

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn Badis  
Mostaganem  
Faculté des Sciences de la  
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد ابن باديس  
مستغانم  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DESSCIENCES ALIMENTAIRES

## MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par :

**BELGACEM Houria**

Pour l'obtention du diplôme de

**MASTER EN SCIENCES ALIMENTAIRES**

**Spécialité: Production et transformation laitières**

THÈME

**Caractérisation phénotypique et  
biochimique des souches lactiques  
autochtones isolées de différents miels**

Devant les membres du jury

<b>Président</b>	Dr RECHIDI SIDHOUM Nadra	Maître de conférences	U. Mostaganem
<b>Examineur</b>	Dr TAHLAITI Hafida	Maître de conférences	U. Mostaganem
<b>Encadreur</b>	Dr DAHOU Abdelkader El amine	Maître de conférences	U. Mostaganem

Travail réalisé au Laboratoire des Sciences et Techniques de Production Animales

Année universitaire 2019-2020



### **Dieu nous suffit, quel excellent protecteur**

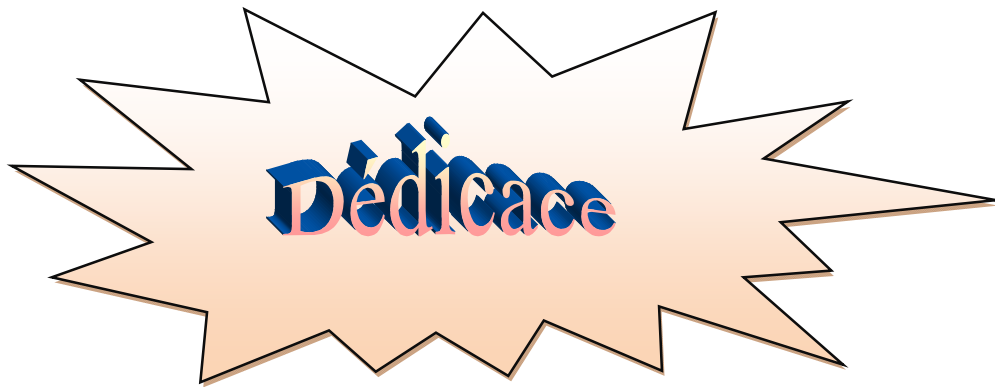
Avant toutes choses, je tiens à exprimer mon grand remerciement et ma profonde gratitude et reconnaissance à Allah notre créateur, qui m'a donné la force pour réaliser ce travail et qui était avec moi par sa miséricorde dans chaque moment et chaque instant jusqu'à l'accomplir.

Je désire à exprimer ma sincère reconnaissance et remerciement à mon encadreur, **Dr. DAHOU A. El-Amine**, pour avoir accepté de m'encadrer et consacré autant de temps pour moi, pour son suivi régulier, sa bienveillance, ses conseils et ses orientations. Sans oublier mon co-encadreur, **Melle RADJA.S**, pour sa patience avec moi et ses précieux conseils.

Je remercie les membres du jury qui ont bien voulu accepter de juger mon modeste travail et de m'avoir honorer : Le Président : **Dr RECHIDI Sidhoum Nadra** et l'examineur : **Dr TAHLITI Hafida** Je leur exprime et leur témoigne de mon grand respect.

Je tiens à remercier tous les chargés de cours du département des Sciences Alimentaires, du parcours de production et de transformation laitière, de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, de l'université de Mostaganem pour leur enseignement et la formation donnée pour notre perfectionnement dans la spécialité.

Je tiens à remercier tout le personnel de laboratoire des sciences et techniques de production animales et de la ferme expérimentale de Hassi Mamèche.



C'est avec une immense joie que je dédie ce modeste travail à:

Ceux que m'ont appris les belles choses de la vie:  
la confiance, l'amour, la vérité, la patience, et le courage vous ma très chère  
MAMAN et vous mon très chère PAPA.

Mes frère Farid et Khaled, et mes très chère amies.

Sans oublier ma promotion de (2019 – 2020) PTL et tous mes camarades et  
les personnes que j'ai oublié de citer.

Enfin, à tous ceux que j'aime et qui m'aiment.

*Houria*

### Résumé :

Comme tous les produits alimentaires, le miel représente un habitat naturel pour les bactéries lactiques. Pour cette raison, cette étude a été réalisée afin d'identifier l'écosystème microbien lactique trouvé dans le miel frais de la région de Mostaganem. Nous étions chargés de caractériser la flore lactique en forme de bacilles. Les tests de revivification et de culture des isolats lactiques ont été effectués sur milieu MRS. L'étude des caractères morphologiques, par observation microscopique, a confirmé la mise en évidence d'une seule forme celle des bacilles. Les tests d'identification (biochimiques et physiologiques) ont permis d'identifier 25 souches de bactéries lactiques qui appartiennent au genre *Lactobacillus*. Les souches identifiées phénotypiquement ont été conservées pour une identification moléculaire et la réalisation des tests d'aptitude technologiques.

**Mots clés:** Miel frais, bactéries lactiques, *Lactobacillus*.

مثل جميع المنتجات الغذائية، العسل هو موطن طبيعي للبكتيريا اللبنية. لهذا السبب، تم إجراء هذه الدراسة من أجل تحديد النظام الإيكولوجي الميكروبي الموجود في العسل الطازج من منطقة مستغانم. كنا مسؤولين عن وصف البكتيريا اللبنية في شكل عصيات. تم إجراء اختبارات التنشيط والزراعة لعزلات اللاكتيك على المتوسط MRS. أكدت دراسة الصفات المورفولوجية، عن طريق المراقبة المجهرية، الأدلة على شكل واحد من العصيات. حددت اختبارات تحديد الهوية (البيوكيميائية والفسيزولوجية) 25 سلالة من البكتيريا اللبنية التي تنتمي إلى جنس *لاكتوباسيلوس*. وقد تم الاحتفاظ السلالات التي تم تحديدها في الظاهر لاختبارات تحديد الهوية الجزيئية والقدرات التكنولوجية.

**الكلمات الرئيسية:** العسل الطازج، البكتيريا اللبنية، *Lactobacillus*.

### **Abstract:**

Like all food products, honey is a natural habitat for lactic bacteria. For this reason, this study was carried out in order to identify the microbial ecosystem found in fresh honey from the Mostaganem region. We were responsible for characterizing the lactic flora in the shape of bacillus. The revitalization and cultivation tests of lactic isolates were carried out on MRS medium. The study of morphological traits, by microscopic observation, confirmed the evidence of a single form that of bacillus. Identification tests (biochemical and physiological) identified 25 strains of lactic bacteria that belong to the genus *Lactobacillus*. The strains identified phenotypically have been retained for molecular identification and technological aptitude tests.

**Keywords:** Fresh Honey, Lactic Bacteria, *Lactobacillus*.

### Liste des abréviations

<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADP</b>	Adénosine diphosphate
<b>AGE</b>	Acide gallique équivalent
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b><i>Bd.</i></b>	<i>Bifidobacterium</i>
<b>CNH</b>	Cyanure d'hydrogène
<b>DPPH</b>	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
<b>EFSA</b>	European Food Safety Authority
<b>EMP</b>	Embden-Meyerhof-Parnas
<b><i>Ec.</i></b>	<i>Enterococcus</i>
<b>EPS</b>	Exo-polysaccharide
<b><i>E.</i></b>	<i>Escherichia</i>
<b><i>Fb.</i></b>	<i>Fructobacillus</i>
<b>GC</b>	Glucoside cyanogénique
<b>GRAS</b>	Generally Recognized As Safe
<b>HePS</b>	Hétéro-polysaccharide
<b>HoPS</b>	Homo-polysaccharide
<b><i>Lb.</i></b>	<i>Lactobacillus</i>
<b><i>L.</i></b>	<i>Lactococcus</i>
<b><i>Lc.</i></b>	<i>Leuconostoc</i>
<b>MRS</b>	Man, Rogosa, Sharpe
<b>NAD</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide
<b>NADPH</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
<b><i>Oc.</i></b>	<i>Oenococcus</i>
<b><i>Pc.</i></b>	<i>Pediococcus</i>
<b>PNNS</b>	Plan National Nutrition Santé
<b>PSC</b>	Polysaccharide capsulaire
<b>QPS</b>	QualifiedPresumption of Safety
<b>RNS</b>	ReactiveNitrogenSpecies
<b><i>Sc.</i></b>	<i>Streptococcus</i>
<b>TE</b>	Trolox équivalent
<b>UFC</b>	Unité Formant Colonie
<b>UV</b>	Ultraviolet
<b><i>W</i></b>	<i>Weissella</i>

### Liste des tableaux :

<b>Tableau 1:</b> Quelques genres des bactéries lactiques (Bekhouché., 2006).....	18
<b>Tableau 2:</b> La nouvelle classification des lactobacilles selon ATLAN (2000).....	19
<b>Tableau 3:</b> Différenciation du genre <i>Pediococcus</i> du genre <i>Tetragenococcus</i> (Holzapfel and Wood, 2014).....	26
<b>Tableau 4:</b> Caractéristiques différentielles entre <i>Oenococcus oeni</i> et <i>Oenococcus kitaharae</i> (Holzapfel and Wood, 2014).....	28
<b>Tableau 5 :</b> caractéristiques des bactéries lactiques (d'après Axelsson, 2004).....	30
<b>Tableau 6:</b> Micro-organismes répertoriés dans le miel (PIEPER B. - Honey-Based).....	39
<b>Tableau 7 :</b> Composition moyenne du miel.....	40
<b>Tableau 8 :</b> Résultats du test physiologiques et biochimiques des bactéries lactiques.....	52

### Liste des figures:

<b>Figure 1:</b> Les bactéries lactiques en forme de bâtonnets , de coques ou de coques en chaînette.....	17
<b>Figure 2:</b> Aperçu schématique de la phylogénie des bactéries lactiques. (Sauer et al., 2017)..	19
<b>Figure 3:</b> <i>Lactobacillus casei</i> observé au microscope électronique (Corrieu & Luquet, 2008).....	20
<b>Figure 4:</b> <i>Bifidobacterium sp</i> observé au microscope électronique (Wallace et al.,2003).....	22
<b>Figure 5:</b> <i>Leuconostoc lactis</i> observé au microscope électronique ( Wallace et al.,2003).....	22
<b>Figure 6:</b> <i>lactococcuslactis subs plactis</i> observé au microscope électronique (Pot,2008).....	23
<b>Figure 7:</b> <i>Enterococcusfaecalis</i> observé au microscope électronique(Wallace et al, 2003).....	24
<b>Figure 8 :</b> <i>Streptococcus thermophilus</i> , observé au microscope électronique ( Corrieu et Luquet, 2008).....	25
<b>Figure 9:</b> <i>Pediococcus</i> observé au microscope électronique (Wallace et al., 2003).....	25
<b>Figure 10:</b> <i>Aerococcusurinae</i> sur microscope (Mattila et Häggström, 2015) .....	26
<b>Figure 11:</b> Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres associés, obtenu par analyse des ARNr 16 S (Stiles et Holzapfel, 1997).....	31
<b>Figure 12:</b> Application des bactéries lactiques dans (a) les industries agroalimentaires et (b) la biotechnologie.(pot,2008).....	33
<b>Figure 13:</b> Représentation schématique des possibles effets bénéfiques des EPS au niveau de l'organisme humain (Ruas-Madiedo <i>et al.</i> , 2002).....	34
<b>Figure 14 :</b> Stéréoisomères L(+) et D(-) de l'acide lactique (Felis et al ., 2015 ) .....	36
<b>Figure 15 :</b> Revivifications des isolats des bactéries lactiques étudiés sur milieu MRS. ....	47
<b>Figure 16 :</b> Observations macroscopique des colonies après incubation à 37°C pendant 48 heures.....	48

## *Liste des Figures*

---

<b>Figure 17:</b> Aspect microscopique des cellules après la coloration de gram Gr(100), bacille courte et longue .....	48
<b>Figure 18:</b> Test des croissances à 30°C sur bouillon MRS à PH 6,5 et 5,5 après 24 heures d'incubation .....	49
<b>Figure 19:</b> Test de croissance à pH 9.6 sur bouillon MRS après une incubation à 30°C pendant 48 heures .....	50
<b>Figure 20:</b> Test de croissance en présence de 6.5% de NaCl sur milieu MRS à 30°C pendant 48heures.....	50
<b>Figure 21:</b> Résultat du test du type fermentaire sur bouillon MRS sans citrate après incubation à 30°C pendant 48 heures.....	51
<b>Figure 22:</b> conservation des souches lactiques à courte durée.....	53

# TABLE DES MATIERES

Remerciements

Dédicaces

Résumé.....	4
ملخص .....	5
Abstrac t .....	6
Liste des abréviations.....	7
Liste des tableaux.....	8
Liste des figures.....	9
Introduction.....	15

## PARTIE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

### Chapitre I : GENERALITES SUR LES BACTERIES LACTIQUES

1-Définition.....	17
2- Caractéristiques généraux des bactéries lactiques .....	17
3. Classifications des bactéries lactiques.....	18
3-1-Le Genre Lactobacillus.....	19
3-1-1- Les Lactobacilles homofermentaires stricts .....	20
3-1-2- Les Lactobacilles hétérofermentaires stricts .....	20
3-1-3- Les Lactobacilles hétérofermentaires facultatifs.....	20
3-2- Genre Bifidobacterium.....	21
3-3- Genre Leuconostoc.....	22
3-4- Genre Lactococcus.....	23
3-5- Genre Entéroccoccus.....	23
3-6- Genre Streptococcus.....	24
3-7- Les Genres Pédiococcus et Tetragenococcus .....	25

3-8- Aerococcaceae .....	26
3-9- Le Genre Oenococcus Et Weissella .....	27
4-Méthodes d'identification.....	28
4-1- Méthodes classiques.....	29
4-2-Méthode moléculaire .....	31
5- Intérêts des bactéries lactiques .....	32
6- Bactéries lactiques et alimentation.....	32
6-1-Les EPS dans l'industrie alimentaire.....	33
6-1-1- Bénéfices nutritionnels des EPS.....	34
6-2-Les bactériocines.....	34
6-2-1- Définition.....	34
6-2-2- Classement des bactériocines.....	33
6-2-2-1- Classe I.....	35
6-2-2-2- Classe II.....	35
6-2-2-3-Classe III.....	36
6-3-L'acide lactique .....	36
7-Les Bactéries lactiques et leur influence directe sur la santé humaine.....	36

## **Chapitre II : les bactéries lactiques et miel**

1-Micro-organismes dans le miel.....	38
2- Origine des bactéries lactiques dans le miel.....	38
3- Les bactéries Lactiques du miel... ..	39
4- Propriétés biologiques du miel.....	40
4-1- Propriétés antibactériennes.....	40
4-1-1- Propriétés anti bactériennes par effet osmotique.....	41
4-1-2- Propriétés anti bactériennes liées au pH acide.....	41
4-1-3- Propriétés anti bactériennes liées à la formation de peroxyde d'hydrogène .....	41
4-1-4- Propriétés anti bactériennes liées aux substances non peroxydiques .....	41

4-2-Activité anti-inflammatoire et Immunomodulatrice.....	42
4-3-Effet probiotique .....	42
5-Origine et rôle des bactéries lactiques dans le miel.....	43

## **PARTIE II : RECHERCHE EXPERIMENTALE**

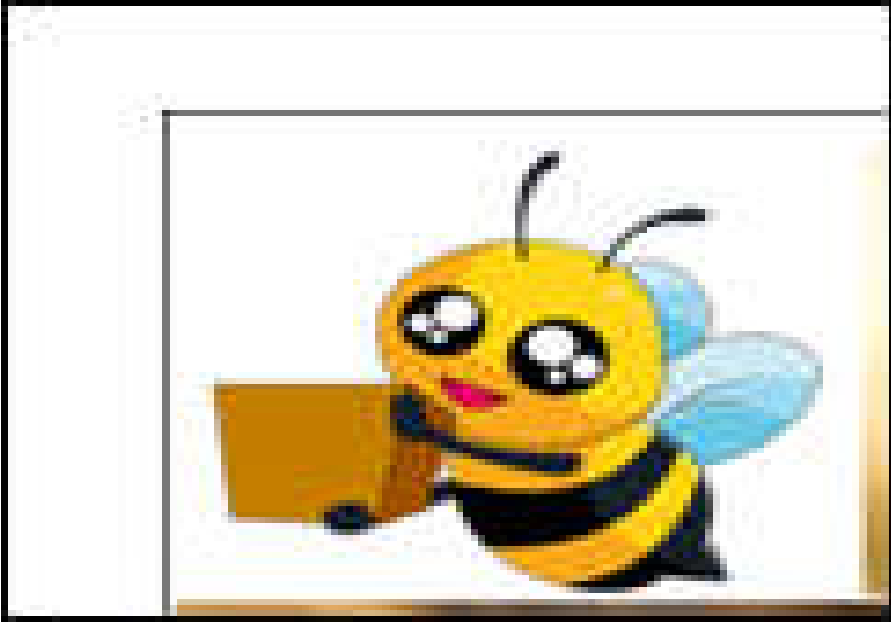
### **Chapitre I : Matériel et méthodes**

1-Lieu de travail.....	44
2- Echantillonnage et isolement de bactéries lactiques .....	44
2.1-Collecte des échantillons.....	44
2.2-Milieus de culture.....	44
2.3-Préparation des échantillons.....	44
2.4- Isolement et purification des bactéries lactiques.....	44
2.5- Conservation des bactéries lactiques.....	45
2.5.1-Conservation de courte durée.....	45
2.5.2- Conservation de longue durée.....	45
2.6-Pré-identification des bactéries lactiques par étude morphologique, physiologique et biochimique.....	45
2.6.1-Etude morphologique.....	45
2.6.2-Etude biochimique.....	46
2.6.2.1-Type fermentaire.....	46
2.6.3-Etude physiologique.....	46
2.6.3.1-Croissance à différents températures.....	46
2.6.3.2-Croissance en présence de 6.5% NaCl.....	46
2.6.3.3-Croissance à différents PH .....	46

### **Chapitre II : Résultats et Discisions**

1-Isolement et purification des cultures bactériennes.....	47
2-Pré-identification par étude morphologique, physiologique et biochimique.....	47

2.1- Observation macroscopique.....	47
2.2-Observation microscopique.....	48
2.3-Etudes physiologiques et biochimiques.....	49
2.3.1-Test de Catalase.....	49
2.3.2-Croissance dans les conduction hostiles.....	49
2.3.2.1-Croissances à différents température 10°C.....	49
2.3.2.2-Croissances à différents PH.....	49
2.3.2.3-Croissances sur milieu hyper salé à 6.5 de NaCl.....	50
2.3.3-Type fermentaire.....	51
3-La conservation des souches lactiques.....	53
<b>Discussion.....</b>	<b>53</b>
<b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>55</b>
<b>Annexes 1.....</b>	<b>56</b>
<b>Annexes 2.....</b>	<b>58</b>
<b>Les Références Bibliographiques.....</b>	<b>59</b>



## **INTRODUCTION**

### Introduction :

Les bactéries lactiques présentent un grand intérêt dans l'industrie. Elles sont largement utilisées dans l'élaboration des produits alimentaires par des procédés de fermentations lactiques. Les bactéries lactiques assurent non seulement des caractéristiques particulières d'arômes et de texture mais aussi une bonne sécurité alimentaire. Cette sécurité est favorisée grâce à la production d'acides organiques (acides lactiques et acétiques) qui font baisser le pH dans le milieu (Carine et al., 2009).

