1-2), 192-202.
- Mataragas, M., Metaxopoulos, J., & Drosinos, E. H. (2002).** Characterization of two bacteriocins produced by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442, isolated from dry fermented sausages. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18, 847-856.
- Matthews, K. R., Kniel, K. E., & Montville, T. J. (2017).** *Food microbiology: an introduction*. John Wiley & Sons.
- Mattick, A., & Hirsch, A. (1947).** Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci. *Lancet*, 5, 5-8.
- Mayo, B., Aleksandrak-Piekarczyk, T., Fernández, M., Kowalczyk, M., Álvarez-Martín, P., & Bardowski, J. (2010).** Updates in the metabolism of lactic acid bacteria. *Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications*, 3-33.
- Mayo, B., Rodríguez, J., Vázquez, L., & Flórez, A. B. (2021).** Microbial interactions within the cheese ecosystem and their application to improve quality and safety. *Foods*, 10(3), 602.
- Mayra-Makinen, A., & Bigret, M. (2004).** Industrial use and production of lactic acid bacteria. *Food science and technology-new york-marcel dekker-*, 139, 175-198.
- McSweeney, P.L.H., Ottogalli, G. & Fox, P.F., (2017).** Diversity and Classification of Cheese Varieties: An Overview. In: *Cheese*. Elsevier, 781-808.

- Mechai, A., Debabza, M., & Kirane, D. (2014).** Screening of technological and probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Algerian traditional fermented milk products. *International Food Research Journal*, 21(6).
- Meghoufel, N, L. (2019).** Etude de la diversité taxinomique et technologique des bactéries lactiques isolées au cours de la production de J'ben et approche moléculaire de leurs interactions au microcosme fromager. Thèse de Doctorat en Production et Biotechnologie Animales. Université de Mostaganem, 147 pages.
- Meghoufel, N. L., Homrani, A., Nemmiche, S., Benkrizi, N., Dahou, A. E., & Zbalah, R. (2017).** A brief identification of lactic acid bacteria isolated from Algerian goat's Jben by MALDI-TOF MS. *South Asian Journal of Experimental Biology*, 7(4).
- Mennane, Z., Khedid, K., Zinedine, A., Lagzouli, M., Ouhssine, M., & Elyachioui, M. (2007).** Microbial characteristics of Klila and Jben traditional Moroccan cheese from raw cow's milk. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 2(1), 23-27.
- Meskini, Z., Rechidi-Sidhoum, N., Zouaoui, K., Bounaama, K., & Homrani, A. (2021).** Infectious aetiologies of subclinical bovine mastitis and antimicrobial susceptibility on northwest of Algeria. *Veterinaria*, 70(3), 311-323.
- Miao, J., Xu, M., Guo, H., He, L., Gao, X., DiMarco-Crook, C., Xiao, H., & Cao, Y. (2015).** Optimization of culture conditions for the production of antimicrobial substances by probiotic *Lactobacillus paracasei subsp. Tolerans* FX-6. *Journal of functional foods*, 18, 244-253.
- Mietton, B., & Chablain I. (2018).** Du lait au fromage: les fondamentaux technologiques. *In: Le fromage*. 321-359.
- Mietton, B., Gaucheron, F., Michel, S, F. (2004).** In : Minéraux et produits laitiers. *Gaucheron F. Edition Tec et Doc Lavoisier. Paris* : 471-583.
- Mills, S., Stanton, C., Hill, C., & Ross, R. (2011).** New developments and applications of bacteriocins and peptides in foods. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2, 299-329.
- Mohamed, O.A.E., & El Zubeir, I.E.M. (2018).** Comparative study on chemical and microbiological properties of white cheese produced in traditional and modern factories. *Annals of Food Science and Technology* 19: 111-120.