Les aliments fermentés avec des bactéries lactiques présentent une part importante de l'alimentation humaine. Ces bactéries jouent un rôle essentiel dans la conservation des aliments ce qui a entériné un intérêt scientifique de leur étude au cours des quelques dernières décennies alors que le concept de bactéries lactiques a été mis au point au début des années 1900. (Fennema et al., 2004).

Les caractéristiques et les propriétés sensorielles du produit peuvent être obtenues par « hasard » mais très souvent par les savoir-faire du préparateur. Au contraire, l'utilisation de ferments conduit à une fermentation contrôlée. La matière première est inoculée avec un ou plusieurs microorganismes dans le but d'accélérer le processus de fermentation et d'apporter des caractéristiques et des propriétés volontairement désirées (Holzapfel W. 1997 ; Leroy F, 2004). Ce type de fermentation est plus sûr, la fermentation est suivie aisément, et les propriétés du produit obtenu sont intéressantes tant pour l'industriel que pour le consommateur. En contrepartie, la sélection préalable de ferments doit être menée. Les bactéries lactiques possèdent plusieurs actions bénéfiques que ce soit au niveau du produit obtenu ou au niveau des bénéfices pour le consommateur en améliorant les propriétés sensorielles et les propriétés nutritionnelles. Pendant la fermentation lactique, les bactéries lactiques synthétisent plusieurs molécules, telles que les acides organiques, les exopolysaccharides, les bactériocines. Par leur action enzymatique, elles libèrent également des composés phénoliques et améliorent ainsi leur biodisponibilité. Certaines bactéries lactiques sont reconnues en tant que probiotiques, c'est-à-dire qu'elles possèdent plusieurs effets bénéfiques pour la santé de l'hôte. C'est pourquoi, ces dernières années, la recherche de starters de bactérie lactique s'est intensifiée, notamment pour la fermentation de fruits et de légumes, déjà riches en antioxydants. Ces dernières années ont vu également l'émergence de divers produits à base de fruits et de légumes fermentés : jus de tomate, carotte, haricots verts, poivrons, ananas, purée de cerise (Mont et D et al., 2014).

Le miel renferme un écosystème microbien apporté par l'abeille. Les abeilles, pour produire du miel, ingèrent du nectar et le stockent dans le jabot puis le transforment à l'aide d'enzymes. Au-delà des enzymes, des micro-organismes symbiotiques associés au tractus gastro-intestinal Bénéfiques pour la santé humaine sont également incorporés dans le miel au cours de sa fabrication (Endo et Salminen 2013).

En raison des différentes propriétés physicochimiques les micro-organismes ne peuvent pas croître dans le miel. Cependant, ce produit alimentaire n'est pas stérile. Les bactéries lactiques font parties des microorganismes bénéfiques et intéressants qui y sont détectées. De récentes recherches, ont démontré les propriétés antimicrobiennes de certains genres de bactéries lactiques principalement, des lactobacillus et bifidobacterium qui ont été isolées de miels de différentes origines, (Lashani et al., 2018 ; Hasali et al., 2015 ; Piccart et al., 2016 ; Olofsson et al., 2016). Cependant, les recherches concernant les bactéries lactiques dans les miels algériens restent rares voire inexistantes. En raison de leurs capacités à produire des bactériocines ces bactéries présentent un intérêt substantiel en tant que médicaments naturels et nouveaux antimicrobiens (Prestinaci et al., 2015).

L'objectif de notre travail, est de réaliser une identification des bactéries lactiques isolées à partir de différents miels de la région de Mostaganem, et une caractérisation phénotypique et biochimique des souches lactiques autochtones en forme de bâtonnet

**PARTIE I :**

**SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

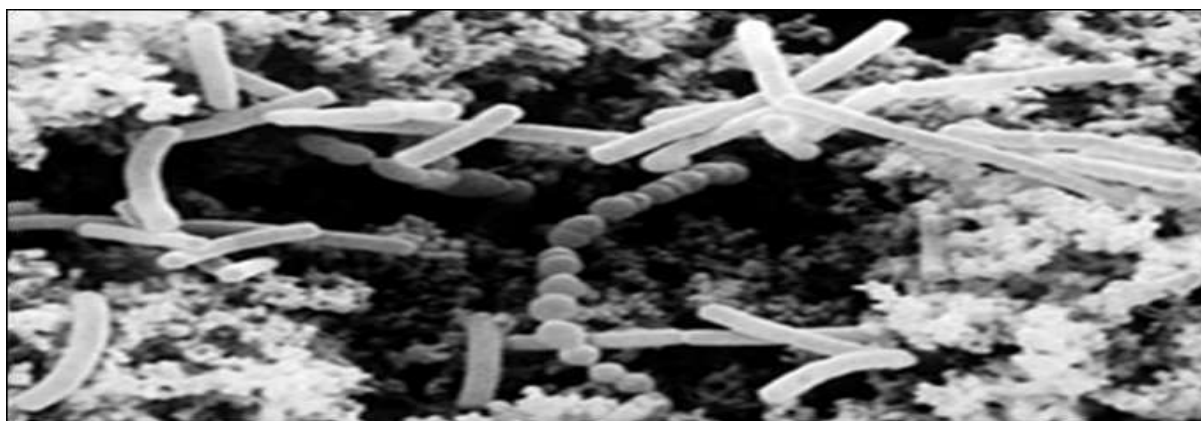
# **Chapitre I :**

---

## **GENERALITES SUR LES BACTERIES LACTIQUES**

### 1- Définition :

Les bactéries lactiques ont été décrites pour la première fois par Orla-Jensen (1919) au début XXème siècle : ce sont des microorganismes à la forme des coques ou bâtonnets Gram positif, généralement immobiles et non sporulés (Axelsson, 2004). Catalase négative Oxydase négative généralement nitrate réductase négative, ce sont des bactéries anaérobies facultatives. Elles ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentés cibles (Novel, 1993).



**Figure1:** Les bactéries lactiques en forme de bâtonnets et en coques ou en chainettes.

([http://www.inra.fr/presse/une collection de bactéries d'inter et laitier](http://www.inra.fr/presse/une_collection_de_bacteries_d_inter_et_laitier)).

### 2- Caractéristiques généraux des bactéries lactiques :

Les principales caractéristiques des bactéries lactiques sont résumées sur le tableau 1.

Les bactéries lactiques sont un groupe de bacilles ou coccobacilles à Gram positif qui ont moins de 55 mol % de contenu G+C dans leur ADN (à l'exception des bifidobactéries) (Ammour., 2004), Ce sont des microorganismes hétérotrophes et chimio-organotrophes, non sporulés, habituellement aéro-anaérobies et catalase négatives. Acido-tolérantes et capables de croître à des températures comprises entre 10°C et 45°C et à des PH allant de 4.0 à 5.5 ces bactéries sont généralement immobiles. Elles peuvent avoir différents formes : sphériques (coques/genre streptococcus, lactococcus, ...), en bâtonnets (bacilles/genres lactobacillus) ou encore ovoïdes (leuconostocs sp.) (corrieu et luquet, 2005 ; Galvez et al., 2011). Les nombreux genres et espèces qui constituent ce groupe présentent une grande diversité de caractéristiques physiologiques. Cela se traduit par l'existence entre genres, espèces et au sein des espèces, de nombreuses souches possédant des propriétés technologiques différentes (Salminen et al., 2004 ; Fröhlich et König , 2009 ; Pringsulaka et al., 2011).

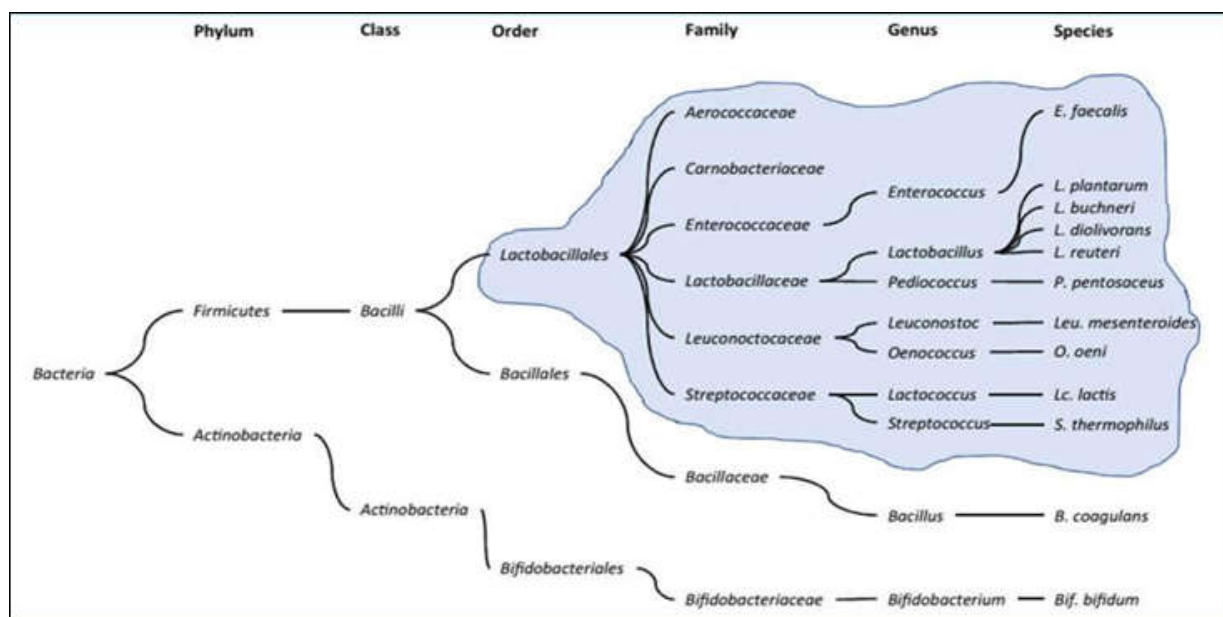
Les bactéries lactiques synthétisent leur ATP grâce à la fermentation lactique des glucides. On les distingue en deux groupes biochimiques : les homofermentaires et les hétérofermentaire. Les homofermentaires produisent deux molécules d'acides lactiques par glucose consommé. Chez les hétérofermentaire ; seule une molécule d'acide lactique est produite à partir du glucose. Une autre molécule en C2 est produite et une molécule d'oxygène. La différence entre ces deux groupe est détectable par le dégagement de CO2 (Bourgeois et al., 1996).

**Tableau 01:** Quelques genres des bactéries lactiques (Bekhouché., 2006).

Genres	cellules	Cellules	fermentation	ADN G+C(%)	Références
	Forme	Arrangements			
<b>Streptococcus</b>	Coques	Chaines	Homolactiques	34-46	SCHLEIFER, 1986
<b>Leuconostoc</b>	Coques	Chaines	hétérolactiques	36-43	FARROW et al, 1989
<b>Pediococcus</b>	Coques	Tétrades	Homolactiques	34-42	SCHLEIFER, 1986
<b>Lactobacillus</b>	Bacilles	Chaines	Homolactiques et hétérolactiques	32-53	KANDLER et WEISS 1986

### 3. Classifications des bactéries lactiques:

La classification des bactéries lactiques est largement basée sur les caractéristiques phénotypiques et biochimiques de celles-ci. La description morphologique des bactéries est une étape clé pour le pré identification (Woese, 1987). Les bactéries lactiques sont trouvées dans deux phylums distincts, à savoir firmicutes et Actinobacteria (figure 2). Au sein des Firmicutes, les genres les plus importants sont : Lactobacillus, Bifidobacterium Leuconostoc, Lactococcus, Enterococcus, Streptococcus ,Pediococcus, Carnobacterium, Oenococcus Weissella, Aerococcus, Tetrigenococcus Vaqococcus (Carine et al., 2009).



**Figure 2:** Aperçu schématique de la phylogénie des bactéries lactiques en avril 2017.

(Sauer et al., 2017).

### 3-1-Le Genre *Lactobacillus* :

Ce genre regroupe plus de 70 espèces (dont plusieurs sont divisées en sous-espèces) voir ce tableau 2.

**Tableau 2:** la nouvelle classification des lactobacilles selon Atlan (2000).

Groupe1 : <i>Delbrueckii</i>	Groupe2 : <i>casei-Pediococcus</i>	Groupe3 : <i>Leuconostoc</i>
<i>Lb. delbrueckii</i> <i>Lb. Acidophilus</i> <i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. crispatus</i> Autres Homofermentaires Hétérofermentaires Facultatifs <i>Lb. Acetotolerans</i> <i>Lb. Hamster</i>	Homofermentaires stricts <i>Lb. Avarius</i> <i>Lb. salivarius</i> Hétérofermentaires facultatifs <i>Lb. casei</i> <i>Lb .plantarum</i> <i>Lb. sake</i> <i>Lb. curvatus</i> Hétérofermentaires stricts. <i>Lb. brevis</i> <i>Lb. fermentum</i> <i>Lb. buchneri</i> <i>Lb. reuteri</i> <i>Lb. sanfrancisco</i> <i>Lb. parakefir</i> Genres <i>Pediococcus</i> <i>Pc. damnosus</i> <i>Pc. parvulus</i> <i>Pc. acidilactici</i> <i>Pc. Pantosaceus</i>	Hétérofermentaires stricts Genre <i>Leuconostoc</i> <i>Ln. amelibiosum</i> <i>Ln. carnosum</i> <i>Ln. gelidum</i> Genre <i>Weissella</i> <i>Ln. paramesen</i> <i>Lb. confusus</i> <i>Lb halotolerans</i> <i>Lb. Viridescens</i>

Le genre *Lactobacillus* est quantitativement le plus important des genres du groupe des bactéries lactiques. Ce genre est subdivisé en trois sous genres: *Thermobacterium*, *Bêtabacterium*, *Streptobacterium*.

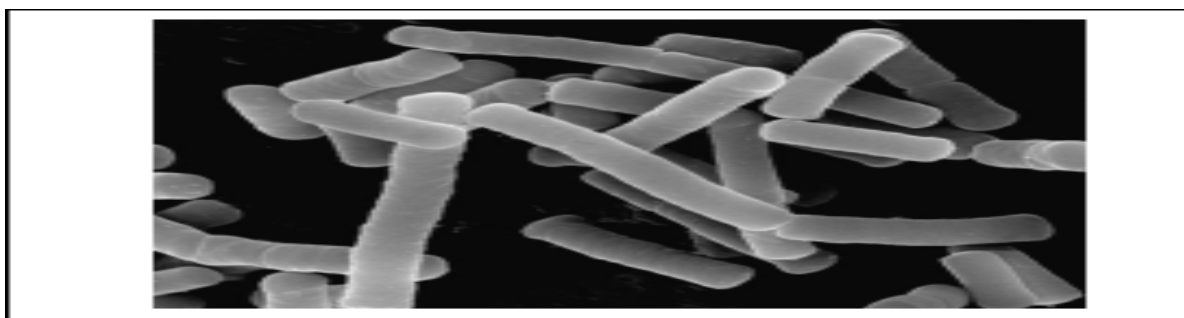
### 3-1-1- Les Lactobacilles homofermentaires stricts:

Regroupent les espèces de l'ancien sous genre *Thermobacterium*, qui dégradent les hexoses en acide lactique.

**3-1-2- Les Lactobacilles hétérofermentaires stricts :** Regroupent les espèces de l'ancien sous genre *Beta bacterium*, fermentent les hexoses en acide lactique, en acide acétique ou en éthanol et CO<sub>2</sub> (voie hétérofermentaire de la 6-phosphogluconate déshydrogénase/phosphocétolase). Ils dégradent les pentoses en acide acétique et en acidelactique (voie hétérofermentative de la glycéraldéhyde-3- phosphate/pyruvate kinase/lactate déshydrogénase). Ces bactéries produisent du CO<sub>2</sub> lors de la fermentation du glucose et du gluconate.

### 3-1-3- Les Lactobacilles hétérofermentaires facultatifs:

Ce groupe renferme les espèces de l'ancien sous genre *Streptobacterium*, métabolisent les hexoses en acide lactique par la voie homofermentaire d'Embden-Meyerhof-Parnas et dégradent les pentoses par voie hétérofermentaire. Ils ne produisent pas de CO<sub>2</sub> lors de la fermentation du glucose mais ils en produisent lors de la Fermentation du gluconate (Kandler et Weiss, 1986 ; Stiles et Holzapfel, 1997). L'établissement d'un arbre phylogénique construit à partir des séquences d'ARN 16S a démontré que les genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* sont très liés (malgré leurs caractères morphologiques et physiologiques très différentes) (Schleifer et Ludwig, 1995).