- Molimard, P., & Spinnler, H. E. (1996).** Compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheeses: Origins and properties. *Journal of dairy science*, 79(2), 169-184.
- Monnet, C., Back, A., Irlinger, F. (2012).** Growth of aerobic ripening bacteria at the cheese surface is limited by the availability of iron. *Applied and environmental microbiology*, 78(9), 3185-3192.
- Montel, M.-C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D. A., Desmasures, N., & Berthier, F. (2014).** Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. *International journal of food microbiology*, 177, 136-154.
- Morandi, S., Brasca, M., & Lodi, R. (2011).** Technological, phenotypic and genotypic characterisation of wild lactic acid bacteria involved in the production of Bitto PDO Italian cheese. *Dairy Science & Technology*, 91, 341-359.
- Morandi, S., Cremonesi, P., Silvetti, T., & Brasca, M. (2013).** Technological characterisation, antibiotic susceptibility and antimicrobial activity of wild-type *Leuconostoc* strains isolated from north Italian traditional cheeses. *Journal of Dairy Research*, 80(4), 457-466.
- Mourad, G., Bettache, G., Samir, M., & Omrane, T. (2015).** Technological and biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian traditional dairy products. *World Applied Sciences Journal*, 33(2), 234-241.
- Mouzali, L., Aziza, M., Bensiamer-Touati, K., & Hellal-Benataya, A. (2003).** cardoon (*cynara cardunculus* l.) used as vegetable rennet in an algerian traditional cheese making DJBEN. *V International Congress on Artichoke* 660.
- Musikasang, H., Tani, A., H-kittikun, A., & Maneerat, S. (2009).** Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from chicken gastrointestinal digestive tract. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 1337-1345.
- Nes, I. F., Yoon, S.-S., & Diep, D. B. (2007).** Ribosomally synthesized antimicrobial peptides (bacteriocins) in lactic acid bacteria: a review. *Food Science and Biotechnology*, 16(5), 675-690.
- Nielsen, P. V., & Boer, E. d. (2004).** Food preservatives against fungi. *Introduction to food-and airborne fungi*(Ed. 7), 357-363.

- Nieto-Arribas, P., Seseña, S., Poveda, J. M., Chicón, R., Cabezas, L., & Palop, L. (2011).** *Enterococcus* populations in artisanal Manchego cheese: Biodiversity, technological and safety aspects. *Food microbiology*, 28(5), 891-899.
- Nouani, A., Dako, E., Morsli, A., Belhamiche, N., Belbraouet, S., Bellal, M. M., & Dadie, A. (2009).** Characterization of the purified coagulant extracts derived from artichoke flowers (*Cynara scolymus*) and from the fig tree latex (*Ficus carica*) in light of their use in the manufacture of traditional cheeses in Algeria. *J. Food Technol*, 7(1), 20-29.
- Ogier, J. C., Son, O., Gruss, A., Tailliez, P., & Delacroix-Buchet, A. (2002).** Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8), 3691-3701.
- Olaoye, O. A., & Ntuen, I. G. (2011).** Spoilage and preservation of meat: a general appraisal and potential of lactic acid bacteria as biological preservatives. *International Research Journal of Biotechnology*, 2(1), 033-046.
- Öner, Ö., Aslim, B., & Aydaş, S. B. (2014).** Mechanisms of cholesterol-lowering effects of lactobacilli and bifidobacteria strains as potential probiotics with their bsh gene analysis. *Microbial Physiology*, 24(1), 12-18.
- O'Sullivan, O., & Cotter, P. D. (2017).** Microbiota of raw milk and raw milk cheeses. In *Cheese* (pp. 301-316). Elsevier.
- Ozturkoglu-Budak, S., & De Vries, R.P. (2017).** Mold-ripened and raw milk cheeses: Production, risks, and benefits to human health. *Dairy in Human Health and Disease across the Lifespan*, Elsevier Inc., 353-361.
- Pacheco, A. R., & Segrè, D. (2019).** A multidimensional perspective on microbial interactions. *FEMS microbiology letters*, 366(11), fnz125.
- Palmai, M., & Kiskó, G. (2003).** Studies on the growth of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus casei* in mixed cultures. *Acta Alimentaria*, 32(1), 103-111.
- Papagianni, M., Avramidis, N., & Filiouis, G. (2007).** Investigating the relationship between the specific glucose uptake rate and nisin production in aerobic batch and fed-batch glucostat cultures of *Lactococcus lactis*. *Enzyme and microbial technology*, 40(6), 1557-1563.