**Figure 3:** *Lactobacillus casei* observé au microscope électronique. (Corrieu & Luquet, 2008).

### 3-2- Genre Bifidobacterium:

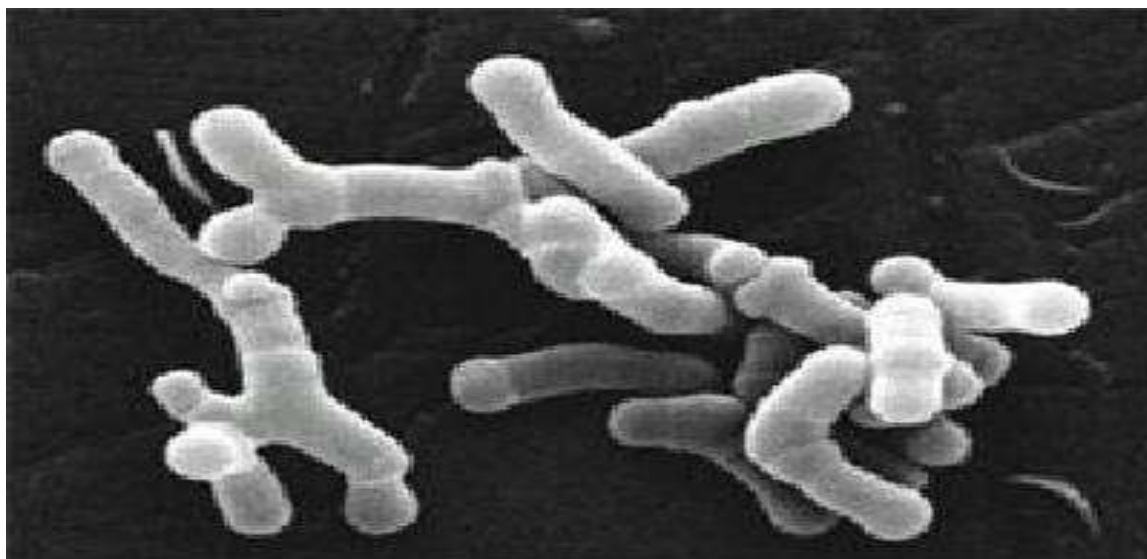
Le Genre Bifidobacterium est considéré comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques grâce à la similarité de ses propriétés physiologiques et biochimiques et à sa présence dans le même habitat écologique, tel que le tube gastro-intestinal.

Ces microorganismes sont phylogénétiquement sans rapport avec ces dernières. Ils sont davantage liés au phylum Actinobacteria (anciennement Actinomycètes) des bactéries Gram positif dont l'ADN est à haut pourcentage de G+C. Les Bifidobactéries se caractérisent par leur forme très irrégulière souvent en forme V mais pouvant être coccoïdes, la présence d'une enzyme, la fructose-6-phosphate phosphocétolase, celle-ci leur permet de fermenter les hexoses en produisant de l'acide acétique et de l'acide lactique. Leur température de croissance varie de 36°C à 43°C (Axelsson et al., 2004 ; Pilet et al., 2005 ; Ho et al., 2007).

Genre Bifidobacterium Longum (Figure 3):

#### Classification (selon Router, 1993):

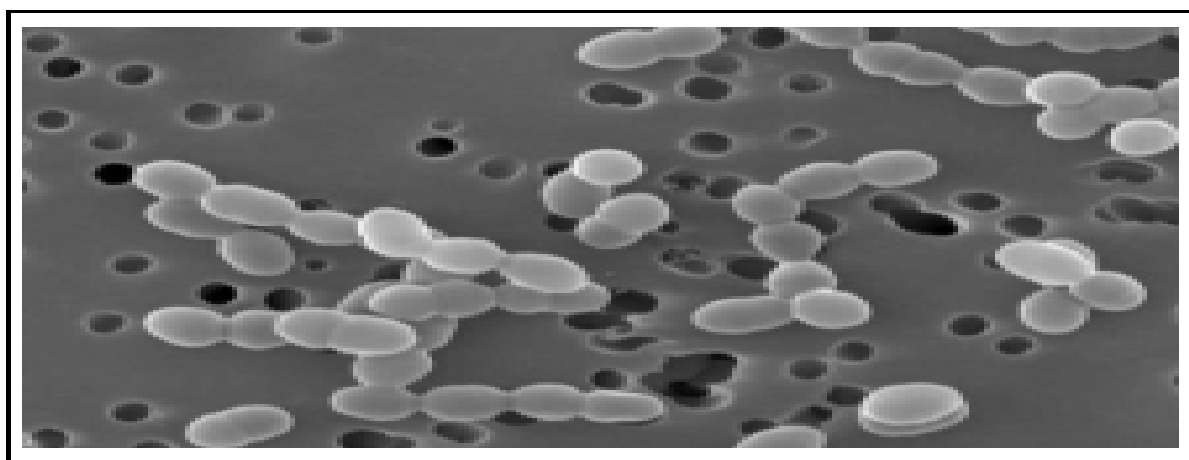
Régne	Bacteria
Embranchement	Actinobacteria
Classe	Actinobacteria
Ordre	Bifidobacteriales
Famille	Bifidobacteriaceae
Genre	Bifidobacterium
Espèce	Bifidobacterium Longum



**Figure 4:** *Bifidobacterium* sp observé au microscope électronique (Wallace et al.,2003).

### 3-3- Genre *Leuconostoc*:

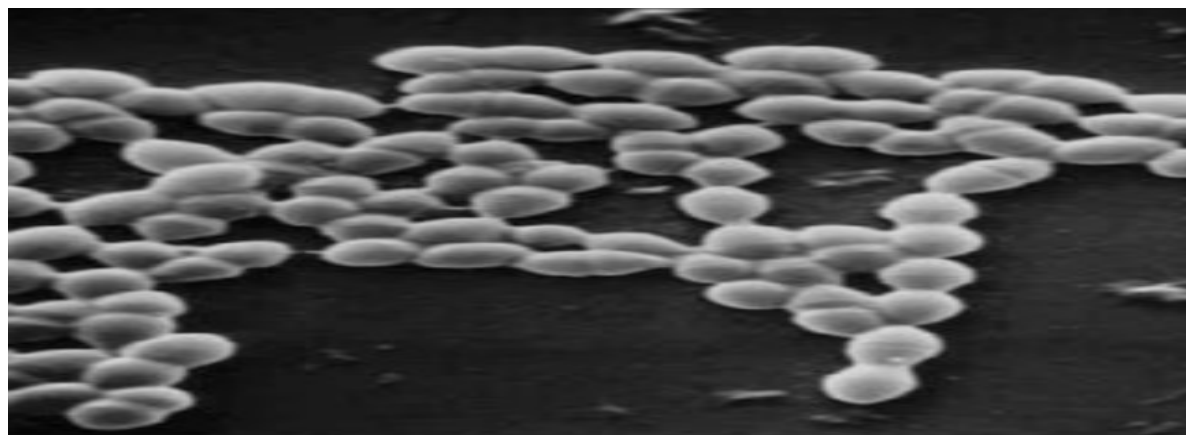
La production de diacétyl et d'acétoïne est sans doute le caractère le plus utilisé des *Leuconostocs*. Les cultures pures de *Leuconostocs* et de *St. Lactis* sub sp. diacetylactisse comportent d'une façon entièrement différente à l'égard de la production de diacétyl et d'acétoïne (Cogan, 1975). Dans du lait ou dans du bouillon contenant du citrate, *St. Lactis* sub sp. *Diacetylactis* produit du diacétyl, de l'acétoïne et consomme le citrate dès que la croissance commence. Les cultures pures de *Leuconostocs* utilisent le citrate très rapidement, par contre elles ne produisent du diacétyl et de l'acétoïne que tardivement, lorsque le milieu est devenu suffisamment acide (Devoyod et al., 1988).



**Figure 5:** *Leuconostoc lactis* observé au microscope électronique. (Wallace et al., 2003).

### 3-4- Genre *Lactococcus*:

*Lactococcus lactis* est la seule espèce de lactocoques utilisée à l'échelle industrielle (Holler et Steele, 1995). C'est une bactérie lactique mésophile dont la température optimale de croissance est comprise entre 30 et 35°C, mais elle est capable de se développer assez bien entre 20 et 30°C, voire en dessous. *Lc. Lactis* n'acidifie pas très rapidement mais peut abaisser le pH du lait jusqu'à 4,2 (Cogan, 1980). (Figure 6).



**Figure 06:** *Lactococcus lactis* subs *plactis* au microscope électronique. (Pot, 2008).

### 3-5- Genre *Entérocooccus*:

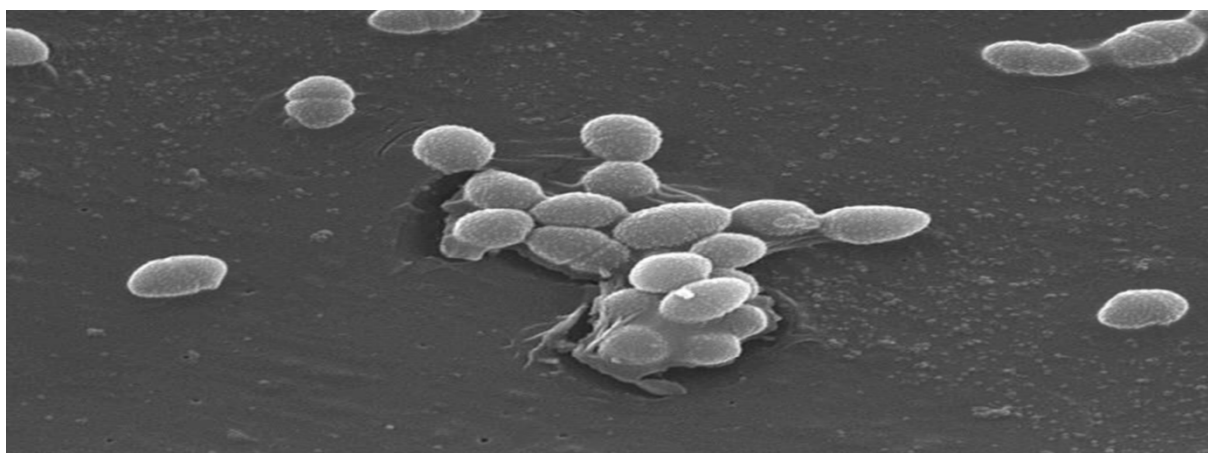
**Famille :** Enterococcaceae      **Genre :** Enterococcus

Le genre *Enterococcus* comprend des bactéries de forme cocci ou ovoïdes (isolées, en diplocoques ou en courtes chaînes). La plupart des espèces sont non motiles (exception faite pour *Ent. Gallinarum* et *Ent. casseliflavus*). Certaines souches peuvent révéler un test de catalase positif lorsqu'elles sont cultivées sur des milieux gélosés contenant du sang en raison d'une activité pseudo catalase. Chimio-organotrophes avec un métabolisme homofermentaire, les Entérocoques nécessitent des milieux de culture complexes pour leur croissance. La température optimale de croissance est de 37°C mais de nombreuses espèces peuvent croître à des températures allant de 10°C à 45°C (Al Atya, 2016).

Les résultats positifs des tests pour la croissance à 10°C et 45°C, dans du NaCl à 6,5%, un pH de 9.6, et la possession de l'antigène du groupe D, ont été traditionnellement considérés comme des caractères typiques de ce genre et qui ont été largement utilisés pour le traçage ou la caractérisation des entérocoques. D'autres tests jugés utiles pour différencier le genre

Enterococcus sont l'hydrolyse de l'esculine et la résistance à 40% de bile, ou une combinaison de ces tests dans un test bile-esculine (El Seraih, 2016).

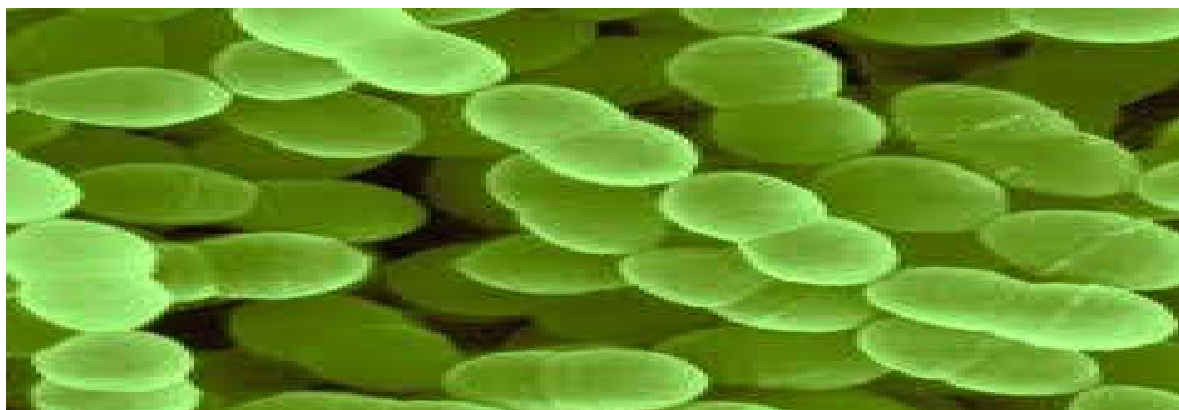
Etant capables de survivre jusqu'à 04 mois dans de vieilles cultures, les entérocoques sont présents dans un large éventail de milieux écologiques différents, notamment les sols, les eaux de surface, les eaux usées, les stations d'épuration municipales, les plantes, le tractus gastro-intestinal des animaux à sang chaud (y compris les humains) mais également dans les aliments pour humains (Holzapfel and Wood, 2014). Les espèces d'Enterococcus typiquement associées au genre sont Enterococcus faecalis et Ent. faecium.



**Figure 07:** Enterococcus faecalis observé au microscope électronique. (wallace et al., 2003).

### 3-6- Le Genre Streptococcus:

Streptococcus thermophilus est le seul streptocoque utilisé comme ferment. Il acidifie rapidement le lait, mais n'abaisse pas le pH au-dessous de 4,8 (Acolas et al., 1980; Pernoud et al., 2004). Cette espèce est incapable d'utiliser le galactose, et elle produit uniquement du Lactate. Bien que thermophile, sa température optimale de croissance étant comprise entre 40 et 44°C. Elle est capable de se développer entre 20 et 30°C mais beaucoup plus lentement, et elle résiste à des températures comprises entre 50 et 55°C (Tsakalidou et al., 1998).

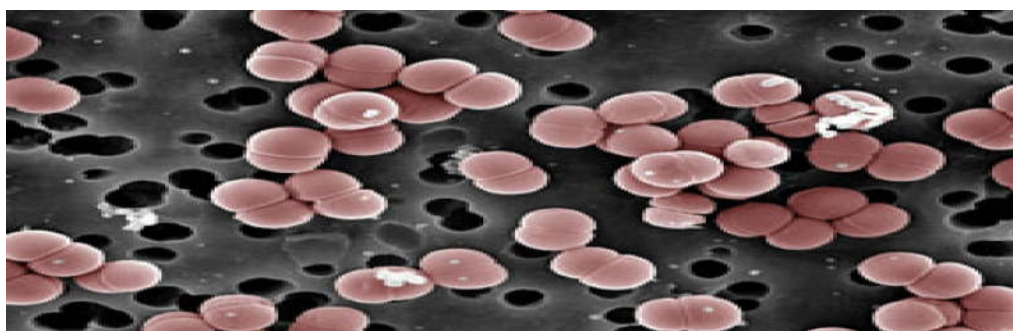


**Figure 08:** Streptococcus thermophilus, observé au microscope électronique.( Corrieu et Luquet,2008).

### 3-7- Les Genres Pediococcus et Tetragenococcus :

Les pediococcus sont des coques homofermentaires dont la particularité est le regroupement en tétrade. Ils sont mésophiles, le plus souvent incapables d'utiliser le lactose, et leur développement nécessite la présence de divers facteurs de croissance. Certaines espèces se distinguent par leur capacité à se développer à des teneurs en sels très élevées, comme *Pediococcus Halophilus*, Renommé *Tetragenococcus Halophilus* et *Tetragenococcus muriaticus* qui tolère jusqu'à 18% de NaCl (Pilet et al., 2005).

Les espèces de *Tetragenococcus* ont un rôle crucial dans la fabrication des produits alimentaires à concentration élevée en sel comme les sauces de soja, alors que les pediococcus sont parfois utilisés comme levains lactiques pour les charcuteries (Guiraud et Rosec, 2004 ; Tosukhowong et al. , 2005).



**Figure 09:** pediococcus observé au microscope électronique. (Wallace et al., 2003).

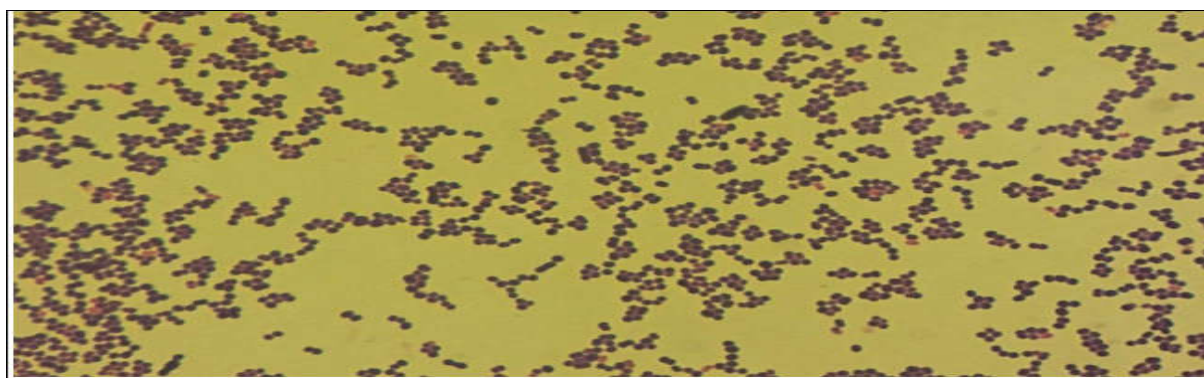
Le genre *Pediococcus* n'est que marginalement apparenté au genre *Tetragenococcus*. Phénotypiquement, ils sont principalement séparés sur la base de la nature halotolérante des tétragénocoques et de la nature acidophile à acido-tolérante des *pediocoques*. Le tableau 01, présente quelques critères de différenciation du genre *Pediococcus* et du genre *Tetragenococcus* (Holzapfel and Wood, 2014).