- Pappa, E. C., Bontinis, T. G., Tasioula-Margari, M., & Samelis, J. (2017).** Microbial quality of and biochemical changes in fresh soft, acid-curd Xinotyri cheese made from raw or pasteurized goat's milk. *Food Technology and Biotechnology*, 55(4), 496.
- Parente, E., Cogan, T.M. (2004).** Starter cultures: general aspects In: Patrick, F. Fox, Timothy, P.G. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, vol. 1. *Academic Press, Oxford*, pp. 123–147.
- Parente, E., Moles, M., & Ricciardi, A. (1996).** Leucocin F10, a bacteriocin from *Leuconostoc carnosum*. *International journal of food microbiology*, 33(2-3), 231-243.
- Pastink, M. I., Sieuwerts, S., de Bok, F. A., Janssen, P. W., Teusink, B., van Hylckama Vlieg, J. E., & Hugenholtz, J. (2008).** Genomics and high-throughput screening approaches for optimal flavour production in dairy fermentation. *International Dairy Journal*, 18(8), 781-789.
- Pearse, M. J., & Mackinlay, A. G. (1989).** Biochemical aspects of syneresis: a review. *Journal of Dairy Science*, 72(6), 1401-1407.
- Perin, L. M., Pereira, J. G., Bersot, L. S., & Nero, L. A. (2019).** The microbiology of raw milk. In *Raw milk* (pp. 45-64). Elsevier.
- Pfeiler, E. A., & Klaenhammer, T. R. (2007).** The genomics of lactic acid bacteria. *Trends in microbiology*, 15(12), 546-553.
- Piard, J., & Desmazeaud, M. (1991).** Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Le lait*, 71(5), 525-541.
- Pishva, E., Hassannia, N., Fazeli, M. R., Havaee, A., Jamalifar, H., Hossein, M. P., ... & Akbari, M. (2009).** Antibacterial effect of autochthonous *Lactobacillus* strains isolated from traditional yogurts. *Pakistan journal of nutrition*, 8(8), 1132-1137.
- Podolak, R. K., Zayas, J. F., Kastner, C. L., & Fung, D. Y. C. (1996).** Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7 on beef by application of organic acids. *Journal of food protection*, 59(4), 370-373.
- Poveda, J. M., Chicón, R., Cabezas, L. (2015).** Biogenic amine content and proteolysis in Manchego cheese manufactured with *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* as adjunct and other autochthonous strains as starters. *International Dairy Journal*, 47, 94-101.

- Poznanski, E., Cavazza, A., Cappa, F., Cocconcelli, P.S. (2004).** Indigenous raw milk microbiota influences the bacterial development in traditional cheese from an alpine natural park. *International Journal of Food Microbiology*, 92: 141-151.
- Prince, A., Tiwari, A., Ror, P., Sandhu, P., Roy, J., Jha, S., Mallick, B., Akhter, Y., & Saleem, M. (2019).** Attenuation of neuroblastoma cell growth by nisin is mediated by modulation of phase behavior and enhanced cell membrane fluidity. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 21(4), 1980-1987.
- Quintana, V. M., Torres, N. I., Wachsman, M. B., Sinko, P. J., Castilla, V., & Chikindas, M. (2014).** Antiherpes simplex virus type 2 activity of the antimicrobial peptide subtilisin. *Journal of Applied Microbiology*, 117(5), 1253-1259.
- Radha, K., & Padmavathi, T. (2017).** Statistical optimization of bacteriocin produced from *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* isolated from yoghurt. *International Food Research Journal*, 24(2), 803.
- Rahmeh, R., Akbar, A., Kishk, M., Al-Onaizi, T., Al-Azmi, A., Al-Shatti, A., ... & Akbar, B. (2019).** Distribution and antimicrobial activity of lactic acid bacteria from raw camel milk. *New Microbes and New Infections*, 30, 100560.
- Ranadheera, C. S., Evans, C., Adams, M., & Baines, S. (2012).** Probiotic viability and physico-chemical and sensory properties of plain and stirred fruit yogurts made from goat's milk. *Food chemistry*, 135(3), 1411-1418.
- Ravi, V., Prabhu, M., & Subramanyam, D. (2011).** Isolation of bacteriocin producing bacteria from mango pulp and its antimicrobial activity. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 1(2), 54-63.
- Ravyts, F., Vuyst, L. D., & Leroy, F. (2012).** Bacterial diversity and functionalities in food fermentations. *Engineering in Life Sciences*, 12(4), 356-367.
- Reale, A., Zotta, T., Ianniello, R. G., Mamone, G., & Di Renzo, T. (2020).** Selection criteria of lactic acid bacteria to be used as starter for sweet and salty leavened baked products. *LWT*, 133, 110092.
- Reid, G. (2016).** Probiotics: definition, scope and mechanisms of action. *Best practice & research Clinical gastroenterology*, 30(1), 17-25.

- Riaz, N., Faheem, S. M., & Ahmad, M. U. (2020).** A Thematic Review on Potential Antimicrobial Potential Applications of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. *Eur J Pharm Med Res*, 7(11), 246-257.
- Rodriguez, J., Martinez, M., Horn, N., & Dodd, H. (2003).** Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *International journal of food microbiology*, 80(2), 101-116.
- Roissart, H et Luquet, F.M. (2016).** Bactéries lactiques : aspects fondamentaux et technologiques. Edition Loriga. 615p.
- Rolfe, R. D. (2000).** The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *The Journal of nutrition*, 130(2), 396S-402S.
- Russo, P., Arena, M. P., Fiocco, D., Capozzi, V., Drider, D., & Spano, G. (2017).** *Lactobacillus plantarum* with broad antifungal activity: A promising approach to increase safety and shelf-life of cereal-based products. *International journal of food microbiology*, 247, 48-54.
- Ryser, E. T. (2007).** Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in cheese and other fermented dairy products. In *Listeria, Listeriosis, and Food Safety* (pp. 423-520). CRC Press.
- Saidane, Z., Dahou, A. A., & Homrani, A. (2022).** Technological potential of indigenous lactic isolates of an Algerian artisanal cheese: J'ben Elgafs. *Acta Manilana*, 70, 57-67.
- Sallam, K. I. (2007).** Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. *Food control*, 18(5), 566-575.
- Salminen, S., Ouwehand, A., Benno, Y., & Lee, Y. K. (1999).** Probiotics: how should they be defined?. *Trends in food science & technology*, 10(3), 107-110.
- Salmeron, J., de Vega, C., Perez-Elortondo, F.J., Albisu, M., Barron L.J.R. (2002).** Effect of pasteurization and seasonal variations in the microflora of ewe's milk for cheese making. *Food Microbiology*, 19: 167-174.
- Samelis, J., Maurogenakis, F., & Metaxopoulos, J. (1994).** Characterisation of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami. *International journal of food microbiology*, 23(2), 179-196.
- Sandine, W.E., Elliker, P.R., (1970).** Microbiologically induced flavours and fermented foods. Flavor in fermented dairy products. *J. Agric. Food Chem.* 18, 557-562.

- Sandra, M., Dean, J., Pavle, S., Ljupco, A., Marija, R., & Mirko, P. (2013).** Microbiological properties and chemical composition of Macedonian traditional white brined cheese. *Macedonian Veterinary Review*.
- Savijoki, K., Ingmer, H., & Varmanen, P. (2006).** Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied microbiology and biotechnology*, 71, 394-406.
- Schirru, S., Favaro, L., Mangia, N. P., Basaglia, M., Casella, S., Comunian, R., Fancello, F., de Melo Franco, B. D. G., de Souza Oliveira, R. P., & Todorov, S. D. (2014).** Comparison of bacteriocins production from *Enterococcus faecium* strains in cheese whey and optimised commercial MRS medium. *Annals of microbiology*, 64, 321-331.
- Schnürer, J., & Magnusson, J. (2005).** Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends Food Sci. Technol.*, 16, 70–78.
- Sharma, C., Singh, B. P., Thakur, N., Gulati, S., Gupta, S., Mishra, S. K., & Panwar, H. (2017).** Antibacterial effects of *Lactobacillus* isolates of curd and human milk origin against food-borne and human pathogens. *3 Biotech*, 7, 1-9.
- Sidooski, T., Brandelli, A., Bertoli, S. L., Souza, C. K. d., & Carvalho, L. F. d. (2019).** Physical and nutritional conditions for optimized production of bacteriocins by lactic acid bacteria—A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(17), 2839-2849.
- Sieuwerds, S., de Bok, F. A., Hugenholtz, J., & van Hylckama Vlieg, J. E. (2008).** Unraveling microbial interactions in food fermentations: from classical to genomics approaches. *Applied and environmental microbiology*, 74(16), 4997-5007.
- Siezen, R. J., & van Hylckama Vlieg, J. E. (2011).** Genomic diversity and versatility of *Lactobacillus plantarum*, a natural metabolic engineer. *Microbial cell factories*, 10(1), 1-13.
- Siezen, R. J., Tzeneva, V. A., Castioni, A., Wels, M., Phan, H. T., Rademaker, J. L., ... & van Hylckama Vlieg, J. E. (2010).** Phenotypic and genomic diversity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from various environmental niches. *Environmental microbiology*, 12(3), 758-773.
- Silva, E. O. O., Nespolo, C. R., Sehn, C. P., Pinheiro, F. C., & Stefani, L. M. (2019).** Lactic acid bacteria with antimicrobial, proteolytic and lipolytic activities isolated from ovine dairy products. *Food Science and Technology*, 40, 293-299.