**Tableau 03:** Différenciation du genre *Pediococcus* du genre *Tetragenococcus* (Holzapfel and Wood, 2014).

Caractéristiques	<i>Pediococcus</i>	<i>Tetragenococcus</i>
Croissance à : pH 5	+	-
pH 9	-	+
Tolérance de croissance à 18% NaCl	-	+
Aérobie facultative	+	+
Configuration du lactate	DL/L	L
Catalase	-	-
Type de peptidoglycane	Lys-D-Asp	Lys-D-Asp

### 3-8- Aerococcaceae:

La famille *Aerococcaceae* est membre de l'ordre *Lactobacillales*, phylum *Firmicutes*. Il comprend les genres *Aerococcus*, *Abiotrophia*, *Dolosicoccus*, *Eremococcus*, *Facklamia*, *Globicatella* et *Ignavigranum*, et a été créé sur la base de la position phylogénétique de ses membres telle qu'analysée par une analyse comparative des séquences du gène de l'ARNr 16S. Les membres sont des cocci ovoïdes anaérobies facultatifs, non sporulants catalase Négative ou des coccobacilles homo-fermentaire. Le genre comprend un large éventail d'environnements, par exemple des spécimens humains, des ménages, des salles de classe, des cours, des environnements de rue et d'hôpital, et des sites marins, et ils ont également été signalés dans des infections humaines (Stackebrandt, 2014).



**Figure 10:** *Aerococcus* sur microscope. (Mattila et Häggström, 2015).

### 3-9- Le Genre *Oenococcus* et *Weissella*:

Le genre *Oenococcus* est composé de deux espèces, *Oenococcus oeni* et *Oenococcus kitaharae*. *Oenococcus oeni*, l'espèce type du genre, appartenait autrefois au genre *Leuconostoc* sous le nom de *Leuconostoc oenos*, mais a ensuite été re-classifiée par Dicks et al, (1995) (Fahimi, 2012). L'espèce est bien connue pour être un habitant du vin et joue un rôle clé dans la fermentation malolactique (FML). Son isolement dans des habitats autres que le vin n'a pas été signalé (Maitre, 2012). La seconde espèce, *Oenococcus kitaharae*, n'a été décrite que récemment. Elle a été isolée du compost de résidus de Shochu au Japon et décrite par Endo et Okada, (2006). L'espèce a également été isolée des eaux usées d'une usine d'amidon au même pays. Son habitat préféré est incertain, mais le compost, les boues et les eaux usées sont des niches possibles (Holzapfel and Wood, 2014).

Les *Oenococcus* sont, ellipsoïdales à cocci, mesurant  $0,2-0,4 \times 0,5-0,8 \mu\text{m}$ , généralement disposés en paires ou en chaînettes. Leur morphologie peut être influencée par les conditions de croissance et l'âge de la culture.

Acidophiles et à croissance lente, les *Oenococcus* spp. Produisent très peu de biomasse et nécessitent des milieux de culture complexes et riches en acides aminés et en vitamines (Dimopoulou, 2013).

Mésophiles (20°C à 30°C) et anaérobies facultatives, leurs pH de croissance optimal se situent entre 4,2 et 4,7. Une faible croissance est enregistrée à pH 3,7. Cependant, certaines souches poussent mieux à pH 3,6 qu'à pH 4,7. La gamme de pH à laquelle *O. kitaharae* développe est très différente. Une bonne croissance est enregistrée entre pH 5,0 et 6,5, avec une croissance très faible à pH 4,0 et aucune croissance à pH 7,0. *O. kitaharae* n'est donc pas aussi acidophile que l'espèce *O. oeni* (Holzapfel and Wood, 2014). Pour ce qui est du métabolisme glucidique, *Oenococcus* spp. Sont obligatoirement hétérofermentaires.

La séparation des deux espèces par le caractère fermentatif du maltose et l'incapacité d'*O. kitaharae* à fermenter les pentoses sont confirmés par la génomique comparative des deux espèces (Holzapfel and Wood, 2014). Le tableau 03, présente quelques caractéristiques différentielles entre les deux souches *Oenococcus oeni* et *Oenococcus kitaharae*.

**Tableau 04:** Caractéristiques différentielles entre *Oenococcus oeni* et *Oenococcus kitaharae*. (Holzapfel and Wood, 2014).

Caractéristiques	<i>O. oeni</i>	<i>O. kitaharae</i>
Croissance dans un bouillon contenant 10% d'éthanol	+	-
Fermentation malolactique	+	-
pH optimal de croissance	5.0 – 6.5	4.8
acides à partir du maltose	-	+

Les bactéries *Weissella* sont des tiges courtes, avec des extrémités effilées, arrondies ou sous forme ovoïdes. Elles se présentent par paires ou en chaînes courtes et certaines espèces ont tendance au pléomorphisme (capacité à se présenter sous différentes formes). Hétéro fermentaires, les hydrates de carbone sont fermentés par les voies de l'hexose-mono phosphate et de la phosphokétolase.

Les produits finaux de la fermentation du glucose sont l'acide lactique, le CO<sub>2</sub>, l'éthanol et/ou l'acétate (Corrieu and Luquet, 2008).

Les bactéries *Weissella* requièrent généralement des acides aminés, des peptides, des hydrates de carbone fermentescibles, des acides gras, des acides nucléiques et des vitamines pour la croissance. La biotine, l'acide nicotinique, la thiamine et l'acide pantothénique ou ses dérivés sont nécessaires. L'arginine n'est pas hydrolysée par toutes les espèces de ce genre et la croissance se produit à 15°C (certaines espèces poussent jusqu'à 45°C) (Lahtinen et al., 2012). L'habitat des espèces de *Weissella* est variable et implique le plus souvent des aliments fermentés; mais les sources d'isolement suggèrent une origine environnementale (sol, végétation...). Les espèces : *W. viridescens*, *W. halotolerans* et *W. hellenica* ont été associés à la viande et ses dérivés. *W. cibaria*, *W. confusa* et *W. korensis* ont été détectées dans des aliments fermentés d'origine végétale (Holzapfel and Wood, 2014).

#### 4-Méthodes d'identification:

L'application de méthodes biochimiques et moléculaires modernes a montré que pour les bactéries lactiques les schémas d'identification classiques ne sont pas entièrement d'accord avec leurs relations phylogénétiques. L'approche classique de la taxonomie des bactéries

Lactiques a été toujours basée sur les caractéristiques morphologiques et physiologiques. Cette identification a été élargie pour inclure des marqueurs chimiotaxonomiques (acides gras cellulaires), analyse des protéines totales de la cellule et autres caractéristiques de la cellule (Holzapfetet al., 2001 ; Temmerman et al., 2004).

Généralement les caractéristiques phénotypiques comprennent une réaction positive de Gram, absence d'endospores, activité oxydase et catalase généralement absent, les produits de fermentation du glucose, la fermentation des glucides, la production d'acide lactique D(-) et L(+), hydrolyse de l'esculine et de l'arginine, réduction de nitrate, liquéfaction de gélatine, croissance à différentes températures, valeurs tolérées de pH et de concentration de NaCl et la tolérance à l'oxygène. Ces tests physiologiques simples, sont utiles pour la différenciation des genres (Axelsson, 2004). Cependant, les études taxonomiques utilisent de plus en plus des méthodes génotypiques pour différencier les espèces. Une identification faible est dépendante de l'information génotypiques issue de différentes méthodes génotypiques tels que le séquençage de l'ADNr, ribotypage, Random Amplifie dpolymorphic DNA (RAPD), rep-PCR fingerprinting, Amplified Fragment length polymorphism(AFLP), électrophorèse en champ pulsé (PFGE) de l'ensemble de l'ADN chromosomique digéré. Ces méthodes sont plus puissantes pour l'identification en une seule étape d'une souche inconnue et constituent aujourd'hui une partie importante de la taxonomie moderne des bactéries lactiques (Holzapfe L et al., 2001 ; Gevers, 2002 ; Temmerman, 2003 ; Temmerman et al.,2004 ; Mancini et al., 2012 ; Chao et al., 2013).

### 4-1- Méthode classique:

Les caractéristiques phénotypiques ont généralement servi de point de départ pour plusieurs tests sophistiqués et constituent la base de différenciation et d'identification des bactéries lactiques. Différents tests clefs sont largement adoptés. La morphologie ainsi que les méthodes physiologiques, métaboliques/ biochimiques et chimio-taxonomiques sont les plus utilisées. Méthodes physiologiques incluent principalement, la croissance à certaines températures, à certaine concentration de Na Cl, à différents pH. Les Méthodes métaboliques/biochimiques incluent principalement, la production de CO<sub>2</sub> en milieu glucosé le profil de fermentation de nombreux sucres, l'hydrolyse de l'arginine, de l'esculine et la détermination de l'isomère optique de l'acide lactique. Les méthodes chimio-taxonomiques incluent princ. Ipalement, la détection de l'acide meso-diaminopimelique (mDAP)

## Chapitre 3 Généralités sur les Bactéries Lactiques

Dans le peptidoglycane. Schillinger et lücke(1987) ont été les premiers à proposer une clef d'identification des bactéries lactiques de la viande basée sur la comparaison des caractéristiques physiologiques et biochimiques typiques des différents espèces (Ammor,2004). Au plus des méthodes mentionnés ci-dessus, il ya aussi la technique sérologique. pour les bactéries lactiques, l'analyse sérologique de fait principalement suivant la méthodes de lance fiend(1933), basé sur l'utilisation de polysaccharides de l'enveloppe cellulaire en tant qu'antigènes ( Curk et al., 1944).

**Tableau 5:** Cractéristiques des bactéries lactiques. (d'après Axelsson,2004).

Caractéristiques	Bacilles				Coques			
	Camo bacterium	Lactobacillus	Aerococcus	Enterococcus	Lactococcus Vagococcus	Leuconostoc Oenococcus	Pediococcus	Streptococcus
Formation des tétrades								
Production de gaz <sup>b</sup>	+ <sup>c</sup>	±	+	+	±	+	-	-
Croissance à 10°C	-	±	-	+			±	
Croissance à 45°C		±			-	-	±	±
Croissance dans 6.5% NaCL	ND <sup>d</sup>	±	-	-	-	±	±	-
Croissance dans 18% NaCL			-	+	-	-	±	-
Croissance à pH 4,4	ND	±	+	+	±	±		-
Croissance à pH 9,6					-	-	-	
Acide lactique	L	D,L,DL <sup>e</sup>	L	L	L	D	L,DL <sup>e</sup>	L

Les Notes :

+ : Positif ; - : négatif ; +- : réponse variable selon les espèces ; ND : non déterminé.

a Weissella peuvent etre également sous forme de bacille.

b Type de fermentation du glucose : homofermentaire (-) ou hétérofermentaire (+).

C Faible quantité de CO2 Produite selon le milieu.

D Peuvent ne pas se développer dans 8% NaCL.

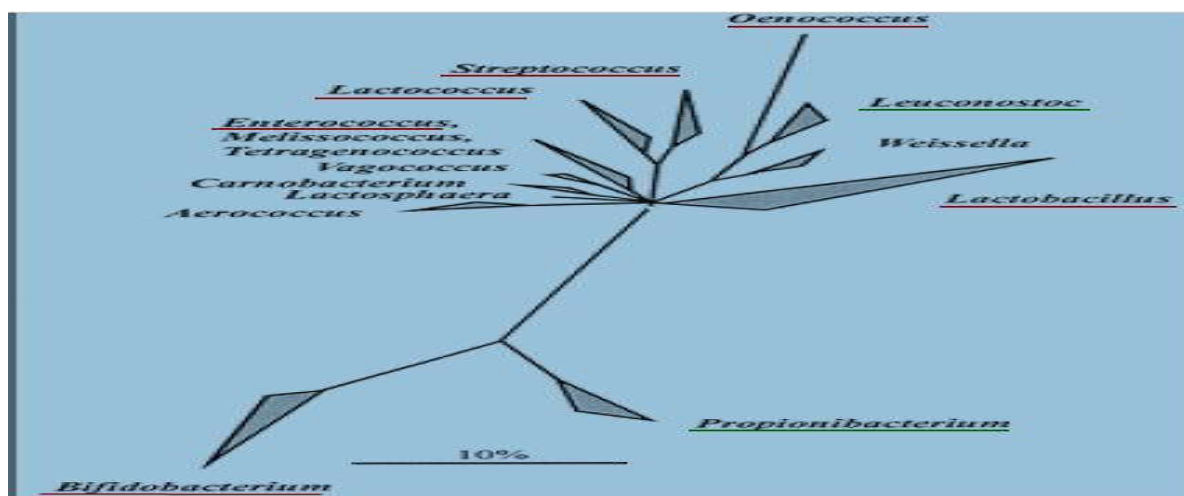
e Production d'acide lactique D, L, ou DL acide variable selon les es.

### 4-2-Méthode moléculaire:

Les méthodes génotypique basées sur l'analyse de l'ADN permettent une meilleure différenciation des micro-organismes à différent niveaux, allant du genre jusqu' à la souche en fonction des méthodes utilisées. En général, elles ont l'avantage sur les méthodes d'identification phénotypique de ne pas être influencé par les conditions de culture (Gevers, 2002). Les méthodes de typage des souches deviennent de plus en plus importantes dans l'étude des bactéries lactiques dont on peut dénombrer les suivantes:

- \*Extraction d'ADN.
- \* Hybridation ADN-ADN.
- \*Séquençage de la sous unité ribosome 16S.
- \*Utilisation du PCR (polymerase Chaine Reaction).
- \*Analyse des séquences et identification des bactéries.

Cependant, les études basées sur la comparaison des séquences de l'ARN ribosomal 16S ont montré que certains taxons générés sur la base de la caractérisation phénotypique ne concordent pas avec les relations phylogénétiques suggérées (figure 8). Ainsi, certaines espèces ne sont pas faciles à distinguer par des caractéristiques phénotypiques (Gevers., 2002). Par conséquent, Les méthodes de typage moléculaire telles que l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE), la réaction de polymérisation en chaine utilisant des éléments répétés (rep-PCR), ainsi que la méthode de (RFLP) sont extrêmement précieux pour la caractérisation et la détection des bactéries lactiques (Holzapfe L et al., 2001).



**Figure 11:** Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres associés, obtenu par analyse des ARNr 16 S. (Stiles et Holzapfel, 1997).

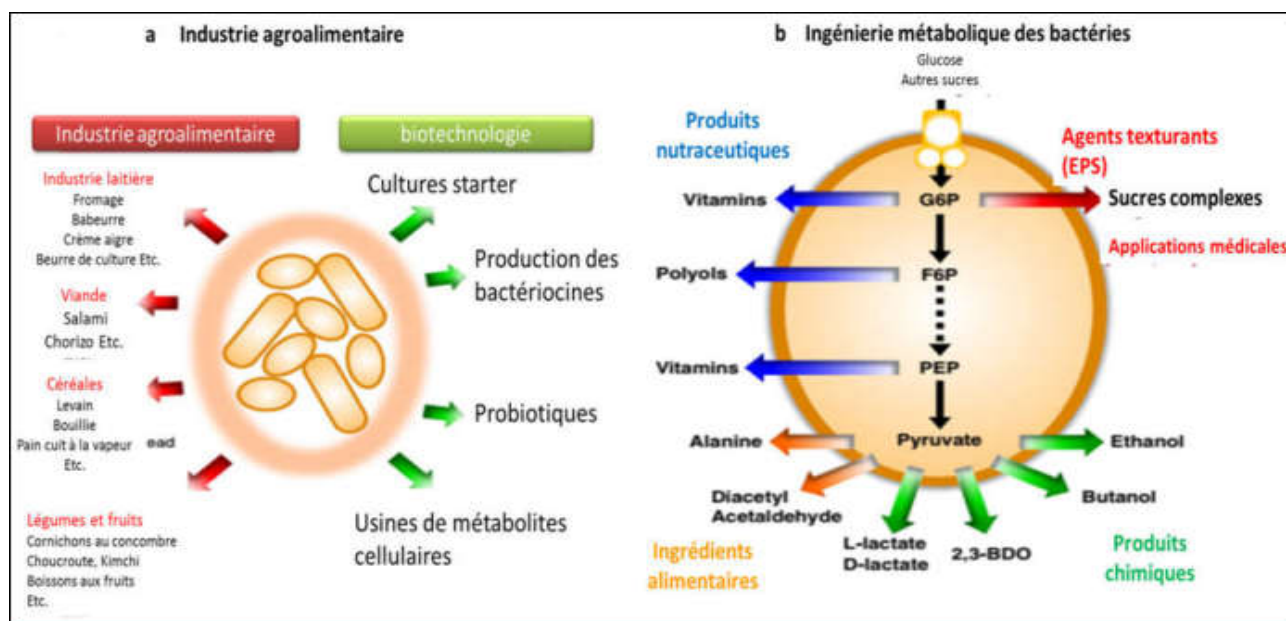
### 5- Intérêts des bactéries lactiques:

Le principal intérêt que représentent les bactéries lactiques pour l'industrie alimentaire réside dans l'amélioration de la qualité des produits fermentés en y développant certaines caractéristique organoleptique et augmentant leur durée de conservation (Stiles et Holzpafel, 1997). Elles participent à l'inhibition de certains microorganismes pathogènes, en produisant des métabolites ayant une activité antimicrobienne (Dortu et Thonard, 2009).

Leur rôle principal est de produire l'acide lactique qui influence le gout, la texture et la qualité organoleptique et microbiologique des produits laitiers. En effet, la production d'acide, facilite la coagulation des protéines par la présure, ainsi l'abaissement du pH limite la croissance des bactéries indésirables (Gilliland, 1985).