- Smid, E. J., & Lacroix, C. (2013).** Microbe–microbe interactions in mixed culture food fermentations. *Current opinion in biotechnology*, 24(2), 148-154.
- Stiles, M. E. (1994).** Bacteriocins produced by *Leuconostoc* species. *Journal of dairy science*, 77(9), 2718-2724.
- Sulieman, T.A.E., M.O.M. Abdalla., N.H.M. El Haj., H.M.O. El siddig. (2011).** Chemical and microbiological evaluation of processed cheese available in Khartoum market, Sudan. *Am. J. Food. Nutr*, (1), 28-33.
- Šušković, J., Kos, B., Beganović, J., Leboš Pavunc, A., Habjanič, K., & Matošić, S. (2010).** Antimicrobial activity—the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technology and Biotechnology*, 48(3), 296-307.
- Suzuki, C., Kimoto-Nira, H., Kobayashi, M., Nomura, M., Sasaki, K., & Mizumachi, K. (2008).** Immunomodulatory and cytotoxic effects of various *Lactococcus* strains on the murine macrophage cell line J774. 1. *International journal of food microbiology*, 123(1-2), 159-165.
- Tahiri, I., Desbiens, M., Benech, R., Kheadr, E., Lacroix, C., Thibault, S., Ouellet, D., & Fliiss, I. (2004).** Purification, characterization and amino acid sequencing of divergicin M35: a novel class IIa bacteriocin produced by *Carnobacterium divergens* M35. *International journal of food microbiology*, 97(2), 123-136.
- Tahlaiti, H. (2019).** Etude des propriétés technologiques et inhibitrices de bactéries lactiques isolées à partir de blé fermenté. Thèse de Doctorat en Microbiologie. Université de Mostaganem, 174 pages.
- Terzić-Vidojević, A., Mihajlović, S., Uzelac, G., Golić, N., Fira, Đ., Kojić, M., & Topisirović, L. (2014a).** Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal white brined Golija cows' milk cheeses. *Archives of Biological Sciences*, 66(1), 179-192.
- Terzic-Vidojevic, A., Mihajlovic, S., Uzelac, G., Veljovic, K., Tolinacki, M., Nikolic, M., Topisirovic, L., & Kojic, M. (2014b).** Characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Travnik young cheeses, sweet creams and sweet kajmaks over four seasons. *Food microbiology*, 39, 27-38.
- Terzić-Vidojević, A., Tonković, K., Pavunc, A. L., Beganović, J., Strahinić, I., Kojić, M., ... & Topisirović, L. (2015a).** Evaluation of autochthonous lactic acid bacteria as starter

- cultures for production of white pickled and fresh soft cheeses. *LWT-Food Science and Technology*, 63(1), 298-306.
- Terzić-Vidojević, A., Veljović, K., Begović, J., Filipić, B., Popović, D., Tolinački, M., Miljković, M., Kojić, M., & Golić, N. (2015b).** Diversity and antibiotic susceptibility of autochthonous dairy enterococci isolates: are they safe candidates for autochthonous starter cultures? *Frontiers in Microbiology*, 6, 954.
- Terzić-Vidojević, A., Veljović, K., Tolinački, M., Živković, M., Lukić, J., Lozo, J., ... & Golić, N. (2020).** Diversity of non-starter lactic acid bacteria in autochthonous dairy products from Western Balkan Countries-technological and probiotic properties. *Food Research International*, 136, 109494.
- Teuber, M. (1995).** The genus *Lactococcus*. *The genera of lactic acid bacteria*, 173-234.
- Thomas, T. D. (1973).** Agar medium for differentiation of *Streptococcus cremoris* from the other bacteria. *NZJ Dairy Sci. Technol*, 8, 70-71.
- Tilocca, B., Costanzo, N., Morittu, V. M., Spina, A. A., Soggiu, A., Britti, D., Roncada, P., & Piras, C. (2020).** Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production. *Journal of Proteomics*, 210, 103534.
- Tomaro-Duchesneau, C., Jones, M. L., Shah, D., Jain, P., Saha, S., & Prakash, S. (2014).** Cholesterol assimilation by *Lactobacillus* probiotic bacteria: an in vitro investigation. *BioMed research international*, 2014.
- Tomasino, E., Turbes, G., Lim, J., WaiteCusic, J., & Meunier Goddik, L. (2018).** Flavor composition of raw and pasteurized milk cheddar cheeses made from milk sourced from different producers. *J Adv Dairy Res*, 6(2).
- Tripathi, M. K., & Giri, S. K. (2014).** Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of functional foods*, 9, 225-241.
- Turgis, M., Vu, K. D., Millette, M., Dupont, C., & Lacroix, M. (2016).** Influence of environmental factors on bacteriocin production by human isolates of *Lactococcus lactis* MM19 and *Pediococcus acidilactici* MM33. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 8, 53-59.
- Upadhyay, V., McSweeney, P., Magboul, A., & Fox, P. (2004).** Proteolysis in cheese during ripening. *Cheese: chemistry, physics and microbiology*, 1(3), 391-434.