### 6- Bactéries lactiques et alimentation:

Les bactéries lactiques sont importantes pour l'industrie alimentaire car elles sont utilisées comme starters ou non-starter au cours de la production d'aliments fermentés. Elles jouent un rôle reconnu dans la préservation et la sécurité microbienne des aliments fermentés (Caplice et Fitzgerald, 1999), favorisant ainsi la stabilité microbienne des produits finaux (Mensah et al., 1991). les effets de protection sont issus de la production d'acides organiques, de CO<sub>2</sub>, d'éthanol, de peroxyde d'hydrogène et de diacétyl, des composés antifongiques, les bactériocines et les composés protéiques apparentés, et les antibiotiques (De Vuyst et Vandamme, 1994; Hôltzel et al., 2000 ; Lavermicocca et al., 2000; Atrihet al., 2001). Pendant le processus de fermentation, les bactéries lactiques influencent également les propriétés sensorielles d'un produit, y compris le développement du goût. les composés aromatiques sont formés par divers processus, tels que les conversions de lactose et de citrate (glycolyse et le métabolisme du pyruvate), la lipolyse et la protéolyse (Van kranenburget al. , 2002).



**Figure 12:** application des bactéries lactiques dans (a) les industries agroalimentaires et (b) la biotechnologie, (Pot, 2008).

Abréviation: G6P, glucose 6-phosphate ; F6P, fructose 6-phosphate ; et PEP, phosphoenolpyruvate.

En effet, les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, la reuterine, le di-acétyle et les bactériocines.

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens inhibant la croissance de bactéries altérantes ou pathogènes. Les souches productrices de bactériocines peuvent donc être, également, utilisées dans des produits non fermentés en tant que culture protectrice. Une culture protectrice est une culture antagoniste ajoutée à un produit alimentaire pour inhiber les bactéries pathogènes et/ou altérantes et ainsi prolonger sa durée de vie en changeant ses propriétés organoleptiques le moins possible (Rodgers, 2001 ; Rodgers, 2003 ; Vermeiren et al., 2004).

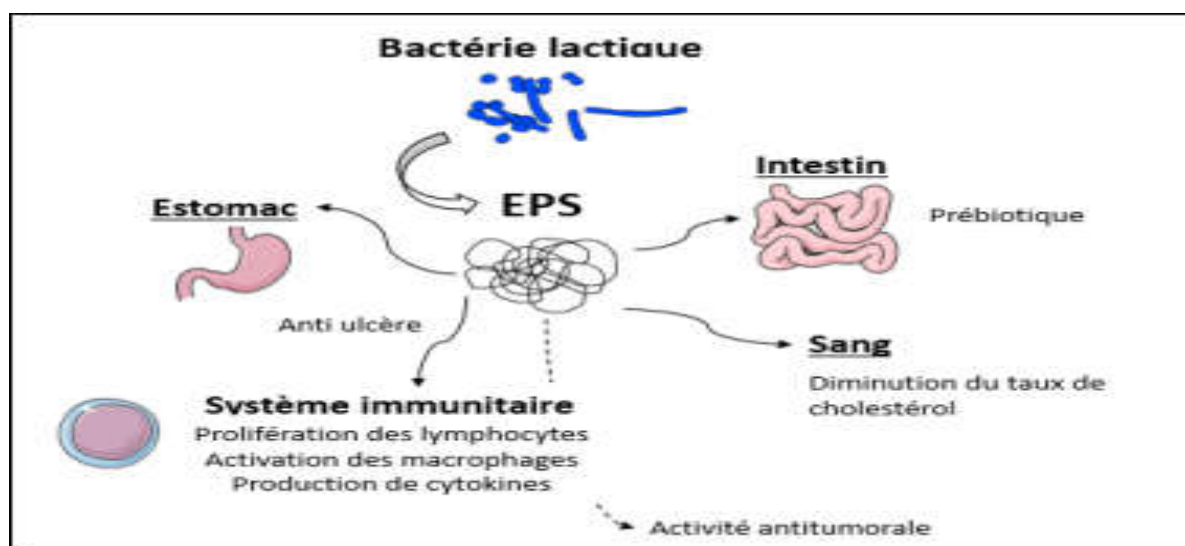
## 6-1-Les EPS dans l'industrie alimentaire:

Dans l'industrie alimentaire les bactéries lactiques productrices d'EPS sont utilisées pour augmenter la viscosité et améliorer la texture. Les EPS produits agissent en tant qu'agent gélifiant, épaississant, émulsifiant et stabilisant. Ils sont utilisés pour améliorer la texture des

produits laitiers tels que les yaourts, les fromages, les crèmes etc (Duboc et Mollet , 2001). Un dextrane (autrenom de glucane) produit par *Leuconostoc mesenteroides* a bénéficié d'un avis positif de l'EFSA (European Food Safety Authority – Autorité européenne de sécurité des aliments) mais n'est pas encore inscrit dans la liste positive des additifs alimentaires autorisés en France.

### 6-1-1- Bénéfices nutritionnels des EPS:

Le rôle des EPS pour les bactéries lactiques n'est pas encore clairement compris mais ils serviraient de moyens de défense contre des conditions de stress (stress osmotique, antibiotiques, molécules toxiques) (JB Prajapat , 2013). Plusieurs études ont montré l'effet antioxydant des EPS, capables de neutraliser les ROS (Zhang et al., 2013; Pan et Mei , 2010). De plus, les EPS ont montré plusieurs effets bénéfiques pour l'Homme, au niveau du système immunitaire, de l'estomac, du sang et de l'intestin, schématisés en Figure 13.



**Figure 13:** Représentation schématique des possibles effets bénéfiques des EPS au niveau de l'organisme humain. (Ruas-Madiedo et al. , 2002).

### 6-2-Les bactériocines:

#### 6-2-1- Définition:

Une bactériocine est une substance de nature protéique possédant une activité antimicrobienne et qui peut être produite aussi bien par des bactéries à gram positif que par des bactéries à gram négatif. Elle est considérée comme étant un produit extracellulaire primaire, synthétisé par les bactéries par voie ribosomale et peut avoir une activité bactéricide à spectre étroit

incluant, les bactéries de la même espèce ou du même groupe à l'exception de la bactéries productrice qui possède un mécanisme de protection spécifique (Aymerich et al.,2000 ; Ammor et al.,2006).

### 6-2-2- Classement des bactériocines:

Bradley (1967) a classé les bactériocines selon leur poids en deux groupes:

*-bactériocines de faible poids moléculaire:* non sédimentables, résistantes à la trypsine et thermostables.

*-bactériocines de haut poids moléculaire:* sédimentables, résistantes à la trypsine, thermolabile, visible au microscope électronique et ressemble aux queues de phage.

Les bactériocines sont des protéines ou peptides antibactériens produits par certaines bactéries lactiques qui inhibent la croissance de certaines bactéries à Gram (+) ou (-). Elles peuvent être également actives contre les bactéries lactiques. Les bactériocines sont classées en trois classes en fonction de leur composition et de leur structure (Hitchins et al., 1989 ; Cleveland et al., 2001).

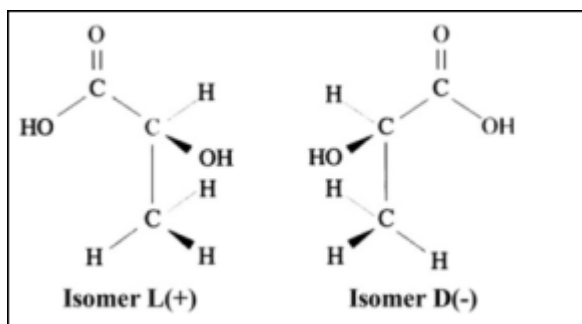
**6-2-2-1- Classe I:** Les lantibiotiques. Ce sont de petits peptides (< 5 kDa) stables à la chaleur contenant des acides aminés tels que la lanthionine ou la méthyllanthionine. La nisine (E234), qui est actuellement la seule bactériocine autorisée comme additif dans l'industrie alimentaire appartient à cette classe.

**6-2-2-2- Classe II:** Les non-lantibiotiques. Les bactériocines de classe II sont de petits peptides (< 10 kDa), relativement stables à la chaleur ne contenant pas de lanthionine. Elles sont divisées en quatre sous-classes : IIa, IIb, IIc et IId. La classe IIa comprend de petits peptides thermiquement stables, synthétisés sous forme de précurseurs et actifs contre *Listeria*. La classe IIb comprend les bactériocines composées de deux différents peptides. La classe IIc comprend les bactériocines formant une structure circulaire, les deux extrémités N et C- terminales étant liées de façon covalente. La classe IId inclut les autres bactériocines de classe II ne pouvant pas être incluses dans les précédentes sous-classes, les bactériocines ne possédant pas de peptides signaux et les bactériocines *sec*-dépendantes. Celles-ci possèdent le peptide signal *sec* qui leur permet de traverser la membrane cytoplasmique par la voie *sec*-dépendante.

**6-2-2-3-Classe III:** Grosses molécules sensibles à la chaleur (> 30 kDa). Les bactéries lactiques appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* et *Weissella* sont connues pour produire des bactériocines. Les bactériocines sont généralement nommées en fonction de l'espèce. Par exemple, les leucocines, les pédiocines, les entérocinés et les weissellicines sont les bactériocines produites par les genres *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus* et *Weissella*, respectivement.

### 6-3-L'acide lactique:

L'acide lactique, de formule chimique  $C_3H_6O_3$ , devient en solution aqueuse l'ion lactate  $CH_3CH(OH)COO^-$ , son  $pK_a$  est de 3,86. Deux isomères d'acide lactique peuvent être produits pendant la fermentation, l'isomère D(-) ou l'isomère L(+) (Figure 14). L'isomère L(+) est assimilé par les cellules intestinales et utilisé pendant les activités métaboliques chez l'humain. Au contraire, l'isomère D(-) n'est pas assimilé et est éliminé par les reins sous forme de sels (Felis et al., 2015). Les acides organiques ont un effet antimicrobien et assurent une sécurité sanitaire des produits fermentés. Sous forme non ionisée, ils entrent dans les cellules par diffusion simple. Aux pH intracellulaires, ils sont ionisés et ne peuvent plus sortir de la cellule par diffusion. Ils interfèrent avec le maintien du potentiel de la membrane cellulaire, en inhibant le transport actif, en réduisant le pH intracellulaire et en inhibant certaines fonctions métaboliques (Rattanachaikunsopon et phumkhachorn, 2010).



**Figure 14:** Stéréoisomères L(+) et D(-) de l'acide lactique ,( Felis et al., 2015).

### 7- Les Bactéries lactiques et l'influent direct sur la santé humaine:

Les probiotiques sont des microorganismes vivants, qui lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, affectent positivement la santé de l'hôte (Guarner et al., 2011). Ainsi, les bactéries lactiques, en particulier les espèces de *Lactobacillus*, ont été exploitées comme

probiotiques en raison des preuves croissantes de leurs bienfaits pour la santé (Tropcheva et al., 2014 ; Feng et al., 2015).

L'intérêt des bactéries lactiques en matière de santé humaine a été initialement proposé au début du siècle, en 1907, par le russe Metchnikoff. ( Metchnikoff ,1907).

Selon lui, les lactobacilles pouvaient réduire la putréfaction intestinale, en modifiant la microflore intestinale, et ainsi prolonger la vie. Depuis, un grand nombre d'études sur l'effet potentiel des bactéries lactiques sur la santé ont été publiées. Plus récemment, des études de type pharmaceutique (double-aveugle avec placebo) ont été menées à grande échelle. S. Drouault, G. Corthier dans plusieurs laboratoires afin de démontrer l'effet bénéfique des bactéries lactiques sur la santé (Elmer et al. ,1996;Vesković Moračanin et al., 2014 ;Holzapfel et al., 1998 ; Marteau et Rambaud, 1998 ; Vanderhoof et al.,1998). Seul un petit nombre de bactéries lactiques dont les genres bactériens sont *Lb. acidophilus*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. plantarum*, *E. faecium* ainsi que les bifidobactéries a été ainsi étudié. Les effets bénéfiques potentiels cités sont nombreux et variés. Certains sont maintenant bien établis tels que l'amélioration de la digestion du lactose et le traitement des désordres diarrhéiques, d'autres restent encore controversés tels que la diminution du cholestérol sérique ou encore la réduction de la formation de tumeurs. Les bactéries lactiques pour lesquelles ces effets sont décrits sont appelées probiotiques. Les probiotiques sont définis comme des microorganismes vivants, qui après ingestion, exercent des effets bénéfiques sur la santé allant au-delà des vertus nutritives inhérentes de l'aliment (Fuller ,1989 ; Schaafsma ,1996).



# *Chapitre 2: les bactéries lactiques et miel*



## 1-Micro-organismes dans le miel:

Certains chercheurs considèrent le miel comme source puissante de bactéries capables de synthétiser les substances antimicrobiennes (Pajor et al., 2018). Ces composés pourraient être bénéfiques dans différents domaines tels que la bio-préservation des aliments et la médecine (contre les isolats sensibles et résistants aux antibiotiques) Au cours du processus de production du miel, les abeilles introduisent dans le nectar certaines bactéries de leur microbiote intestinal. Il existe un large éventail de bactéries transférées du tube digestif au produit, notamment : *Lactobacillus* sp., *Bacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Clostridium* spp. et les bactéries Gramnégatives. En outre, *Achromobacter* spp., *Citrobacterspp.*, *Enterobacterspp.*, *Flavobacterium*spp., *Klebsiellaspp.*, *Proteusspp.*, *Pseudomonas* spp., ont également été identifiées (Gilliam et al., 1978 ; Ahn et al., 2012).voir ce tableau 06.

## 2- Origine des bactéries lactiques dans le miel:

Leur présence s'explique par une contamination via les pollens, le contenu digestif des abeilles, la poussière, l'air, les fleurs... On va donc trouver dans les ruches, sur les abeilles adultes, des bactéries et des levures *Bacillus*, *Micrococcus*, *Saccharomyces* *Streptomyces*, *Enterobacteriaceae*...qui se retrouveront ensuite dans le miel comme le montre l'illustration. En effet, les intestins des abeilles contiennent 1% de levures, 27% de bactéries Gram+ et 70% de bactéries diverses dont les Gram- (Harris, 1994) L'autre source de contamination du miel est constituée par l'Homme, les équipements, les récipients, l'atmosphère lors de la récolte et du conditionnement.

La plupart de ces bactéries et autres micro-organismes ne peuvent pas se développer ou se reproduire dans le miel, car celui-ci possède une activité antibactérienne. En effet, lorsque l'on inocule différentes bactéries dans un miel stérilisé à 20°C, les bactéries ne résistent pas plus d'une quinzaine de jours. Seules les spores produites par les microorganismes peuvent survivent jusqu'à 4 mois après. Cependant si le miel est mis en présence d'eau, alors la croissance bactérienne est possible. Elle est toutefois minime lorsque l'on sait qu'en associant du miel et de l'eau à hauteur de 50% chacun, la présence bactérienne n'excède pas 40 jours. Donc la probabilité d'une contamination de l'homme est très faible (Olaitan, 2007).

**Tableau 6:** Micro-organismes n répertoriés dans le miel (Pieper B. - Honey-Based ). Gilliam et al., 1978 ; Ahn et al., 2012).

Bactéries	Levures	Champignons
Alcaligens		
Achromobacter		
Bacillus		
Bacteridium	Ascophaera	Asperhillus
Brevibacterium	Debaromyces	Alihia
Citrobacter	Hansenula	Bettsiaalvei
Clostridium	Lipomyces	Cephalosporium
Enterobacter	Nematospora	Chaetomium
Escherichia coli	Oosporidium	Coniothecium
Erwinia	Pichia	Hormiscium
Flavobacterium	Saccharomyces	Peronsporaceae
Klebsiella	Scizosaccharomyces	Peyronelia
Micrococcus	Trichosporium	Tripoosporium
Neisseria	Torula	Uredianceae
Pseudomonas	Torulopsis	Ustilaginaceae
Xanthomonas	Zygasaccharomyces	
Enterococcus		
Lactobacillus		
Bifidobacterium		

### 3- Les Bactéries Lactiques et Le Miel:

Des études cliniques ont associé à la présence de bifidobactéries dans le tractus gastrointestinal, des effets bénéfiques comme la stimulation du système immunitaire et l'anticarcinogénicité. Le miel favoriserait la croissance, l'activité et la viabilité de bifidobactéries, habituellement incorporées lors de la fabrication de produits laitiers fermentés (Kajiwara et al., 2002). Selon Ustunol et Gandhi (2001), il existerait un effet synergique entre les carbohydrates du miel dans la stimulation de la croissance et l'activité des bifidobactéries.

Tableau 7: Composition moyenne du miel (Claude Jardel, 2008).

Caractéristiques mesurées	Moyenne	Amplitude de la variation
Couleur : échelle de PFUND	05,000	00,00 à 14,00
GRANULATION : échelle de WHITE	03,00	00,00 à 09,00
Humidité %	17,200	13,40 à 22,900
Fructose %	38,190	27,25 à 44,260
Glucose %	31,280	22,03 à 40,750
Saccharose %	01,280	00,25 à 07,570
Maltose, isomaltose %	07,310	02,74 à 15,980
Sucres supérieurs %	01,500	00,13 à 8,490
Indéterminés %	03,100	00,00 à 13,200
PH	03,910	03,420 à 06,100
Acidité libre Meq/kg	22,030	06,75 à 47,190
Lactones Meq /kg	07,110	00,00 à 18,760
Acidité totale Meq /kg	29,120	08,68 à 59,490
Lactones /acidité libre Meq/kg	00,335	00,00 à 00,950
Cendres %	00,169	00,02 à 01,028
Azote %	00,041	00,00 à 00,133
Indice diastasique (Schade)	20,800	02,10 à 61,200

#### 4- Propriétés biologiques du miel:

##### 4-1- Propriétés antibactériennes:

Avec l'augmentation de la prévalence des bactéries résistantes aux antibiotiques, le miel est de plus en plus apprécié pour son activité antibactérienne. La puissante activité *in vitro* du miel, contre les bactéries résistantes aux antibiotiques et les résultats prometteurs obtenus lors de l'application du miel sur des plaies, ont attiré l'attention de nombreux chercheurs qui ont tenté de caractériser les pouvoirs bactéricide et bactériostatique du miel. Les composantes antibactériennes du miel et ses vertus curatives sont jusqu'ici mal connues. Six facteurs principaux sont impliqués dans ce pouvoir bactéricide (Molan, 2002).

**4-1-1- Propriétés anti bactériennes par effet osmotique:**

Elle est la conséquence de la forte teneur en sucre du miel. Le miel agit donc de manière osmotique, en provoquant une forte déshydratation des germes qui n'ont plus alors suffisamment d'eau pour survivre (Olaitanet al., 2007). De plus, le miel étant une solution sursaturée, l'eau disponible pour permettre la croissance de la plupart bactéries ou des levures est insuffisante.

**4-1-2- Propriétés anti bactériennes liées au pH acide:**

Le pH du miel est relativement acide, variant entre 3,5 et 6 (Rossant, 2011). Ce pH permet de ralentir ou d'éviter la croissance de nombreuses espèces de bactéries pathogènes et renforce donc l'activité antibactérienne du miel (Assie, 2004).

**4-1-3- Propriétés anti bactériennes liées à la formation de peroxyde d'hydrogène :**

L'eau oxygénée ( $H_2O_2$ ) est considérée comme la principale inhibine contenue dans le miel (Budzynski, 2006). L'eau oxygénée et l'acide gluconique résultent de l'oxydation de l'eau et du glucose. Cette oxydation est provoquée par la glucose-oxydase. La glucoseoxydase est une enzyme du miel sécrétée par la glande nourricière de l'abeille. La catalase représente l'antagoniste de la glucose-oxydase. Cette enzyme également présente dans de nombreux miels réduit l'eau oxygénée. Alors que la glucose-oxydase produit l'eau oxygénée, celle-ci est éliminée par la catalase. La concentration en peroxyde dépend donc directement de l'activité de ces deux enzymes. (Boulaaba, 2019)

En outre, la formation de l'eau oxygénée est influencée par la chaleur et la lumière. Ces dernières altèrent la glucose-oxydase et ralentissent ainsi la production d'eau oxygénée. Étant donné que l'eau est indispensable au processus d'oxydation, l'eau oxygénée se forme uniquement dans le miel non mûr. Dans le miel mûr, le processus est bloqué. Si le miel est dilué, il peut être réactivé, mais le miel mûr ne contient que de petites quantités d'eau oxygénée inhibant que faiblement la croissance bactérienne (Bogdanov et Blumer, 2001).

**4-1-4- Propriétés anti bactériennes liées Substances non peroxydiques:**

Les substances antibactériennes non peroxydiques du miel sont des lysozymes, des flavonoïdes, des acides aromatiques, le méthylglyoxal (retrouvé en particulier dans le miel de Manuka), la défensines-1 (protéines fabriquées par les abeilles), des substances volatiles et

Autres composants indéterminés (Bogdanov et Blumer, 2001 ; Boulaaba, 2019). Ainsi, l'activité antibactérienne du miel est très complexe en raison de l'implication de multiples composés et de la grande variation des concentrations de ces composés. Tous les miels n'ont pas la même activité antibactérienne. (Molan, 1992 ; Kwakman et Zaat, 2012). Une analyse systématique de la nature chimique des substances non peroxydiques n'a pas encore été effectuée (Bogdanov et Blumer, 2001).

#### **4-2-Activité anti-inflammatoire et Immunomodulatrice :**

Lorsqu'une agression infectieuse (bactérie, virus, levures), chimiques (antigènes, allergènes) ou physique (traumatismes, corps étrangers, radiations) se produit dans l'organisme, aussitôt une réaction de défense se met en place : c'est l'inflammation.

Le processus inflammatoire est induit par divers types de produits chimiques et / ou d'agents biologiques, notamment des enzymes pro-inflammatoires et des cytokines (Dao et al., 2004).L'enzyme cyclooxygénase-2 (COX-2), dans le processus inflammatoire catalyse le métabolisme de l'acide arachidonique en prostaglandine (Griswold et Adams, 1996 ; Cho et al., 2004). Le métabolisme anormal de l'acide arachidonique est impliqué dans la cancérogenèse et l'inflammation. La COX-2 est surexprimée dans des conditions précancéreuses et malignes (Hong et al., 2001).

#### **4-3-Effet prébiotique:**

Des études cliniques ont associé à la présence de bifidobactéries dans le tractus gastrointestinal, des effets bénéfiques comme la stimulation du système immunitaire et l'anticarcinogénicité. Le miel favoriserait la croissance, l'activité et la viabilité de bifidobactéries, habituellement incorporées lors de la fabrication de produits laitiers fermentés (Kajiwara et al., 2002).Selon Ustunol et Gandhi (2001), il existerait un effet synergique entre les carbohydrates du miel dans la stimulation de la croissance et l'activité des bifidobactéries

### 5-Origin et rôle des bactéries lactiques dans le miel:

Parmi ces microorganismes, les bactéries lactiques, principalement les lactobacilles et les bifidobacterium ont été distinguées. Les bactéries lactiques pourraient être endémiques du tube digestif des abeilles domestiques adultes et indépendantes des saisons et des facteurs nutritionnels (Gilliam, 1997). Ils diffèrent selon les sources de nectar et la présence d'autres genres bactériens dans l'estomac de l'abeille. Il est supposé que ces bactéries lactiques jouent un rôle clé dans la conversion du nectar en miel et du pollen en poudre (aliment stocké riche en protéines) en raison de leurs propriétés de fermentation (Olofsson et Vasquez, 2008 ;Vasquez et al., 2009). Ce microbiote de bactéries lactiques constitue un grand intérêt pour la santé des abeilles, en les protégeant contre les agents pathogènes (Vasquez et al., 2012), en contribuant aux propriétés antimicrobiennes du miel (Olofsson et al., 2014). En effet, il a été constaté un mutualisme développé par les abeilles et ces bactéries lactiques. Les bactéries lactiques préparent l'environnement pour rendre les nutriments disponibles pour les abeilles en sécrétant divers composés actifs qui inhibent la croissance des autres microbes, d'autre part, le tractus intestinal des abeilles mellifères est protégé contre les micro-organismes nuisibles. Le nectar stocké dans l'estomac de l'abeille est régurgité dans les rayons de la ruche dont la température de 35°C, qui correspond à la température optimale pour le développement des bactéries lactiques (Jones., 2004). Les larves d'abeilles domestiques sont probablement stériles au début, mais à mesure que les infirmières se nourrissent de miel, les abeilles domestiques gagnent avec le temps cette flore intestinale avant de terminer leur cycle de vie (Lee, 1984)

**PARTIE II :**

**RECHERCHE EXPERIMENTALE**

# **CHAPITRE I:**

## ***MATERIEL & METHODES***

**1-Lieu de travail:**

Les travaux présentés dans cette étude ont été effectués au niveau du laboratoire des Sciences et Techniques de Production Animales (LSTPA) de l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem.

**2-Echantillonnage et isolement de bactéries lactiques:****2.1- Collecte des échantillons:**

Des échantillons de miels frais ont été collectés provenant de la ville de Mostaganem. Ces échantillons sont ensuite conservés à 4°C au niveau du laboratoire jusqu'à lancement de l'expérimentation.

**2.2- Milieux de culture:**

Lors de la réalisation des différents tests d'identification des bactéries lactiques, plusieurs milieux de culture liquides et solides ont été utilisés (voir annexe 1).

Les milieux sont stérilisés par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes

**2.3- Préparation des échantillons:**

Afin d'isoler les bactéries lactiques, 10g de notre échantillon de miel ont été mélangés dans 90 ml d'eau physiologique stérile. Après homogénéisation, une série de dilution décimale de 1/10 a été faite à partir de cette solution mère. Un volume de 0.1ml est déposé et étalé sur milieu MRS solide. Trois boîtes de Pétri par dilutions sont ensemencées par la technique du râteau et incubées à 30°C et 37°C durant 24 à 48heures. Après croissance sur ce milieu, les boîtes dont les colonies sont bien distinctes et dont les caractères cultureux la couleur blanchâtre et colonie un taille très petites, forme circulaire ayant un contour lisse correspondent aux caractéristiques des bactéries lactiques sont isolées en vue d'un enrichissement dans des tubes MRS.

**2.4- Isolement et purification des bactéries lactiques:**

Les dilutions ayant donné moins de 10 colonies par boîtes ont été retenues et repiquées sur milieu MRS solide. Les isolats ont été purifiés par la méthode des stries sur milieu MRS solide. Les colonies, bien distinctes et bien développées, sont retenues pour des examens macroscopiques, microscopiques et une recherche de la catalase afin de confirmer leur appartenance au groupe des bactéries lactiques.

**2.5-Conservation des bactéries lactiques:**

Après l'obtention des cultures lactiques pures, on procède à la conservation de ces dernières. Cette conservation est réalisée selon deux techniques :

**2.5.1- Conservation de courte durée:**

Les cultures pures isolées sont ensemencées sur gélose MRS incliné et incubées à 37°C pendant 24h. Elles sont ensuite conservées à 4°C pendant plusieurs semaines.

**2.5.2- Conservation de longue durée:**

La conservation à long terme des isolats purifiés a été réalisée dans le bouillon MRS contenant 30% de glycérol et stockés à une température de -20°C.

**2.6- Pré-identification des bactéries lactiques par étude morphologique, physiologique et Biochimique:**

La pré-identification des isolats a été réalisée par l'application des techniques classiques de microbiologie, basées sur la recherche d'un certain nombre de caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques. Toutes les techniques d'identification utilisées ont été décrites par Larpent (1997).

**2.6.1. Etude morphologique:****➤ Etat frais**

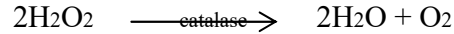
Un tube de 3 ml de bouillon MRS a été inoculé par une colonie. On incube à 37°C pendant 24 à 48 heures jusqu'à l'apparition d'un trouble microbien. Pour vérifier la mobilité et la forme, une goutte de la suspension bactérienne est mise entre lame et lamelle et observée au microscope optique au grossissement G×40

**➤ Etude macroscopique et microscopique**

L'observation macroscopique consiste à décrire les colonies obtenues sur milieu solide après une incubation à 30°C pendant 24 à 48 heures (taille, forme, aspect, contour, pigmentation). L'observation microscopique par coloration nous permet de distinguer les isolats selon le type de Gram (positif ou négatif), leur morphologie (bacille ou coque) et leurs modes d'associations (isolés, en chaînettes ou en tétrades). Les bactéries lactiques sont Gram positives.

➤ **Recherche de la catalase**

La catalase enzyme est capable de décomposer l'eau oxygénée selon la réaction:



Une colonie est mise en suspension avec une goutte de solution de peroxyde d'hydrogène (10 volumes) sur une lame. La réaction positive se traduit par un dégagement immédiat de bulles de gaz (O<sub>2</sub>) (Marchal et *al.*, 1991).

## **2.6.2- Etude biochimique:**

### **2.6.2.1-Type fermentaire:**

Les colonies sont ensemencés dans un bouillon MRS contenant les cloches du Durham, puis incubés à 30°C/24heures. L'absence de gaz dans les cloches montre qu'il s'agit d'un métabolisme homofermentaire alors que la présence de gaz indique qu'il s'agit d'un métabolisme hétérofermentaire.

## **2.6.3- Etude physiologique:**

### **2.6.3.1- Croissance à différentes températures:**

Chaque isolat a été inoculé dans 5ml de MRS liquide à différentes températures 10°C, 30°C et 45°C. Après 72 heures (à 30°C et 45°C) et 3 à 10jours (à 10°C) d'incubation (Guiraud et Galzy, 1980), la croissance est appréciée par l'apparition d'un trouble.

### **2.6.3.2-Croissance en présence de 6,5% de NaCl:**

Dans ce test, nos isolats ont été cultivés en milieu MRS à PH 6.5 et 5.5 additionné de 6,5% de NaCl. Ce test ne donne pas d'indication sur l'identité des isolats mais il permet de les caractériser à nous isolats en jugeant à elles indéterminisme au NaCl. La lecture des résultats est réalisée par constatation d'une croissance bactérienne après incubation à 30°C pendant 48h.

### **2.6.3.3- Croissance à différents pH:**

Les isolats sont cultivés dans un bouillon MRS à pH4.5 et pH9.6 ; L' incubation a été faite à 30°C pendant 48heures. Les résultats sont la croissance est appréciés par l'apparition d'un trouble.

## CHAPITRE 2:

# *RESULTATS ET DISCUSSION*

### 1. Isolement et purification des cultures bactériennes:

Un nombre de 25 isolats ont été isolés à partir de notre échantillon de miel. Ils ont été purifiés par repiquage successifs sur milieu MRS. Toutes ces bactéries se sont révélées Gram positive et catalase négative.

**La revivification de nos 25 isolats présente un trouble indiquant une bonne croissance bactérienne (Figure 15).**



**Figure 15:** Revivifications des isolats des bactéries lactiques étudiés sur milieu MRS.

### 2- Pré-identification par étude morphologique, physiologique et biochimique:

Lors de cette étude nous avons identifié nos isolats selon les techniques phénotypiques conventionnelles basés sur les tests morphologiques, biochimiques et physiologiques.

#### 2.1- Observation macroscopique:

Les résultats de l'examen macroscopique des cultures obtenues sur les 25 boîtes de pétri montre : que toutes les colonies présentent les mêmes caractéristiques que celles du groupe des bactéries lactiques représenté dans la (figure 16).

En effet, l'étude morphologique des cultures montre des très petites colonies, de couleur blanchâtre, de forme arrondie et circulaire ayant un contour lisse.

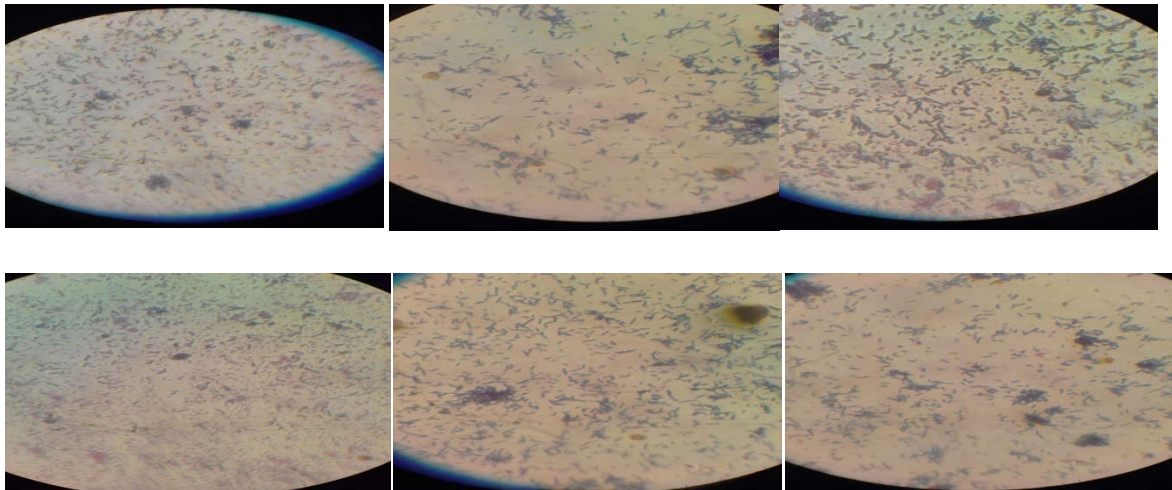
Le résultat de l'examen macroscopique est illustré dans la figure ci-dessous.



**Figure 16:** Observation macroscopique des colonies après incubation à 37°C pendant 48heures.

## 2.2- Observation microscopique:

L' observation microscopique montre des bactéries en forme de bâtonnets disposés en amas et isolés. Elles sont associées en paire ou en courtes chainettes rappelant les caractéristiques des bactéries appartenant au genre *Lactobacillus*. Toutes ces bactéries sont à Gram positive et à catalase négative.



**Figure 17 :** Aspect microscopique des cellules après la coloration de gram Gr(100), bacille court et longue.

## 2.3- Etudes physiologiques et biochimiques:

### 2.3.1- Test de catalase:

Chez toutes les souches caractérisées, nous avons constaté une catalase négative. Pour la suite de notre travail, nous avons retenu seulement les souches sous forme de bâtonnets c'est-à-dire seulement les lactobacilles.

### 2.3.2- Croissance dans les conditions hostiles:

#### 2.3.2.1- Croissances à différents température 10°C et 30°C et aussi 45°C:


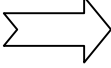
Cette étude est réalisée pour une croissance à des températures de 10 ,30 et à 45°C pendant 48 heures .Ce test permettent de différencier entre la flore thermophile (bactéries qui poussent à 45°C) et mésophile (bactéries qui poussent à 10°C). La température de 30°C correspond au témoin.

Le résultat de ces tests est la majorité des isolats caractérisés ont une croissance à une température de 30°C.



**Figure 18:** Test de croissance à 30°C sur bouillon MRS à pH 6.5 et 5.5 après 24heures d'incubation.

#### 2.3.2.2- Croissances à différents PH:

- PH 9.6  Six isolats possèdent une croissance.
- PH 4.5  un seul isolat s'est développé sur milieu MRS liquide à PH 4.5



**Figure 19:** Test de croissance à pH 9.6 sur bouillon MRS après une incubation à 30°C pendant 48 heures.

### 2.3.2.3- Croissance sur milieu hyper salé à 6.5 de NaCl:

Ce test est décrit pour une croissance variable des lactobacilles c'est-à-dire qu'il va nous permettre juste de caractériser nos isolats en évaluant leur tolérance au NaCl. Ce test a montré que tous les isolats sont capables de croître en présence de 6,5 % NaCl.



**Figure 20 :** Test de croissance en présence de 6.5% de NaCl sur milieu MRS à 30°C pendant 48heures.

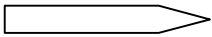
2.3.3-Type fermentaire:

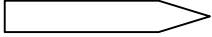
Tous les isolats se sont révélés homofermentaires à l'exception d'un seul qui est hétéro fermentaire.

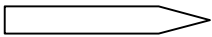


**Figure 21:** Résultat du test du type fermentaire sur bouillon MRS sans citrate après incubation à 30°C pendant 48 heures.

Le genre *lactobacillus* sont divisé en 3 groupes:

Groupe 1  homofermentaires stricts.

Groupe 2  homofermentaires ou hétéro fermentaires facultatifs.