- Van Hekken, D. L. (2012).** Quality Aspects of Raw Milk Cheeses-The microflora of the raw milk contributes to a greater diversity of cultures and enzymes, which ripens the cheese faster and produces stronger flavors and aromas. *Food Technology-Chicago*, 66(6), 66.
- van Kranenburg, R., Kleerebezem, M., van Hylckama Vlieg, J., Ursing, B. M., Boekhorst, J., Smit, B. A., Ayad, E. H., Smit, G., & Siezen, R. J. (2002).** Flavour formation from amino acids by lactic acid bacteria: predictions from genome sequence analysis. *International Dairy Journal*, 12(2-3), 111-121.
- van Mastrigt, O., Egas, R. A., Abee, T., & Smid, E. J. (2019).** Aroma formation in retentostat co-cultures of *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroides*. *Food microbiology*, 82, 151-159.
- Vaughan, E. E., Heilig, H. G., Ben-Amor, K., & De Vos, W. M. (2005).** Diversity, vitality and activities of intestinal lactic acid bacteria and bifidobacteria assessed by molecular approaches. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(3), 477-490.
- Vignolo, G. M., de Kairuz, M. N., de Ruiz Holgado, A. A., & Oliver, G. (1995).** Influence of growth conditions on the production of lactocin 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 705. *Journal of Applied Microbiology*, 78(1), 5-10.
- Vollenweider, S., & Lacroix, C. (2004).** 3-Hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. *Applied microbiology and biotechnology*, 64, 16-27.
- Von Wright, A., & Axelsson, L. (2011).** Lactic acid bacteria: an introduction. In *Lactic Acid Bacteria* (pp. 19-34). CRC Press.
- Walbeek, W. v., Scott, P., & Thatcher, F. (1968).** Mycotoxins from food-borne fungi. *Canadian Journal of Microbiology*, 14(2), 131-137.
- Walstra, P., Wouters, J. T., & Geurts, T. J. (2006).** Dairy science and technology second edition. *food science and technology-new york-marcel dekker-*, 147.
- Walther, B., & Chollet, M. (2017).** Menaquinones, bacteria, and foods: vitamin K2 in the diet. *Vitamin K2-Vital for Health and Wellbeing*, 63-82.
- Walter, H.E., Hargrove, R.C. (1972).** Cheeses of the World. *Dover Publications Inc, New York*.
- Wells, J. M. (2011, December).** Immunomodulatory mechanisms of lactobacilli. In *Microbial cell factories* (Vol. 10, No. 1, pp. 1-15). BioMed Central.