Groupe 3  hétérofermentaires stricts.

Nos isolats appartiennent aux groupes 1 et 2.

Tableau 08: Résultats du test physiologique et biochimique des Bactéries Lactiques.

LesCodes des isolats	Type fermentaire	NaCl 6.5%	Les Températures de croissance			PH		Test Catalase
			10°C	30°C	45°C	9.6	4.5	
21	-	-		+		-	-	-
38	-	-		+		-	-	-
234	-	-		+		-	-	-
74	-	+		+		+	-	-
22	-	-		+		-	-	-
226	-	-		-		-	-	-
239	-	-		-		-	-	+
174	-	-		+		-	-	-
198	-	-		+		+	-	-
34	-	-		+		-	-	-
175	-	+		+		+	-	-
45	-	-/+		+		-	+	-
66	-	-		+		+	-/+	-
37	-	-		-		-	-	-
227	+	-		+		+	-	-
10	-			+			-	-
17	-	+		+		-	-	-
75	-	-		+		-	-	-
36	-	-		+		-	-	-
111	-	-		+		-	-	+
133	-	-		+/-		-	-	-
107	-	-		+		-/+	-/+	-
176	-	-		+		-	-	-
A112	-	-/+		+/-		-	-	-
127	-	+		+		+	-	-

+ : réaction positive, - réaction négative, +/- : réaction variable

### 3- la conservation des souches lactiques:



**Figure 22:** conservation des souches lactiques à courte durée.

La conservation des souches lactiques à courte durée a été établie dans le but de lancer les aptitudes technologiques pour chaque espèce caractérisée ainsi que l'identification phénotypique par les galeries API.

La conservation pour une longue durée est dans le but de lancer l'identification moléculaire des espèces caractérisées.

### **Discussion:**

Le miel contient des micro-organismes pathogènes et non pathogènes (bénéfiques), parmi les bactéries bénéfiques les plus recherchés récemment sont les bactéries lactiques.

Notre étude a permis de mettre en évidence les caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques des lactobacilles isolées à partir des miels frais.

Dans le but de comparer nos résultats avec ceux trouvés dans d'autres recherches on a constaté que les chercheurs du groupe Tajabadi et al, 2013 ont isolé et identifié des lactobacilles à partir des miels Malaisiens de même pour Mohamed Mustafa et al ,2012 qui a aussi isolé ces mêmes espèces. En Algérie Mounia Homraniet al, 2019 a identifié et a étudié, dans ses travaux de recherche, l'effet pro biotique des lactobacilles isolées à partir des miels algériens.

Amara Sabrina, 2012 a montré que l'écosystème du miel permet la croissance des lactobacilles. Ces bactéries peuvent être originaires des plantes (nectar et pollen), du sol ou bien de l'eau.

Le tube digestif des abeilles mellifères constituent une source importante de contamination de miel comme décrit par Mathialagan et al (2018) et Hoda Mahmoud et al(2020). Ces éminents chercheurs ont pu isoler des bactéries lactiques à partir des estomacs des abeilles.

D'autre part les résultats fournis par l'étude ont montré que ces souches lactiques ont aussi prouvé une résistance remarquable vis-à-vis des conditions hostiles de : culture en milieu hypersalé et vis-à-vis aussi des niveaux des pH utilisés.

Tenant compte de cela, ces souches sont capables de s'adapter et de fournir de bonnes aptitudes fermentaires à une utilisation technologique adaptée.

Des espèces tel que les Lactobacilles devenues rares dans les pays industrialisés sont fréquentes dans nos miels frais ce qui contribue à lancer d'autres recherches dans ce domaine pour l'enrichissement du créneau et la connaissance de leur écologie.

# Conclusions

## **Conclusion et perspectives:**

Les bactéries lactiques sont actuellement exploitées en médecine humaine et vétérinaire en raison de l'apparition de bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques.

Ce travail a permis d'enrichir la collection des lactobacilles isolés à partir des miels frais algériens.

Nous avons recherché les caractéristiques phénotypiques et biochimiques des lactobacilles à l'aide des milieux de culture bactérienne MRS (Man et al., 1960); et aussi d'une série des tests physiologiques et biochimiques ce qui nous a conduit à les classer au groupe 1 ou 2 des lactobacilles.

Il serait intéressant de vérifier ces souches par identification moléculaire et d'étudier leurs propriétés probiotiques. L'obtention des souches autochtones de bactéries lactiques reste un objectif important sur le plan pharmaceutique ainsi que sur le plan industriel.

Les microorganismes identifiés dans des échantillons de miel comprennent des espèces bénéfiques ainsi que des microorganismes capables de résister aux conditions de croissance difficiles intrinsèques au miel.

Les vingt-cinq (25) isolats testés sur une solution mère le "miel frais" de la région de Mostaganem révèlent comme identification préliminaire la présence de souches de lactobacilles.

Nous avons conclu que le miel frais est un écosystème microbien d'une flore de bactéries lactiques.

Pour compléter ce travail sera créature terminée par le plan technique:

-Une identification complémentaire par biologie moléculaire des isolats purifiés.

-Une étude complète de la microflore totale de ces miels frais par la caractérisation de la microflore d'intérêt technologique.

# **Les Annexes**

## Les Milieu de culture:

### ✓ **MRS bouillon (milieu de Man et, Rogosa et Sharpe, de Man et al, ,1960):**

Peptone.....	10g
Extrait de viande.....	10g
Extrait de levure.....	5g
Glucose.....	20g
Tween80 .....	1ml
Phosphate di potassique .....	2g
Acétate de sodium .....	5g
Citrate d'ammonium.....	2g
Sulfate de magnésium.....	0.2g
Sulfate de Manganèse.....	0.5g
Eau distillée.....	1L

On corrige le pH à 5.5 et 6.5

- Stérilisation par autoclavage à 120 °C Pendant 15 min.

### ✓ **MRS bouillon gélose (semi solide) (Man et al ,1960) :**

MRS liquide.....	1L
Agar- agar.....	7.5g
PH.....	5.5 et 6.5

- Stérilisation par autoclavage à 120 °C Pendant 15 min.

## Les Annexes

---

### ✓ **Bouillon Hypersalé(6.5% NaCl) :**

Peptone.....	15g
Extrait De Viande .....	5g
Glucose.....	5g
Na Cl .....	65g
Agar.....	15g
Eau Distillée.....	1l

On ajuste le pH à 6.2

•Stérilisation par autoclavage à 120 C° Pendant 20 min.

### ✓ **Milieu MRS bouillon (sans citrated'ammonium)(Man et al ,1960)**

Peptone.....	10g
Extrait de viande.....	10g
Extrait de levure.....	5g
Glucose.....	20g
Tween80 .....	1ml
Phosphate di potassique .....	2g
Acétate de sodium .....	5g
Sulfate de magnésium.....	0.2g
Sulfate de Manganése.....	0,5g
Eau distillée.....	1L

On ajuste le pH à 5.5 et 6.5

• Stérilisation par autoclavage à 120 C° Pendant 15 min.

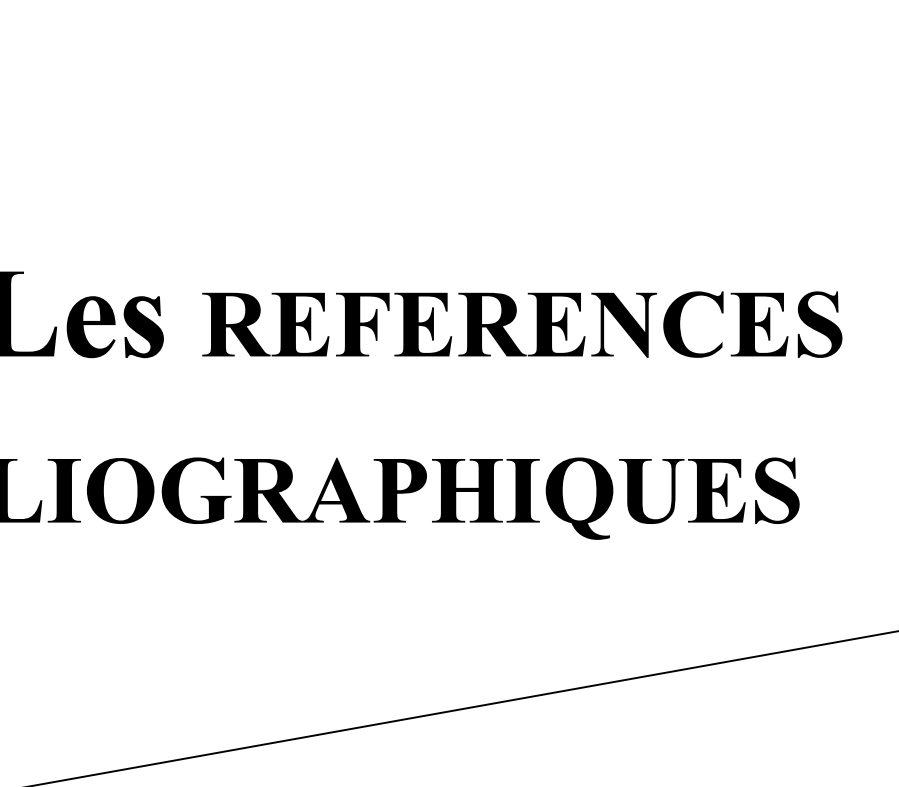
## 1. Technique de la coloration de Gram

### 1) Préparation du frottis :

- A l'aide d'une pipette pasteur on met une goutte d'eau physiologique stérile dans une lame.
- On mélange une souche bactérienne avec la goutte d'eau. On fait séchage de la suspension bactérienne par passage rapide sur la flamme du bec benzène.

### 2) Coloration du frottis :

- Une goutte de cristal violet est ajoutée sur le frottis, après 60 secondes on rince avec de l'eau distillé.
- Une goutte du lugol est ajoutée, après 30 secondes on rince avec de l'eau distillé.
- On ajoute de l'alcool, et on incine la lame jusqu'à disparition de la coloration violette.
- On rince à l'eau distillé.
- On ajoute de la fuschine, et on rince après une action de 15 secondes.
- Après on ajoute une goutte d'huile à immersion sur lame, celle-ci est observée au microscope à immersion grossissement ( $\times 100$ ), les cellules Gram+ apparaissent en violet, les Gram- apparaissent en rose. **(Guiraud, 2003).**



**Les REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES**

### A

Acolas JP, Hemme D, Desmazeaud M, Vassal L, Bouillanne C, Veaux M. (1980). Les levains lactiques thermophiles : propriétés et comportement en technologie laitière. *Lait*. 60, 487-524.

Ahn, J.H., Hong, I.P., Bok, J.I., Kim, B.Y., Song, J., Weon, H.Y. 2012. Pyrosequencing analysis of the bacterial communities in the guts of honeybees *Apis cerana* and *Apis mellifera* in Korea. *J. Microbiol.* 50 :735–745.

Al Atya, A., Kh. (2016). Recherche et caractérisation de nouveaux peptides antimicrobiens à partir de bactéries lactiques isolées de méconium, Thèse de Doctorat, Spécialité : Ingénierie des fonctions biologiques, Université de Lille 1, p.12, 14.

Amara Sabrina. Intitulé ... Effets probiotiques des bactéries lactiques sur le poulet de ... 1-4-6. Structure biochimique des prébiotiques et effets sur la flore... Mémoire - Université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella <https://theses.univ-oran1.dz> > document

Ammour M. S. (2004). écosystème microbien d'un atelier fermier de salaison Identification et propriétés des bactéries lactiques. Thèse doctorat Agrocampus Rennes.

Ammor S, Tauveron G, Dufor E, et Chevalier 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 antibacterial compound. *Food Control*. 17 : 454-461.

Assie, B., 2004. Le miel comme agent cicatrisant. Thèse d'exercice en médecine «Qualification Médecine Générale ». Université Paul Sabatier de Toulouse, 115 p.

Atrih, A., Rekhif, N., Moir, A.J.G., Lebrihi, A. et 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.

Axelsson, L. (2004). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: Salminen, S. V. on Wright, A. and Ouwehand A. (Eds), *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. 3rd rev. ed. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 1-66.

Aymerich, T., Garriga, M., Ylla, J., Vallier, J., Monfort, J.M. et Hugas, M. (2000) Application of enterocins as biopreservatives against *Listeria innocua* in meat products. *J. Food Prot.* 63: 721-6.

### B

Badis, A., Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal M., Ouzrout, R. 2005. Phenotypic characterization of isolated from raw goat's milk from two local goat populations "Arabia and Kabyle" lactic acid bacteria. *Sci. Technol.* 23 : 30-37.

Bekhouche Farida. (2006). Bactéries lactiques du lait cru de vache et Microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes : 1. Isolement et Identification biochimique. 2. Evaluation et Optimisation de la production d'enzyme polygalacturonase. Thèse de doctorat d'état en microbiologie et enzymologie option : génie alimentaire. Université De Mentouri Constantine Institut De La Nutrition De L'alimentation Et Des Technologies.

Bogdanov, S., Blumer P. 2001. Propriétés antibiotiques naturelles du miel. Centre Suisse de recherches apicoles 8p.

Boulaaba, I.A. 2019. Place Du miel à l'officine, Thèse de doctorat, Faculté De De Pharmacie De Marseille.

Bourgeois, C.M.,Larpen J.-P. Microbiologie alimentaire :Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Tome1.2<sup>e</sup>Ed.Tec& Doc .1996.704p. Bourgeois C.M., Larpen J-P. Microbiologie alimentaire –Aliments fermentés et fermentation alimentaires.Tome 2.Tec &Doc.1996.704p.

Budzynski, K. 2006. Effect of hydrogenperoxyd on antibacterialactivity of canadianhoney, can. j. microbial. 52 : 1228-1237

### C

Caplice, E. et Fitzgerald, G.F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 50: 131-49.

Carine. D ; Tonart. P. (2009). Les bacériocines des bactéries lactiques caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. Base.13.

Chao, S.H., Huang, H.Y.,Kang, Y.H., Watanabe, K., Tsai, Y.C. (2013). The diversity of lactic acid bacteria in a traditional Taiwanese millet alcoholic beverage during fermentation. *LWT – food Sci technol*, 51(1) : 135—142.

Cho, H., Yun, C.W. Park, Y., Lee, S., Kim, B.K. 2004.Modulation of the activity of proinflammatory enzymes, COX-2 and iNOS, by chrysin derivatives,” *PharmacologicalResearch*.49(1) : 37–43.

Claude Jardel, Jacques Goût, 250 réponses aux questions d' un ami d' abeilles, la compagnie des éditions de la lesse, france 2008.

Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. Bacteriocins: Safe, natural antimicrobials for foodpreservation. *Int J Food Microbiol* 2001;71:1–20. doi:10.1016/S0168-1605(01)00560-8.

Cogan T M (1980). Les levains lactiques mésophiles. *Lait.* 60, 397-425.

Corrieu, G et Luquet , F . M. (2008) . Bactéries lactiques de la génétique aux ferments. Tec & Doc, p 849.

Corrieu, G., Luquet, F., M. (2008). Bactéries Lactiques, de la Génétique aux Ferments, Collection « Sciences et Techniques Agroalimentaires », 2ème éditions, p.83.

### D

Dao, T.T., Chi, Y.S., Kim, J., Kim, H.P, Kim S., Park, H. 2004. Synthesis and inhibitory activity against COX-2 catalyze dprostagl and in production of chrysin de rivatives. *Bioorganicand MedicinalChemistryLetters*. 14(5) :1165–1167.

Delarras, C. (2007). Microbiologie Pratique pour le Laboratoire d'Analyse ou de Contrôle Sanitaire, Edition Lavoisier, p.128.

De Man, J., Rogosan M.et Sharpe, M. E., 1960. A medium for the cultivation of Lactobacilli, *J. Appl. Bacteriol.* 23:130-135.

Devoyod J.J. et Poullain F. (1988). Les Leuconostocs propriétés : leur rôle en technologie laitière. *Lait*. 68 : 249-280.

De vuyst, L., Vandamme, E.J. (1994). Bacteriocins of lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications. London: Blackie Academic and professional.

Dimopoulou, M. (2013). Les Polysaccharides de la Bactérie Lactique *Oenococcusoeni*, de l'Elucidation de leurs Structures et Voies de Biosynthèse à leur Valorisation Technologique, Thèse de Doctorat, Spécialité : Œnologie, Université de Bordeaux 2, p.9.

Dortu, C et Thonart P, (2009). Les bactériocines des bactérie lactique :caractéristiques et intérêt pour la biopreservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron.Soc. Environ.*, 13(1), 143-145.

Duboc P, Mollet B. Applications of exopolysaccharides in the dairyindustry. *Int Dairy J* 2001;11:759–68. doi:10.1016/S0958-6946(01)00119-4.

### E

Elmer G.W., Surawicz C.M., McFarland L.V., Biotherapeutic agents. A neglected modality for -the treatment and prevention of selected intestinal and vaginal infection, *J. Am. Med. Assoc.* 275 (1996) 870-876.

El Saraih, A.A. (2016). Propriétés Antagonistes et Probiotiques de Nouvelles Bactéries lactiques et Levures Isolées des Matières Fécales Humaine et Animale, Thèse de Doctorat, Spécialité : Ingénierie des Fonctions Biologiques, Université Lille 1 – Sciences et technologies,p.38.

Endo, A. & Okada, S. (2008). Reclassification of the genus *Leuconostoc* and proposals of *Fructobacillus fructosus* gen. nov., comb. nov., *Fructobacillus durionis* comb. nov., *Fructobacillus ficulneus* comb. nov. and *Fructobacillus pseudoficulneus* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* 58: 2195–205.

### F

Fahimi, N. (2012). Etude des interactions entre bactéries lactiques œnologiques *Oenococcus oeni*, Analyses Cinétiques et Modélisation, Thèse de doctorat, Université de Toulouse, France, p. 58 – 61.

Felis G, Salvetti S, Torriani S. Systematics of Lactic Acid Bacteria: Current Status. *Biotechnol Lact Acid Bact Nov* 2015.

Feng, J., Liu, P., Yang, X., Zhao, X. 2015. Screening of immunomodulatory and adhesive *Lactobacillus* with antagonistic activities against *Salmonella* from fermented vegetables. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31 : 1947-1954.

Fennema, O. F., Hui, Y.H., Karel, M., Walstra, P., Whitaker, J.R. (2004). Lactic acid bacteria (Microbiological and Functional Aspects) In: Salminen S, von Wright A, editors. Food science and technology a series of monographs, textbooks, and reference books. New York: Marcel Dekker, Inc. 19—30.

Fröhlich, J et König, H. (2009). Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

Fuller R., Probiotics in man and animal, *J. Appl. Bacteriol.* 66 (1989) 365-378.

### G

Galvez, A., Abriouel, H., Ben Omer, N., Lucas, R. (2011). Food Applications and Regulation In: Drider D., et Rebuffat S. (eds). Prokaryotic Antimicrobial peptides: From Genes to Applications. Springer-Verlag. 253-390.

Gevers, D. (2002). Tetracycline resistance in lactic acid bacteria isolated from fermented drysausages. Thèse Doc. Univ. Gent. Fac. Sci. Gent. Belgium.

Gilliam, M., Morton, H.L. 1978. Bacteria belonging to the genus *Bacillus* isolated from honeybees, *Apis mellifera*, fed 2,4-d and antibiotics (1) *Apidologie.* 9 : 213–222.

Gilliam, M. 1997. Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honeybees. *FEMS Microbiol Lett.* 155 : 1–10.

Gilliland S.E. 1985. Role of starter culture bacteria in food preservation. Bacterial starter cultures for food. Gilliland S. E. Boca Raton, USA, CRC Press Inc : 175-185.

Griswold D.E., Adams J.L. 1996. Cyclooxygénase constitutive (COX-1) et cyclooxygénase inductible (COX-2) : Justification de l'inhibition sélective et progrès accomplis à ce jour. Med Res Rev. 16 (2) : 181-206.

Guarner, F., Sanders, M.E., Gibson, G. Klaenhammer, T., Cabana, M., Scott, K., Reid, G., Delzenne, N. M., Fahey, G. and Hill, C. 2011. Probiotic and prebiotic claims in Europe: seeking a clear roadmap. The British Journal of Nutr. 106 (11): 1765-1767 Tropcheva, R., Nikolova, D., Evstatieva, Y., Danova, S. 2014. Antifungal activity and identification of lactobacilli isolated from traditional dairy product Katak. Anaerobe.28 : 78-84.

Guiraud, J. P. et Rosec J. P. ,2004.Pratique des normes en microbiologie alimentaire. AFNOR.237-251.

Guiraud J.P. (2003). Microbiologie alimentaire. Edition: Dunod. Paris : 615p.

## H

Harris S. Honey for the treatment of superficial wounds: a case report and review. Primary Intention 1994 ; 2(4) : 18-23

Hasali, N.H.M., Zamri, A.I., Lani, M.N., Mubarak, A., Suhaili, Z. 2015. Identification of lactic acid bacteria from Meliponine honey and their antimicrobial activity against pathogenic bacteria. AEJSA. 9(6): 1-6.

Hitchins A.D., Mc Donough A., Prophylactic and therapeutic aspects of fermented milk, Am. J. Clin.Nutr. 49 (1989) 675-684.

Hoda Mahmoud Elzeini, Abdel-rhman Abdel-atti Ali, Nasr Fawzy Nasr, Yasser Essam El enany&Ashwak Abdel Moneim Hassan (2020): Isolation and identification of lactic acid bacteria from the intestinal tracts of honey bees, *Apismellifera*L., in Egypt, Journal of Apicultural Research, DOI: 10.1080/00218839.2020.1746019

Holler B J, Steele JL. (1995). Caractérisation of lactococci other than *Lactococcus lactis* for possible use as starter cultures. International Dairy Journal.(5): 275-289.

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 tetrameric acid. Angew. Chem. Int. 39: 2766—8.

Holzappel et W. Use of starter cultures in fermentation on a household scale. Food Control 1997;8:241–58. doi:10.1016/S0956-7135(97)00017-0.

Holzappel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., and Schillinger, U. (2001). Taxonomy and Important Features of Probiotic Microorganisms in Food and Nutrition. *Am J Clin Nutr* 2001 Feb;73(2 Suppl) :365S-373S.

Holzappel W.H., Haberer P., Snel J., Schillinger U., Huisin't Veld J.H.J., Overview of gutflora and probiotics, *Int. J. Food Microbiol.* 41 (1998) 85-101

Holzappel, W.H., Wood, B. J. B. (2014). *Lactic Acid Bacteria, Biodiversity and taxonomy*, whileyblackwell, 632p.

Hong, S., Wilson, M.T., Serizawa, I., Wu, L., Singh, N., Naidenko, O.V., Miura, T., Haba, T., Scherer, D.C., Wei, J., Kronenberg, M., Koezuka, Y., Van Kaer, L. 2001. The natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide prevents auto immune diabetes in non-obese diabetic mice. *Nat Med.*7(9) : 1052-6.

HomraniMounia, DalacheFatiha, Bouzouina Mohammed, Nemiche Said, HomraniAbdelKader. Antibacterial Activities of Algerian raw Honeys and Isolated *Lactobacillus* against Gram-negative Bacteria *Advances in Bioresearch Adv. Biores.*, Vol 10 (1) January 2019: 31-39.

Ho, T.N.T., Tuan N., Deschamps A. et Caubet R. 2007. Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product of Vietnam. *Int. Workshop on Food Safety and Processing Technology.* 134-142.

([http://www.inra.fr/presse/une collection de bactéries d'inter et laitier](http://www.inra.fr/presse/une_collection_de_bactéries_d'inter_et_laitier)).

([http://www.institut-rosell-allemand.com/uploads/images/souches/lactobacillus R52\\_big.jpg](http://www.institut-rosell-allemand.com/uploads/images/souches/lactobacillus_R52_big.jpg)).

## J

JB Prajapat AP. Food and Health Applications of Exopolysaccharides produced by Lactic acid Bacteria. *Adv Dairy Res* 2013;1. doi:10.4172/2329-888X.1000107.

Jones, J.C. 2004. Honey been esthmoregulation :diversitypromotesstability. *Science* (80-)305 : 402-404.

## K

Kajiwara, S, Gandhi, H, Ustunol, Z. 2002. Effect of honey on the growth of and acid production by human intestinal *Bifidobacterium*spp. : an in vitro comparison with commercial oligosaccharides and inulin. *J Food Prot.* 65(1):214-8.

KANDLER, O. and WEISS, N. (1986A). Regular nonsporing Gram-positive rods. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams, Wilkins, Baltimore, 2, pp: 1208-1209.

Kwakman, P.H.S, Zaat., S.A.J. 2012. Antibacterial components of honey. IUBMB Life. 64(1):48-55.

### L

Lahtinen, S., Ouwehand, A. C., Salminen, S., Vonwright, A. (2012). Lactic Acid Bacteria, Microbiological and Functional Aspects, Fourth edition, p. 18-33, 77.

Larrent, J.P. (1997). Microbiologie Alimentaire. Tec & doc, Lavoisier, Paris, 10 – 72.

Lashani, E., Davoodabadi, A., SoltanDallal, M.M. 2018. Antimicrobial Effects of *Lactobacillus Plantarum* and *Lactobacillus Paracasei* Isolated from Honey against *Staphylococcus Aureus*. *J Babol Univ Med Sci*. 20 (3): 44-49

Lavermicocca, p., valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A. & Gobbetti, M. (2000). Purification and characterisation of novel antifungal compounds by sourdough lactobacillus plantarum 21 B. *Appl. Environ. Microbiol*. 66: 4084—90.

Lee, C.Y., Kime, R.W. 1984. The use of honey for clarifying apple juice. *J Apic Res*. 23:45-49.

Leroy F, De Vuyst L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci Technol* 2004;15:67–78. doi:10.1016/j.tifs.2003.09.004.

### M

Maitre, M. (2012). Le Chaperon Moléculaire Lo18 de *Oenococcus oeni* : Caractérisation de ses Activités en lien avec sa Plasticité Oligomérique, Thèse de Doctorat, Spécialité : Microbiologie, Université de Bourgogne, p.10.

Marchal, N., Bourdon, J.L. et Richard, C.L. 1991. Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. 3<sup>ème</sup> Ed., Doin éditeurs, Paris.

Mathialagan, M., Edward, Y.J.T., David P., Senthilkumar, M., Srinivasan, M., Mohankumar S. 2018. Isolation, Characterization and Identification of Probiotic Lactic Acid Bacteria (LAB) from Honey Bees. *International journal of current microbiology and applied sciences*. 7: 894-906.

Marteau P., Rambaud J.C., Probiotiques en gastroentérologie: bases rationnelles, effets démontrés et perspectives, *Hepato-Gastroenterology* 4 (1998) 267-273.

Mattila J, Häggström M. 2015. "Images of Aerococcusurinae". *Wikiversity Journal of Medicine* 2 (1).

Mensah, P., Tomkins, A.M., Drasar, B.S., Harrison, T.J. (1991). Antimicrobial effect of fermented Ghanaian maize dough. *J. Appl. Bacteriol.* 70: 203—10.

Metchnikoff E., In the prolongation of life: optimistic studies, in: Chalmers M. (Eds.), William Heinemann, London, 1907.

Mohamed Mustafa Aween, Zaiton Hassan, Belal J. Muhialdin, Yossra A. Eljamel, AsmaSaleh W. Al-Mabrok, and MohdNizamLani ,Antibacterial Activity of Lactobacillus acidophilus Strains Isolated from Honey Marketed in Malaysia against Selected Multiple Antibiotic Resistant (MAR) Gram-Positive Bacteria *Journal of Food Science* Vol. 77, Nr. 7, 2012.

Molan P.C,(2002) « Hydroxymethylfural (HMF) and related compounds. In : Stadler R.H. ,Lineback D.R . (Eds) ,ProCESS- Induced food Toxicant: occurrence , formation mitigation , and health risks . Wiley-Blackwell: Hoboken.135

Molan, P.C. 1992. The antibacterial activity of honey : 1. The nature of the antibacterial activity. *Bee World.* 73(1) : 5-28.

Montet D, Ray R, Zakhia-Rozis N. Lactic acid fermentation of vegetables and fruits. *Ferment ...* 2014.

## N

Novel G. (1993).Les bactéries lactiques. In Leveau J-Y et Bouix M. *Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel.* Edition : Tec & Doc, Lavoisier. Paris, pp.170-330.

## O

Olaitan, P.B., Adeleke O.E., Ola, L.O. 2007. Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *AfrHealthSci.* 7 (3) : 159-165.

Olofsson, T.C., Alsterfjord, M., Nilson, B, Butler, E., Vasquez, A. 2014. *Lactobacillus apinorum* sp. nov., *Lactobacillus mellifer* sp. nov., *Lactobacillus melliss* sp. nov., *Lactobacillus melliventris* sp. nov., *Lactobacillus kimbladii* sp. nov., *Lactobacillus Lactobacillus helsingborgensis* sp. nov. and *Lactobacillus kullabergensis* sp. nov., isolated from the honey stomach of the honey bee *Apis mellifera*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 64(9): 3109-3119.

Olofsson, T.C., Butler, E., Markowicz, P., Lindholm, C., Larsson, L., Vasquez, A. 2016. Lactic acid bacterial symbionts in honeybees - an unknown key to honey's antimicrobial and therapeutic activities. *International Wound Journal.* 13(5): 668-679.

Olofsson, T.C, Vásquez, A. 2008. Detection and identification of a novel lactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. *Curr Microbiol.* 57:356-363.

### P

Pajor, M., Worobo, R.W., Milewski, S., Szweda, P. 2018. The Antimicrobial Potential of Bacteria Isolated from Honey Samples Produced in the Apiaries Located in Pomeranian Voivodeship in Northern Poland. *International journal of environmental research and public health.* 15(9), 2002. doi:10.3390/ijerph15092002.

Pan D, Mei X. Antioxidant activity of an exopolysaccharide purified from *Lactococcus Lactis* subsp. *Lactis* 12. *Carbohydr Polym* 2010;80:908-14. doi : 10.1016/j.carpol.2010.01.005.

Pernoud S, Fremaux C, Sepulcre A, Corrieu G, Monnet C. (2004). Effect of the metabolism of urea on the acidifying activity of *Streptococcus thermophilus*. *Journal Dairy De nomination Commun International.* 87: 550-555.

Piccart, K., Vásquez, A., Piepers, S., De Vliegher, S., Olofsson, T.C. 2016. Short communication: Lactic acid bacteria from the honeybee inhibit the in vitro growth of mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science.* 99(4): 2940-2944.

Pilet, M.F., Magras C. et Federighi M., 2005. Bactéries lactiques. In : bactériologie alimentaire (Federighi M.). 2e Ed., Economica. Paris. 219-240.

Pot, B. (2008). The taxonomy of lactic acid bacteria. In: Corrieu G., and Luquet F.M. (Eds). *Bactéries lactiques. De la génétique aux ferments.* Lavoisier. Paris, France. 1-152.

Prestinaci, F., Pezzotti, P., Pantosti, A. 2015. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathogens and Global Health.* 109(7):309-318.

Pringsulaka, O., Thongnam, N., Suwannasai, N., Atthakor, W., Pothivejkul K., Rangsiruji A. (2011). Partial characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat and fish products. *Food Control,* 23: 547-551.

### R

Rattanachaikunsopon P, Phumkhachorn P. Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production. *Ann Biol ...* 2010;1:218–28.

Rodgers, S., 2001. Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures : areview. *Trends FoodSci. Technol.* 12 : 276-284.

Rodgers, S., 2003. Potential applications of protective cultures in cook-chill catering. *Food Control.* 14(1) : 35-42

Rossant, A. 2011. Le miel, un composé complexe aux propriétés surprenantes. Nb thèse de doctorat, université de Limoge faculté de pharmacie. 32p.

Ruas-Madiedo P, Hugenholtz J, Zoon P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Int Dairy J* 2002;12:163–71. doi:10.1016/S0958-6946(01)00160-1.

### S

Salminen S., Wright A.V., Ouwehand A. (2004). *Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects.* Marcel Dekker. Inc., U.S.A.

Sauer, M., Russmayer, H., Grabherr, R., Peterbauer, C.k., Marx, H. (2017). The Efficient Clade: Lactic Acid Bacteria for Industrial Chemical Production. *Trends in Biotechnology* 35: 756-769.

Schaafsma G., State of the art concerning probiotic strains in milk products, *Int. Dairy Fed. Nutr. Newsl.* 5 (1996) 23-24.

Schleifer, K. H. and Ludwig, W. (1995). Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria, p. 7-18. In B. J. B. Wood and W. H. Holzappel (eds.), *the lactic acid bacteria, vol.2: The genera of lactic acid bacteria.* Blackie Academic and Professional, Glasgow.

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

Stackebrandt E. 2014. The Family Aerococcaceae. In: Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (eds) *The Prokaryotes.* Springer, Berlin, Heidelberg.

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

Stiles Michael E ., Holzapfel Wilhelm H. , 1997. Lactic Acid Bacteria of foods and their current taxonomy. *Inter .J.foodMicrobiol*, 36:1-29.

### T

Tajabadi, N., Mardan, M., Manap, A.M. and Shuhaimi, M. 2013. Molecular identification of *Lactobacillus spp.* isolated from the honey comb of the honey bee (*Apis dorsata*) by 16S rRNA gene sequencing. *Journal of Apicultural Research*. 52(5): 235-241.

Temmerman, R. (2003). Culture- dependent and Culture-independent Microbial Analysis of Probiotics. Thèse Doc. Univ. Gent. Fac. Sci. Gent. Belgium.

Temmerman, R., Huys, G. and Swings, J. (2004). Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture independent methods. *Trends Food Sci. Tech.* 15: 348-359.

Tosukhowong, A., Nakayma J. , Mizunoe Y., Sugimoto S. , Fukuda D. et Sonomoto K. , 2005. Reconstitution and function of Tetragenococcus halophilachaperonin 60 tetradecamer. *J.Biosci.Bioengin.* 99 :30-37.

Tropcheva, R., Nikolova, D., Evstatieva, Y., Danova, S. 2014. Antifungal activity and identification of lactobacilli isolated from traditional dairy product Katak. *Anaerobe*. 28:78-84.

Tsakalidou E, Zoidou E, Kalantzopoulos G. (1992). Esterase activities of cell-free extracts from strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from traditional Greek cheese. *Journal Dairy Research*, 59 : 111-113.

### U

Ustunol, Z., Gandhi, H. 2001. Growth and viability of commercial *Bifidobacterium spp.* in honey-sweetened skim milk. *Journal of Food Protection*. 64 : 1775–1779.

### V

Vanderhoof J.A., Young R.J., Use of probiotics in childhood gastrointestinal disorders, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 27 (1998) 323-332.

Van kranenburg, R., Kleerebezem, M., van Hylekama Vlieg, J. (2002). Flavour formation from amino acids by lactic acid bacteria: predictions from genome sequence analysis. *Int. Dairy J.* 12: 111—21.

Vasquez, A., Forsgren E., Fries, I., Paxton, R.J., Flaberg E., Szekely L., Olofsson T.C. 2012. Symbionts as major modulators of insect health :lactic acid bacteria and honeybees. PLOS ONE.7 (3), e33188.

Vasquez, A., Tolbias, C., Olofsson, Diana Sammataro. 2009. A scientific note the lactic acid bacterial flora in honeybees in the USA – A comparison with bees from Sweden. Apidologie. 40 : 26-28.

Vermeriren, L., Devlieghere, F. et Debevere, J. (2004). Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. Int J Food Microbiol. 96: 149- 164.

VeskovićMoračanin SM, Dukić DA, Memiši NR. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria- A review. Acta Period Technol 2014;45: 271–83. doi:10.2298/APT1445271V.

### W

Woese, C.R. (1987). Bacterial evolution. Microbiol Rev.51 :221-271.

### Z

Zhang L, Liu C, Li D, Zhao Y, Zhang X, Zeng X, et al. Antioxidant activity of an exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus plantarum* C88. Int J BiolMacromol 2013; 54:270–5. doi:10.1016/j.ijbiomac.2012.12.037.