- Whiley, R.A. & Hardie, J.M. (2009)** Genus I. *Streptococcus* Rosenbach 1884, 22AL. In: De Vos, P.; Garrity, G., Jones, D. *et al.* (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol. 3. New York: Springer, pp. 655–711.
- Whitehead, H. R. (1933)**. A substance inhibiting bacterial growth, produced by certain strains of lactic streptococci. *Biochemical Journal*, 27(6), 1793.
- Widyastuti, Y., & Febrisiantosa, A. (2014)**. The role of lactic acid bacteria in milk fermentation. *Food and Nutrition Sciences*, 2014.
- Willey, J. M., & Van Der Donk, W. A. (2007)**. Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Annu. Rev. Microbiol.*, 61, 477-501.
- Woese, C.R. (1987)**. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221–71.
- Wouters, J. T., Ayad, E. H., Hugenholtz, J., & Smit, G. (2002)**. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal*, 12(2-3), 91-109.
- [www.fao.org](http://www.fao.org) consulté le : 15/11/2023
- Xiraphi, N., Georgalaki, M., Rantsiou, K., Cocolin, L., Tsakalidou, E., & Drosinos, E. (2008)**. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* E131. *Meat Science*, 80(2), 194-203.
- Yildiz, F. (2016)**. Development and manufacture of yogurt and other functional dairy products.
- Yoon, Y., Lee, S., & Choi, K. H. (2016)**. Microbial benefits and risks of raw milk cheese. *Food Control*, 63, 201-215.
- Zacharof, M. P., & Lovitt, R. W. (2012)**. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article. *Apcbee Procedia*, 2, 50-56.
- Zalán, Z., Németh, E., Baráth, Á., & Halász, A. (2005)**. Influence of growth medium on hydrogen peroxide and bacteriocin production of *Lactobacillus* strains. *Food Technology and Biotechnology*, 43(3), 219-225.
- Zheng, X., Shi, X., & Wang, B. (2021)**. A review on the general cheese processing technology, flavor biochemical pathways and the influence of yeasts in cheese. *Frontiers in Microbiology*, 12, 703284.
- Zhu, C. S., Y. R. Gao, & X. U. Guo-Dong. (2014)**. Screening of lactic acid bacteria for production of anti-*Listeria* bacteriocin. *Modern Food Sci. Technol.* 30:86–91.

**Zielińska, D., & Kolożyn-Krajewska, D. (2018).** Food-origin lactic acid bacteria may exhibit probiotic properties. *BioMed research international*, 2018.

**Zitoun, O. A., Pediliggieri, C., Benatallah, L., Lortal, S., Licitra, G., Zidoune, M. N., & Carpino, S. (2012).** Bouhezza, a traditional Algerian raw milk cheese, made and ripened in goatskin bags. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 10(2), 289-295.

# ANNEXES

## ANNEXES

### Milieu MRS

Peptone	10g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	5g
Glucose	20g
Tween 80	1ml
Phosphate bipotassique	2g
Acétate de sodium	5g
Citrate d'ammonium	2g
Sulfate de magnésium, 7 H <sub>2</sub> O	0.2g
Sulfate de manganèse, 4 H <sub>2</sub> O	0.5g
Agar	15g

Eau distillée qsp 1000ml.

pH = 6,5.

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 15 min.

### Milieu M17

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

Eau distillée qsp 1000ml.

pH = 6,5.

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min..

### Bouillon hypersalé

Extrait de viande	5g
Glucose	5g
Peptone	15g
NaCl	65g

Eau distillée qsp 1000ml.

pH = 7,2.

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min..

### **Gélose aux triglycérides**

Peptone	5g
Extrait de levure	3g
Triglycérides	10ml
Agar	15g

Eau distillée qsp 1000ml.

pH = 6,5

Stérilisation à 110°C pendant 5min.

### **Milieu PCA-Lait**

Peptone caséine	5g
Extrait de levure	2g
Glucose	1g
Lait écrémé	2.5g

Eau distillée qsp 1000ml.

pH final à 25°C : 7,00 ±0,2.

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

### **Mueller-Hinton (MH)**

Hydrolysate acide de caséine (peptone)	17,5g
Extrait de viande	2,0g
Amidon	1,5g
Calcium 25 mg	20 à 25 mg
Magnésium	10 à 12,5 mg
Agar	15,0

Eau distillée qsp 1 L.

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

### **Milieu gélose esculine**

Peptone	10g
Esculine	1g
Citrate de fer ammoniacale	1g
Agar	15g

Eau distillée qsp 1 L.

pH = 7 +/- 0,2.

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

### Milieu arginine hydrolase

Peptone bactériologique	1g
NaCl	5g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.3g
Rouge de phénole	0.01g
Arginine	10g
Agar	15g

pH = 7 +/- 0,2.

Eau distillée qsp 1 L.

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

### Coloration de Gram

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

Sur une lame, fixer à la chaleur une culture bactérienne ;

Recouvrir la lame avec la solution de violet de gentiane pendant une minute ;

Ajouter du lugol pendant 30 secondes ;

Décolorer avec de l'alcool 95°, puis rincer à l'eau ;

Faire une contre coloration en utilisant la fuschine et laisser agir 20 à 30 secondes ;

Laver à l'eau ;

Après séchage, soumettre la lame à une observation microscopique à immersion (x100).

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